

1119

UNIVERSITE DE NEUCHÂTEL

FACULTE DES SCIENCES

LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE VEGETALE

PROFESSEUR P.-A. SIEGENTHALER

ROLE DES LIPIDES DIACYLES DANS  
L'INTERACTION DES HERBICIDES  
PHOTOSYNTHETIQUES AVEC LES  
MEMBRANES THYLACOIDALES DE  
*SOLANUM NIGRUM* L. ET  
*SPINACIA OLERACEA* L.

THESE

présentée à la Faculté des Sciences

de l'Université de Neuchâtel

pour obtenir le grade de docteur ès sciences

option physiologie végétale et biochimie

par

**Jean-Philippe Mayor**

1991

# IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Rôle des lipides diacylés dans l'interaction  
des herbicides photosynthétiques avec les  
membranes thylacoïdales de *Solanum nigrum* L.  
et *Spinacia oleracea* L.

de Monsieur Jean-Philippe Mayor

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel  
sur le rapport des membres du jury,

Messieurs P.A. Siegenthaler, A. Rawlyer,  
E. Beuret (Auvernier), P. Mazliak (Paris)  
et J.M. Ducruet (Saclay)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 2 septembre 1991

Le doyen:

  
C. Mermod

UNIVERSITE DE NEUCHÂTEL

FACULTE DES SCIENCES

LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE VEGETALE

PROFESSEUR P.-A. SIEGENTHALER

ROLE DES LIPIDES DIACYLES DANS  
L'INTERACTION DES HERBICIDES  
PHOTOSYNTHETIQUES AVEC LES  
MEMBRANES THYLACOIDALES DE  
*SOLANUM NIGRUM* L. ET  
*SPINACIA OLERACEA* L.

THESE

présentée à la Faculté des Sciences

de l'Université de Neuchâtel

pour obtenir le grade de docteur ès sciences

option physiologie végétale et biochimie

par

**Jean-Philippe Mayor**

1991

## TABLE GENERALE DES MATIERES

PREFACE . . . . .	2
AVANT-PROPOS . . . . .	4
ABREVIATIONS . . . . .	5
PREMIERE PARTIE : . . . . .	7
QUELQUES INTERACTIONS DE L'ATRAZINE ET DU DCMU AVEC DES MEMBRANES SYNTHETIQUES DE COMPOSITION LIPIDIQUE DIVERSE (LIPOSOMES OU SUV)	
DEUXIEME PARTIE : . . . . .	53
PHENOLOGIE ET MORPHOLOGIE DE <i>SOLANUM NIGRUM</i> L.	
TROISIEME PARTIE : . . . . .	97
COMPOSITION ET STRUCTURE LIPIDIQUE DES MEMBRANES THYLACOIDALES DE <i>SOLANUM NIGRUM</i> L.	
QUATRIEME PARTIE : . . . . .	139
QUELQUES ASPECTS DE L'ACTION DE L'ATRAZINE ET DU DCMU SUR DES MEMBRANES BIOLOGIQUES. (IMPORTANCE DE LA PHASE LIPIDIQUE)	
RESUME ET CONCLUSIONS FINALES . . . . .	231
BIBLIOGRAPHIE . . . . .	233
ANNEXES . . . . .	266

## PREFACE

Le laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université de Neuchâtel a su, au fil des ans, se forger une réputation internationale dans l'étude des relations entre les structures et les fonctions des membranes du chloroplaste. C'est donc tout naturellement que mon travail de licence porta déjà sur ce thème et qu'il constitua le "tremplin" de ce travail de doctorat.

Le professeur P.-A. Siegenthaler, en m'accueillant dans son laboratoire, m'a demandé d'examiner et de préciser le rôle que pouvaient jouer les lipides thylacoïdaux en interaction avec les herbicides photosynthétiques. Je lui suis gré de la confiance qu'il m'a accordée en m'autorisant à laisser libre cours à mon imagination et en me donnant "carte blanche" dans l'organisation de ma recherche et de mon assistantat.

Les cinq années qu'a duré ce travail me permettent d'évaluer à quel point la relation entre le doctorant et son directeur de thèse dépasse le cadre strictement professionnel. En effet, grâce à d'innombrables heures partagées, j'ai appris non seulement à rédiger un texte scientifique et à y prendre plaisir, mais encore à renforcer mon caractère à côté d'un patron amical mais minutieux et exigeant. Ainsi, autant pour l'attention qu'il aura portée à mon travail que pour la bienveillance qu'il me témoigne, ma gratitude et mon amitié lui sont acquises.

Je désire exprimer ici mes remerciements au professeur P. Mazliak et au Dr. J.M. Ducruet, de Paris, pour avoir accepté de faire partie du jury de thèse.

Fait également partie de ce jury, le Dr. E. Beuret, de Changins, qu'il trouve ici ma gratitude. C'est lui qui a jeté en moi la "graine malherbologique" maintenant germante.

Je dois ma grande reconnaissance au Dr. A. Rawyler, de Neuchâtel, qui me fait l'amitié d'appartenir à ce jury de thèse. Tout au long de ce travail il a été le conseiller perspicace et rusé, présent dans les moments de joie intense que procure une nouvelle expérience réussie, mais aussi là dans l'infortune de l'expérience qui échoue. Il m'a, en outre, montré qu'un chef de travaux "ne devait pas seulement tenir la main du doctorant mais également savoir la lui lâcher", pour reprendre ses mots.

Je remercie le Dr. L. Vigh ainsi que sa femme, le Dr. I. Horwath, de Szeged, pour m'avoir initié à la technique de l'hydrogénation catalytique et de m'avoir accueilli dans leur laboratoire en Hongrie.

Je désire exprimer ma gratitude au professeur P. Williams, de Londres, pour s'être penché sur les résultats de la première partie et pour avoir exécuté plusieurs microphotographies de mes liposomes. Je désire également remercier le professeur J.-M. Gobat, de Neuchâtel, pour s'être penché sur les résultats de la deuxième partie.

Mes chaleureux remerciements vont encore à l'une de nos étudiantes, Mademoiselle C. van Erkom Schurink et à trois de nos apprentis, Mesdemoiselles M. Küffner et N. Guignard ainsi que Monsieur D. Monney sans lesquels il m'eût été impossible de mener à bien cette recherche. En effet, malgré mes nombreuses absences prolongées, ils ont conduit des manipulations parfois délicates et souvent de longue haleine. Tous, Myriam pour la première, Corine pour la seconde, Dominique pour la troisième et une fraction de la quatrième et Nathalie pour la majorité de la dernière Partie, ont été à tour de rôle, les principaux acteurs des expériences décrites dans ce travail.

Je ne saurais oublier une amie et deux amis, Madame J. Smutny, qui accomplit avec grande précision plusieurs figures présentées dans ce manuscrit, ainsi que Messieurs G. Hagelstein et J.-P. Jeanneret qui furent "ma conscience informatique". Pour leur patience et pour leur amitié, mes remerciements reconnaissants leur sont destinés.

Je tiens à formuler ici ma gratitude à toutes les personnes permanentes ou de passage dans le laboratoire, pour avoir su créer et entretenir une atmosphère joviale et familiale tout au long de mes efforts. Dans cet état d'esprit, je tiens à remercier tout particulièrement Madame M. Mcylan qui fut la complice de chaque instant.

Je ne saurais encore oublier mes parents, précieux confidents, qui par amour m'encouragèrent et me soutinrent tout au long de cette entreprise. Ils ont su développer en moi la passion de l'inconnu et l'ardeur au travail. A toi Jean-Jacques je dédie la Première Partie, systématique, synthétique, celle qui m'a d'abord fait douter, puis qui m'a aidé à mieux comprendre certains phénomènes. A toi Rose-Marie, je dédie la Deuxième Partie, la plus proche de la Nature, celle qui paraît le plus accessible, mais qui en fait l'est le moins...

Enfin, ma femme Béatrice et mes filles Lise-Gendrine et Ann-Géraldine, qui toutes trois ont vécu (je devrais dire survécu) heure après heure les tribulations de leur époux et papa, entièrement absorbé dans ses activités scientifiques. Merci de m'avoir soutenu par la spontanéité de vos éclats de rire et par la simplicité de vos besoins. A toi Béatrice, je dédie la Troisième Partie, analytique, rigoureuse et indispensable. A vous Lise et Ann, je dédie la Quatrième Partie, la plus folle, la plus jeune et la plus insouciante.

Pour terminer, je voudrais remercier chaleureusement la Station fédérale de recherches agronomiques de Changins et plus particulièrement sa direction qui a contribué, dans une très large mesure, à ménager un "biotope" favorable à la rédaction de cette thèse. En effet, il était primordial de jeter un pont entre la recherche fondamentale et la recherche appliquée, puisque les herbicides sont autant des outils de laboratoire que des produits phytosanitaires. La connaissance du comportement moléculaire de ces pesticides sur leur site d'action spécifique ainsi que les impacts économiques et écologiques considérables que représentent leur utilisation, sont autant de facettes qui permettent d'appréhender le "concept herbicide" dans sa globalité.

A tous, encore une fois merci !

## AVANT-PROPOS

Parler de la fonction des lipides est en soi ambigu puisqu'ils ne portent en eux-mêmes aucune fonction catalytique. Cependant, il a été suggéré que les lipides peuvent contrôler la perméabilité membranaire et le transport des ions, agir sur le transport, la fluidité, l'incorporation et l'assemblage des protéines et en particulier moduler l'activité enzymatique d'une protéine donnée ou d'un système multienzymatique complexe (pour une revue, voir Siegenthaler & Rawlyer, 1986).

Dans cette étude, nous avons tenté de mettre en évidence une interaction herbicides photosynthétiques - lipides thylacoïdaux et à en expliquer les mécanismes. Pour atteindre ces objectifs, de prime abord simples, nous avons élaboré la stratégie suivante:

- 1°/ Déterminer une interaction mesurable entre des membranes lipidiques artificielles (liposomes) et des herbicides photosynthétiques (atrazine et DCMU).
- 2°/ Déterminer, avant de travailler avec des membranes biologiques, les meilleures conditions de culture des morelles noires (*Solanum nigrum* L.) et cerner les différences phéno-morphologiques entre plusieurs biotypes sensibles et résistants à l'atrazine.
- 3°/ Analyser la composition des thylacoïdes (lipides, pigments, protéines, etc...) de deux biotypes de *S. nigrum* choisis, un sensible et l'autre résistants à l'atrazine et examiner la distribution transversale des lipides dans les thylacoïdes respectifs.
- 4°/ Finalement, étudier comment varie le pouvoir inhibiteur des herbicides sur le transport d'électrons de la chaîne photosynthétique et comment est modulée leur liaison sur le thylacoïde soumis à divers stress qui visent à altérer la partie lipidique membranaire.

Ce travail suit un plan quelque peu hybride entre celui présenté usuellement pour une thèse et celui rencontré dans une "revue". D'une part, chaque partie peut être considérée indépendamment, d'autre part, nous avons tiré quelques parallèles entre elles, qui obligeront le lecteur à "voyager" dans le manuscrit. Nous n'avons constitué qu'une seule bibliographie, placée en fin d'ouvrage, qui devrait permettre une recherche des références plus aisée. Pour terminer, le lecteur rencontrera tout au long de sa lecture, bon nombre de conclusions intermédiaires qui tentent de jalonner le texte.

## ABREVIATIONS

AB	alcool benzylique
ADP	adénosine-diphosphate
Asc	ascorbate
ATP	adénosine-triphosphate
atrazine	2-chloro-4-(éthylamino)-6-(isopropylamino)-s-triazine
BSA	albumine sérique de Boeuf
carot	caroténoïdes
Chl	chlorophylles
Cyt	cytochromes
DBI	double bond index
DBMIB	dibromothymoquinone
DCMU	3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée
DCPIP	2,5-dichlorphénol-indophénol
DGDG	digalactosyldiacylglycérol
DMQ	2,5-diméthyl-p-benzoquinone
$E_a$	énergie d'activation
EDTA	acide éthylène-diamine-tétracétique
EtOH	éthanol
FCCP	carbonyl cyanide 4-trifluorométhoxyphénylhydrazone
Fd	ferrédoxine
FeCn	ferricyanure
GC	chromatographie en phase gazeuse
$I_{50}$	demi-inhibition
I.d.f.	indice de découpage des feuilles
Kd	constante de dissociation
$K_p$	coefficient de partition
LHCP	light harvesting complex protein
LRa	lipase de <i>Rhizopus arrhizus</i>
MGDG	monogalactosyldiacylglycérol
MOPS	morpholinopropane-sulfonate
MV	méthylviologène

n	nombre de sites de liaison
NADP <sup>+</sup>	nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate
PC	phosphatidylcholine
PD	p-phénylène-diamine
Pd(QS) <sub>2</sub>	palladium di(sodium-alizarine monosulphonate)
PG	phosphatidylglycérol
PLA <sub>2</sub>	phospholipase de type A <sub>2</sub>
PS I, PS II	photosystème I et II
PQ	plastoquinone
Q	premier accepteur stable du PS II
R	résistant (à l'atrazine)
R/j/F	biotype résistant à fruits jaunes et d'origine française
R/n/CH	biotype résistant à fruits noires et d'origine suisse
R/n/F	biotype résistant à fruits noires et d'origine française
S	sensible (à l'atrazine)
S/j/F	biotype sensible à fruits jaunes et d'origine française
S/n/CH	biotype sensible à fruits noires et d'origine suisse
S/n/F	biotype sensible à fruits noires et d'origine française
SQOG	sulfoquinovosyldiacylglycérol
SUV	small unilamellar vesicles
T <sub>1/2</sub>	demi-temps de montée de la fluorescence
Tricine	n-tris-(hydroxyméthyl)-méthylglycine
TX-100	Triton X-100
X	premier accepteur du PS I

# **PREMIERE PARTIE:**

**QUELQUES INTERACTIONS DE  
L'ATRAZINE ET DU DCMU AVEC DES  
MEMBRANES SYNTHETIQUES DE  
COMPOSITION LIPIDIQUE DIVERSE  
(LIPOSOME OU SUV)**

La question est bien assez embrouillée comme cela, sans que je l'obscurcisse encore par de nouveaux éclaircissements.

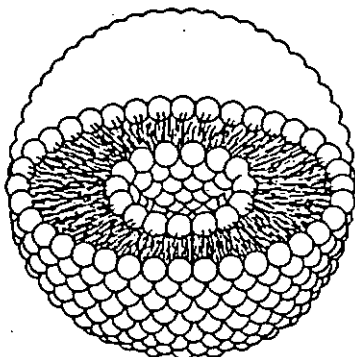
Victor Hugo

TABLE DES MATIERES DE LA 1<sup>ère</sup> PARTIE

1 INTRODUCTION . . . . .	8
2 BUT DE LA PREMIERE PARTIE . . . . .	10
3 MATERIEL ET METHODES . . . . .	10
3.1 <u>Matériel &amp; Produits</u> . . . . .	10
3.2 <u>Préparation des liposomes</u> . . . . .	11
3.2.1 Liposomes pour les mesures fluorimétriques . . . . .	11
3.2.2 Liposomes pour les mesures turbidimétriques et de partition . . . . .	11
3.2.3 Liposomes pour les mesures de perméabilité . . . . .	11
3.3 <u>Comportement thermotropique des liposomes</u> . . . . .	12
3.4 <u>Détermination des coefficients de partition des herbicides</u> . . . . .	12
4 RESULTATS. ET DISCUSSIONS . . . . .	14
4.1 <u>Quelques problèmes d'ordre méthodologique</u> . . . . .	14
4.1.1 Les liposomes contenant une sonde . . . . .	14
4.1.2 Les liposomes dépourvus de sonde . . . . .	27
4.2 <u>Effets des herbicides sur le comportement thermotropique des liposomes</u> . . . . .	32
4.3 <u>Coefficient de partage des herbicides.</u> . . . . .	49
5 RESUME . . . . .	51
6 CONCLUSIONS DE LA PREMIERE PARTIE . . . . .	52

## 1 INTRODUCTION

Lorsque l'on mélange à de l'eau des phospholipides en concentration suffisante, les chaînes acylées se regroupent spontanément, le plus loin possible de l'eau, tandis que les têtes polaires se placent au contact des molécules d'eau. Il se forme ainsi une double couche où les chaînes d'acides gras hydrophobes sont dirigées vers l'intérieur de la membrane et les têtes hydrophiles vers l'extérieur. Il existe deux formes standard de vésicules: les liposomes "en pelure d'oignon", ou vésicules plurilamellaires, constitués de plusieurs bicouches lipidiques, séparées par des couches de liquide, et, les liposomes unilamellaires, constitués d'une seule bicouche de lipides, entourant un petit volume de liquide (Fig. 1). Parmi les liposomes à une seule bicouche lipidique, on distingue généralement les petites (SUV - "small unilamellar vesicles") et les grosses (LUV - "large unilamellar vesicles") vésicules; pour une revue sur les différents types de vésicules, leur préparation et leur nomenclature, voir Bangham (1982).



Liposome

Fig. 1: Représentation schématique d'un petit liposome unilamellaire ou SUV (= Small Unilamellar Vesicle).

C'est en 1965 que Bangham et ses collaborateurs caractérisent pour la première fois les liposomes (Bangham et al. 1965). Depuis, l'étude des membranes artificielles n'a cessé de croître. Deux raisons sont à l'origine de cet intérêt: La première est en relation avec la complexité des membranes biologiques. En effet, les liposomes permettent définir les propriétés et le rôle des composants membranaires considérés individuellement, de sorte qu'en compliquant progressivement les systèmes de membranes, le rôle que certaines molécules pourraient jouer *in vivo* peut être appréhendé. La deuxième est en relation avec la propriété qu'ont les liposomes de pouvoir englober, au sein de leur membrane ou dans l'espace aqueux interne, des molécules de nature diverse (colorants, pesticides, drogues, etc...). On pourra d'une part étudier les effets de ces divers composés sur les propriétés physico-chimiques des membranes et d'autre part utiliser les vésicules comme transporteurs de drogues dans des organismes vivants.

La raison de la grande diversité des molécules de lipides dans les membranes n'est pas encore comprise. Cependant, elle est considérée pour satisfaire trois demandes membranaires: a) former une bicouche qui assure une barrière perméable à l'eau et à certaines molécules et imperméable à d'autres (Deamer & Ramhall, 1986); b) former des structures hexagonales ( $H_2$ ) qui permettent l'association de certaines structures par des phénomènes de fusion (Wilschut & Hoekstra, 1986); c) laisser une certaine liberté aux chaînes acylées lorsqu'elles sont arrangées en bicouches (Cullis et al. 1986). Ainsi, il a été proposé que chaque espèce lipidique est spécifique et par voie de conséquence nécessaire, voire indispensable au bon fonctionnement de la membrane (Lee et al. 1986). Cependant, il est également possible de formuler un concept opposé à partir des mêmes données; c'est-à-dire que la grande diversité de lipides n'a pas d'importance et que n'importe quel mélange de lipides est aussi valable qu'un autre quant au bon fonctionnement de la membrane. Il en résulte que la cellule est libre de construire sa membrane en utilisant n'importe quelles chaînes d'acides gras et têtes polaires, généralement, celles que la cellule trouverait le plus aisément et en plus grande quantité (Lee et al. 1986). Cette dernière hypothèse semble néanmoins improbable, puisque la composition et la distribution lipidique des différentes membranes biologiques sont très stables. Quoi qu'il en soit, la plupart des animaux poikilothermes, des végétaux et des bactéries sont à même d'adapter la composition lipidique de leurs membranes en fonction des conditions extérieures (voir les 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> Parties). Cette dernière observation suggère que l'adaptation, qui vise à moduler d'abord la fluidité membranaire et par là même sa perméabilité, joue un rôle prépondérant dans le fonctionnement de certaines enzymes membranaires (Chapman, 1983). Dans cette 1<sup>ère</sup> Partie, nous nous sommes intéressés à l'effet que peut avoir certains herbicides (atrazine et DCMU) sur la partie lipidique de la membrane. Il nous intéressait en premier lieu de déterminer si ces molécules influencent les propriétés thermotropiques des lipides organisés en structures bicouches (SUV) et, parallèlement, si la fluidité et la perméabilité membranaires s'en trouvent altérées.

## 2 BUT DE LA PREMIERE PARTIE

Les effets des herbicides PS-II sur les plantes ont été étudiés intensément et plusieurs aspects de leur mode d'action ont pu être clarifiés (pour une revue, voir Pfister & Urbach, 1983). Des composés tels que les urées substituées et les triazines symétriques sont des inhibiteurs puissants du flux d'électrons photosynthétique et leur cible principale a été identifiée sur le côté réducteur du PS-II, plus précisément sur le polypeptide 32 kD. Ce dernier étant intrinsèque à la membrane, il est en interaction avec d'autres polypeptides du PS-II et probablement aussi avec certains lipides. Une liaison efficace des herbicides sur le polypeptide 32 kD implique que celui-ci adopte une conformation particulière (Renger *et al.* 1984; Vermaas *et al.* 1984) et que les lipides membranaires participent à la stabilisation de cette conformation. Or, comme la plupart des herbicides sont des molécules lipophiles, ils doivent aisément pénétrer la partie lipidique de la membrane et probablement altérer ses propriétés physiques. Il nous paraît donc intéressant de chercher si l'induction de telles altérations physiques de la partie lipidique membranaire peut, à son tour, changer la conformation du polypeptide 32 kD et modifier ainsi les propriétés de liaison et d'inhibition des herbicides sur leur site de liaison. Cependant, dans une première étape il nous paraît indispensable de déterminer si les herbicides sont susceptibles d'altérer l'organisation moléculaire ainsi que les propriétés physiques de certains lipides ou de certains mélanges de lipides, en utilisant des systèmes simples de membranes artificielles. Il existe un bon nombre de techniques permettant d'étudier la structure et la dynamique des lipides membranaires: la NMR - "nuclear magnetic resonance", l'ESR - "electron spin resonance", la DSC - "differential scanning calorimetry", la diffraction des rayons X, l'anisotropie optique (turbidimétrie, sondes fluorescentes, polarisation) (Lenz & Curatola, 1975; Stubbs, 1983). Pourtant, l'ambiguïté majeure lorsque l'on étudie la fluidité membranaire réside dans le fait que les différentes techniques et les différentes sondes ne détectent pas nécessairement les mêmes changements physiques (Oldfield & Chapman, 1972; Demel & Kruijff *de*, 1976). Pour des raisons de facilité d'appareillage, nous étudierons les effets des herbicides sur le comportement thermotrope de différents types de SUV par la méthode de l'anisotropie optique (fluorimétrie et turbidimétrie) et nous tenterons de les expliquer par comparaison avec les effets bien connus de certaines molécules (stéroïdes, alcools, etc.). Nous déterminerons également l'effet des herbicides sur la perméabilité des SUV à l'ascorbate et nous terminerons en déterminant les coefficients de partition des deux herbicides dans différents systèmes membranaires.

## 3 MATERIEL ET METHODES

### 3.1 Matériel & Produits

Les phosphatidylcholines dimyristique (DMPC), dipalmitique (DPPC) et distéarique (DSPC) ainsi que le cholestérol sont de la plus grande pureté commerciale disponible sur le marché et proviennent de chez FLUKA. A partir de membranes thylacoïdales fraîchement préparées, un extrait lipidique total, est obtenu [voir § 3.4.1, 3<sup>ème</sup> Partie (Bligh & Dyer, 1959)], qui est utilisé pour purifier la chlorophylle *a* (Chl *a*) et

obtenir un extrait de lipides thylacoïdaux dépigmentés. Les mono- et digalactosyldiacylglycérols (MGDG et DGDG) sont purifiés, soit à partir de membranes thylacoïdales d'Épinard, soit à partir de farine de blé, en utilisant des techniques bien établies (Kates, 1972). Les deux galactolipides et les lipides thylacoïdaux sont presque complètement hydrogénés avec le catalyseur d'Adams (Appelqvist, 1972). Les lipides individuels de chaque classe sont purs à environ 99%, jugé par chromatographie sur couche mince (voir § 3.4.2 3<sup>ème</sup> Partie).

### 3.2 Préparation des liposomes

#### 3.2.1 Liposomes pour les mesures fluorimétriques

Pour les mesures fluorimétriques, les vésicules sont préparées selon la méthode de l'injection éthanolique, modifiée par Kremer *et al.* (1977b). Des solutions stock de DMPC, DPPC, DSPC, MGDG et DGDG (5 mM dans l'éthanol) sont mélangées avec la Chl *a* de façon à obtenir, dans les expériences de routine, un rapport molaire lipides/Chl *a* égal à 50. Ces mélanges sont injectés dans une solution MOPS/KOH 10 mM, pH 7.5 à 4 °C pour la DMPC et à température ambiante pour les autres lipides. La concentration finale en lipide est généralement de 33 µM. Dans certains cas, du cholestérol est mélangé aux lipides (rapport molaire lipide/cholestérol = 5) avant l'injection. De l'alcool benzylique (AB), de l'atrazine ou du DCMU sont ajoutés à la suspension de vésicules comme indiqué dans la légende des figures.

#### 3.2.2 Liposomes pour les mesures turbidimétriques et de partition

Pour les mesures de turbidimétrie et de partition, les vésicules sont préparées par injection rapide (Batzri & Korn, 1973) des lipides en solution dans l'éthanol (20 mM) dans un tampon MOPS/KOH, pH 7.5 à une température supérieure de 10°C à la température de transition respective des différents lipides. La suspension de vésicules est ensuite dialysée pendant une nuit, à température ambiante, contre la même solution tampon. Dans ce cas, la concentration finale de lipide est généralement de 0.5 mM et celle des herbicides de 0.2 mM.

#### 3.2.3 Liposomes pour les mesures de perméabilité

La technique reprend la précédente, mais on aura pris soin d'ajouter 0.5 mM d'ascorbate de Na<sub>2</sub> à la solution tampon (voir explication plus loin). On soumettra les vésicules de DPPC pendant deux heures à une température supérieure de 10°C à la température de transition de phase de ce lipide, soit env. 50 °C (= "annealing"). Une dialyse suivra pendant 72 h à température ambiante. L'incubation des vésicules avec du cytochrome *c* (cyt *c* = 0.1 mM), en excès par rapport à l'ascorbate dans les SUV, sera effectuée à 4 °C à l'obscurité pendant 24 h (voir explication plus loin).

*nb:* Les trois méthodes produisent de petites vésicules unilamellaires (SUV) de taille homogène (diamètre = entre 20 et 40 nm).

### Mesure de la perméabilité:

La perméabilité membranaire des liposomes à l'ascorbate est mesurée par réduction progressive du cyt c en solution dans la phase aqueuse contenant les liposomes. La réaction est mesurée avec un spectrophotomètre Aminco DW-2a réglé en mode "dual" dont la longueur d'analyse est de 550 nm et celle de référence de 540 nm (fente  $\pm 1.0$  nm). Après un scan de chauffage et un de refroidissement de la suspension liposomale, on prendra soin d'ajouter 0.1% de Triton TX-100 à la solution pour contrôler le niveau de réduction maximal du cyt c.

### 3.3 Comportement thermotropique des liposomes

Les mesures de fluorescence sont effectuées dans un fluorimètre Bausch & Lomb modifié de manière artisanale. La technique reprend celle décrite par (Lee, 1975a). Les échantillons sont continuellement agités pendant la période de chauffage (1 °C/min) et la température est directement mesurée dans la cuvette par un thermomètre digital. La Chl a, contenue dans des liposomes en suspension, est excitée à  $440 \pm 2.5$  nm et l'intensité de la fluorescence émise par cette sonde est enregistrée à  $680 \pm 10$  nm. Un obturateur mécanique empêche toute lumière d'exciter l'échantillon entre les lectures, de façon à minimiser la photodégradation de la Chl a.

La turbidité est mesurée avec un spectrophotomètre Aminco DW-2a réglé en mode "split beam" à  $436 \pm 3$  nm (Avramovic-Zikic & Colbow, 1978). Le contenu de la cuvette, sous agitation constante, est chauffé (1 °C/min) ou refroidi (2 °C/min). La température est enregistrée directement dans la cuvette à l'aide d'un thermomètre digital dont la sortie alimente le "jack X-axis" du spectrophotomètre à enregistrement X-Y.

A partir des enregistrements fluorimétriques, la valeur de la température de transition de phase des lipides ( $T_c$ ) est, dans la plupart des cas, déterminée à la fin de l'augmentation de fluorescence (Fig. 4). Pourtant, lorsque l'aplatissement des courbes rend la détermination de ce point de "rupture" difficile, la courbe est décomposée en deux portions linéaires, dont l'intersection permet la lecture de  $T_c$ . Pour les courbes turbidimétriques, les valeurs  $T_c$  sont déterminées au point d'inflexion des courbes.

### 3.4 Détermination des coefficients de partition des herbicides

La pénétration des herbicides dans la phase lipidique des vésicules est déterminée de la manière suivante: Deux cellules de verre en forme de "L" sont munies à chaque extrémité d'un pas de vis qui permet de relier les deux cellules en disposant entre elles une membrane de dialyse (cut-off 6000-8000), voir Fig. 2. L'appareillage ainsi constitué comprend deux cellules (a et b). La surface de dialyse disponible est de 2.5 cm<sup>2</sup>. Après introduction de 10 ml du milieu désiré dans chacun des compartiments (voir plus bas), l'orifice supérieur de chaque cellule est fermé et l'appareillage entier est immergé dans un bain agité et thermostaté à 50 °C pour les vésicules de DPPC et de DPPC/cholestérol et à 60 °C pour

les vésicules constituées des lipides thylacoidaux saturés. Le premier appareillage contient l'herbicide en (a) et une solution tampon en (b) seulement (Fig.2). Le second appareillage contient l'herbicide en (a) et des vésicules lipidiques en (b). Le troisième, contient l'herbicide et les vésicules lipidiques en (a) et la solution tampon en (b). La dialyse progressive de l'herbicide dans le compartiment (b) est suivie, jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint (env. 24 h), en mesurant l'absorbance d'alliquots prélevés dans les deux compartiments (0.1 ml prélevés et dilués dans 0.9 ml d'éthanol), à 220 et 250 nm pour l'atrazine et le DCMU, respectivement. La concentration d'herbicide dans les deux compartiments. (a) et (b) est déterminée à partir de courbes de calibration. La quantité d'herbicide associée aux vésicules lipidiques est donnée par la moitié de la différence des quantités entre les deux compartiments. Les coefficients de partition sont exprimés en tant que  $K_p$  = [la concentration d'herbicide dans la phase lipidique / la concentration d'herbicide libre dans le milieu aqueux extérieur]. Le volume de la phase lipidique des vésicules est calculé à partir des valeurs données par Batzri et Korn (1973), correspond à 0.7422 ml/mmol de lipide. Nous n'avons pas tenu compte de la faible différence de volume spécifique des lipides aux différentes températures (Quinn, 1984).

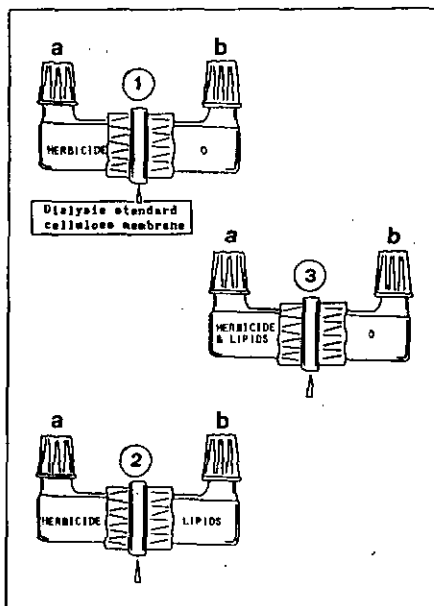


Fig. 2: Appareillage permettant la mesure des coefficients de partage des herbicides dans des liposomes. Les appareillages sont plongés dans un bain agité et thermostaté à différentes températures selon la nature des lipides. Pour plus d'information, voir 3.2.2 et 3.4.

## 4 RESULTATS ET DISCUSSIONS

4.1 Quelques problèmes d'ordre méthodologique

Les vésicules unilamellaires sont les systèmes membranaires les mieux connus. Le compartiment aqueux bien délimité par une seule bicouche permet leur utilisation dans plusieurs domaines. On considère généralement les vésicules ayant un diamètre  $< 50$  nm comme des SUV et  $> 50$  nm comme des LUV.

## 4.1.1 Les liposomes contenant une sonde

En 1973, Colbow suggère que la Chl *a* est une sonde sensible capable de refléter les changements d'état de la DPPC en fonction de la température, ce que Lee (1975a) associe au changement de fluidité moyen de l'ensemble de la bicouche membranaire.

Nous avons incorporé de la Chl *a* dans des liposomes que nous avons chauffés à des températures plus ou moins élevées selon les lipides utilisés. Avant d'étudier le comportement thermotropique de divers liposomes avec ou sans agent pesticide, nous avons recherché les conditions adéquates à notre étude: la qualité de la sonde, le rapport lipide/Chl *a*, la concentration du lipide dans l'éthanol et les conditions d'injection.

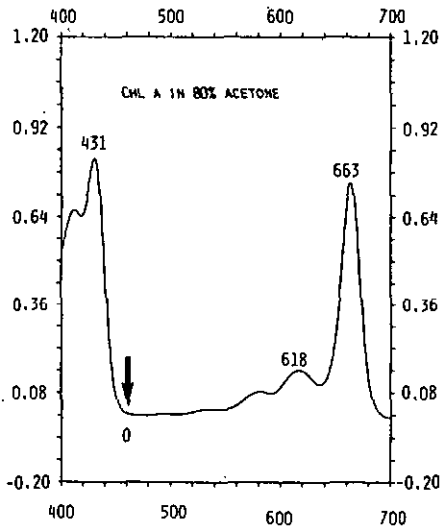


Fig. 3: Spectre d'absorption de la chlorophylle *a* en solution dans de l'acétone 80%. Ce spectre a été obtenu avec un spectrophotomètre Perkin-Elmer Lambda 5.

La Chl *a* est toujours extraite de feuilles fraîches d'Épinard (§ 3.1). Afin d'éviter au maximum les processus d'allomérisation, de phéophytinisation (Colbow, 1973; Nicholls et al., 1974), la Chl *a* est conservée dans l'acétone, à l'obscurité, à -20 °C et sous atmosphère d'azote. La Fig. 3 présente le spectre d'absorption de la Chl *a* en solution dans l'acétone 80%. On observe deux pics importants, un à 431 et l'autre à 663 nm, ainsi qu'un troisième pic plus petit à 618 nm. A 460 nm, l'absorbance de la Chl *a* est nulle et à 431 nm, le pic est environ 10% plus élevé que celui situé à 663 nm. On observe aussi un "épaulement" autour de 410 nm. Lorsque la Chl *a* se détériore (vieillessement, photodestruction, etc...), nous observons plusieurs changements (résultats non montrés) et notamment, une disparition quasi totale de l'épaulement à 410 nm, une augmentation du pic à 431 nm, un aplatissement des pics à 618 et 663 nm et un déplacement de tous les pics vers les courtes longueurs d'ondes ("shift" d'env. 5 nm). En plus des précautions prises lors du stockage de la Chl *a*, nous n'avons jamais conservé celle-ci au-delà de deux semaines, afin de toujours travailler avec un maximum de rendement de la fluorescence. A plusieurs reprises la Chl *a* a été utilisée comme sonde dans différents types de liposomes (Chapman & Fast, 1968; Troster et al. 1970; Nicholls et al. 1974; Lee, 1975a et b; Murata & Sato, 1978; Katz, 1979; Fulford & Peel, 1980; Hoshina, 1981, 1983; Brasseur et al. 1984; Bialek-Bylka & Wrobel, 1986; Morgan et al. 1987). La préparation des liposomes par la méthode de l'injection a été utilisée maintes fois (Batzri & Korn, 1973; Kremer et al. 1977b; Genz & Holzwarth, 1986a; Genz et al. 1986b) mais à notre connaissance, nous sommes les premiers à avoir combiné ces deux techniques.

La Fig. 4 présente le changement d'intensité de la fluorescence à 680 nm émise par la Chl *a* en fonction de l'augmentation de la température entre 20 et 45°C. La Chl *a* a été incorporée dans des liposomes de DPPC, dans un rapport molaire DPPC/Chl *a* = 50. On observe que la fluorescence s'accroît progressivement jusqu'à 32°C, puis tend à se stabiliser jusqu'à 36°C pour augmenter à nouveau de manière plus marquée. Entre 38 et 41°C, la variation d'intensité de la fluorescence est maximale et c'est entre 41 et 42 °C qu'elle atteint un plateau stable sur plusieurs degrés. Cependant, si la température continue à monter ou si elle est maintenue plusieurs minutes au dessus de 42 °C, l'intensité de la fluorescence baisse légèrement, suite probablement, à une thermo- et/ou photodestruction.

Ainsi, il est possible de décomposer le comportement thermotropique de la DPPC en quatre événements, qui correspondent au changement d'état de ce lipide:

- |               |   |
|---------------|---|
| 1) T < 20 °C  | : état cristallin ou gel (également nommée L <sub>β</sub> '') |
| 2) env. 32 °C | : prétransition (P <sub>1</sub> '')                           |
| 3) 41 - 42 °C | : transition  |
| 4) T > 42 °C  | : état liquide cristallin (L <sub>α</sub> '')                 |

Pour une autre nomenclature, voir Houslay & Stanley (1982); Tilcock, (1986); Janiak et al. (1976).

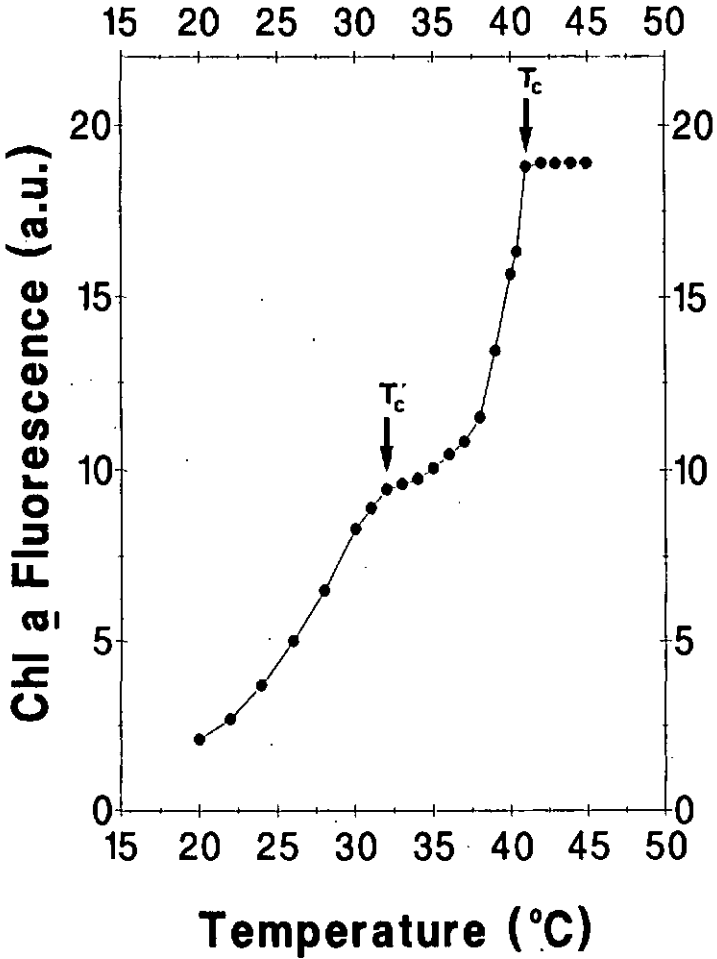


Fig. 4: Courbe de changement d'intensité de la fluorescence émise par la Chl *a* en fonction de l'augmentation de température. La Chl *a* est incluse dans des liposomes de DPPC (0.033 mM) en solution (MOPS 10 mM, pH 7.5), DPPC/Chl *a* = 50 mol/mol.  $T'_c$  = 32°C,  $T_c$  = 41.5°C. Pour plus d'informations, voir 3.2.1 et 3.3.

En effet, il est clairement établi que la DPPC se trouve dans un état gel aux températures inférieures à 20 °C (Hinz & Sturtevant, 1972; Lee, 1977, 1983; Lee et al., 1986; Wiener et al., 1988), qu'elle passe par un changement de structure à la température de prétransition ( $T'_0$ ) (Hinz & Sturtevant, 1972; Lee, 1977, 1983; Houslay & Stanley, 1982) et par un changement d'état à la température de transition ( $T_0$ ). La  $T'_0$  est très labile mais est généralement située 8 °C en dessous de la température de transition (Hinz & Sturtevant, 1972). Elle correspond à l'apparition de structure en vaguelettes à la surface des liposomes (Photo 1). Cette structure en vaguelettes est associée au passage des chaînes d'acides gras d'une position oblique (env. 30°) à une position perpendiculaire par rapport à la surface de la bicouche (Lee, 1983; Houslay & Stanley, 1982; Quinn, 1984). Cette inclinaison de 30° permet aux chaînes d'acides gras de remplir les espaces créés par les gros groupements des têtes polaires (McIntosh, 1980). La  $T_0$  correspond à un changement d'état associé à une augmentation de liberté conformationnelle des chaînes d'acides gras, ces dernières "fondent" en quelque sorte (Lee, 1983). Pour la DPPC, la  $T_0$  se situe entre 41 et 42 °C, selon les auteurs (Hinz & Sturtevant, 1972; Lee, 1977, 1983; Lee et al., 1986; MacDonald, 1978; O'Leary et al., 1986; Wiener et al., 1988).

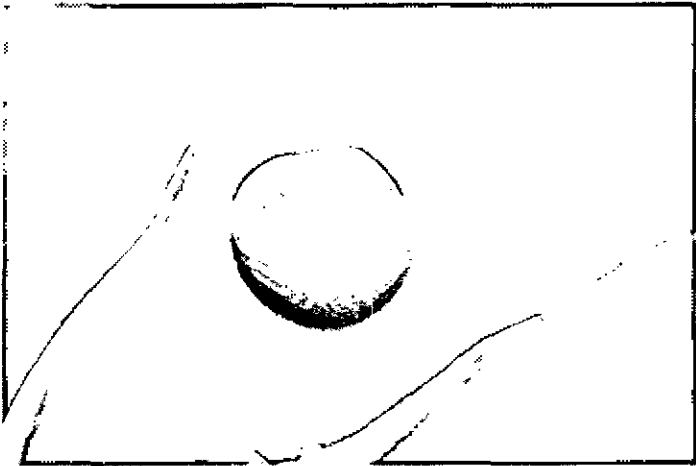


Photo 1: Microphoto électronique d'un liposome suspendu dans du MOPS 10 mM, pH 7.5 à 37 °C. Les liposomes ont été préparés par la méthode modifiée de Kremer et al. (1977). La suspension a été tenue 15 min à 37°C avant d'être plongée dans l'azote. L'échantillon gelé est alors fracturé dans un appareil de cryodécapage "Polaron". L'ombrage est obtenu par dépôt de platine/carbone immédiatement après fracture de l'échantillon. L'empreinte est ensuite lavée avec du chloroforme/méthanol (2:1, vol/vol) et est examinée dans un microscope électronique Phillips EM 301 (les liposomes ont été préparés par nos soins et la microphoto a été prise dans le laboratoire du Dr. W.P. Williams du King's College, London).

Nous venons de voir que les lipides passent d'un état cristallin à un état liquide cristallin lorsque la température dépasse la  $T_c$ . En fait, la valeur de la  $T_c$  dépend de plusieurs facteurs dont: la longueur des chaînes d'acides gras, la présence de doubles liaisons en position *cis* et de leur localisation dans la chaîne ainsi que de la nature des têtes polaires. Il n'est pas étonnant que la  $T_c$  dépende du nombre de carbones des chaînes acylées, puisque plus ce nombre est grand, plus les forces d'attraction de van der Waals sont nombreuses, tendant à stabiliser la phase gel à haute densité (= phase "ordonnée") par rapport à la phase liquide cristalline à basse densité (= phase "désordonnée"). Une double liaison empêche les interactions proches entre les chaînes d'acides gras, interactions normalement rencontrées dans l'état gel et une double liaison située au milieu de la chaîne est la plus efficace pour diminuer ces interactions.

Le phénomène par lequel la Chl *a* est à même de rendre compte des changements d'état des lipides réside dans la propriété qu'a cette sonde de se répartir dans la bicouche lipidique sous deux, voir trois formes, grâce à son groupement phytol: formes monomérique, dimérique et multimerique. Or, il est reconnu que la Chl *a* ne peut fluorescer que lorsqu'elle se trouve sous la forme monomérique (Lee, 1975a; Lee, 1975b). Cette dernière forme se rencontre lorsque les lipides sont à l'état gel et/ou à l'état liquide cristallin mais lorsque la température augmente, une plus grande proportion de Chl *a* monomérique apparaît au détriment des formes dimérique et polymérique (Hoshina, 1983), stimulant ainsi l'intensité de fluorescence.

Nous fondant sur le principe que la Chl *a* est parfaitement soluble dans un mélange de lipides et d'éthanol et qu'elle se répartit uniformément dans toute la partie membranaire des liposomes (Bialek-Bylka & Wrobel, 1986), nous avons déterminé le rapport lip/Chl *a* adéquat à notre étude. Nous avons procédé en deux temps:

- 1) La concentration de DPPC est constante (33  $\mu\text{M}$ ) et la concentration de Chl *a* varie (Fig. 5).
- 2) La concentration de Chl *a* est constante (0.67  $\mu\text{M}$ ) et la concentration de DPPC varie (Fig. 6).

La Fig. 5 présente l'augmentation d'intensité de la fluorescence en fonction de l'augmentation de la température (21-44 °C) pour quatre rapports DPPC/Chl *a* différents. Si, pour un rapport DPPC/Chl *a* peu élevé on observe difficilement une  $T_c$ , on remarque néanmoins une  $T_c$  bien définie et à forte amplitude ( $F_{T_{c+10^\circ}}/F_{T_{c-10^\circ}} > 10$ ) (Fig. 5A).

n.b. afin de pouvoir comparer les résultats entre eux, nous avons standardisé les variations de fluorescence en fonction de la température, par rapport au niveau de fluorescence à 21°C. Ceci est valable pour les Figs 5-8.

En fait, la prétransition n'apparaît (Figs 5B-D) que si les chaînes d'acides gras ont adopté une position oblique par rapport au plan de la bicouche membranaire, leur permettant de remplir les espaces créés par les gros groupements des têtes polaires. Par contre, cela ne semble plus être le cas en présence d'une quantité importante de Chl *a* (rapport OPPC/Chl *a* bas), suggérant que cette molécule est à même de remplir ces espaces et par là-même d'abolir toute prétransition. Peut-être la nature de la sonde ne permet-elle pas de la mettre en évidence dans ces conditions. Cependant, si on diminue la quantité de Chl *a*, on constate une baisse progressive d'amplitude de la fluorescence et l'apparition d'une prétransition de plus en plus marquée (Figs 5B-D), quand bien même le passage de l'état gel à l'état liquide cristallin soit plus difficilement perceptible dans ces conditions et avec notre appareillage. Nous avons aussi travaillé avec des rapports lipide/Chl *a* plus élevés, jusqu'à 800 (résultats non montrés); cependant, il devient difficile, dans ces conditions, de détecter un signal de fluorescence dans l'important bruit de fond de l'appareillage. Pour les quatre rapports lipide/Chl *a* de la Fig. 5, il est possible de déterminer une  $T_c$  située entre 40 et 42 °C et une  $T_c'$  labile située entre 27 et 32 °C. On observe que la  $T_c$  a tendance à baisser lorsque le rapport DPPC/Chl *a* diminue, ce qui suggère qu'une quantité élevée de Chl *a* abaisse la température à laquelle la OPPC opère sa transition de phase.

La Fig. 6 présente la variation d'intensité de la fluorescence en fonction de l'augmentation de température (21-44°C) pour quatre rapports OPPC/Chl *a* différents. Dans les quatre cas, la concentration en Chl *a* est identique (0.67  $\mu$ M). On observe une disparition de la  $T_c'$  lorsque le rapport lipide/sonde décroît (Fig. 6D --> A) et une  $T_c$  de moins en moins marquée lorsque ce rapport croît. Le fait que le niveau final de la fluorescence relative ne varie pas significativement pour des rapports DPPC/Chl *a* situés entre 50 et 175 (Fig. 5B et 6B-D), suggère que la quantité de Chl *a* qui passe sous forme monomérique entre l'état gel et l'état liquide cristallin ne varie guère. Par contre, aux températures supérieures à la  $T_c$ , les liposomes aux rapports lipide/Chl *a*  $\leq$  50 (Figs 5A et 6A) présentent des fluorescences relatives environ deux fois plus grande que des liposomes aux rapports lipide/Chl *a*  $\geq$  100. Ceci suggère que des interactions s'établissent entre les molécules de lipide et celles de la sonde, lorsque la proportion de Chl *a* augmente. Il se peut que de telles interactions favorisent la présence de la forme monomérique de la Chl *a* lorsque les lipides sont à l'état liquide cristallin. On notera dans la Fig. 6, que la  $T_c'$  se situe à 30-33 °C et que la  $T_c$  augmente lorsque le rapport lipide/Chl *a* augmente (comparer les Figs 6A à 0).

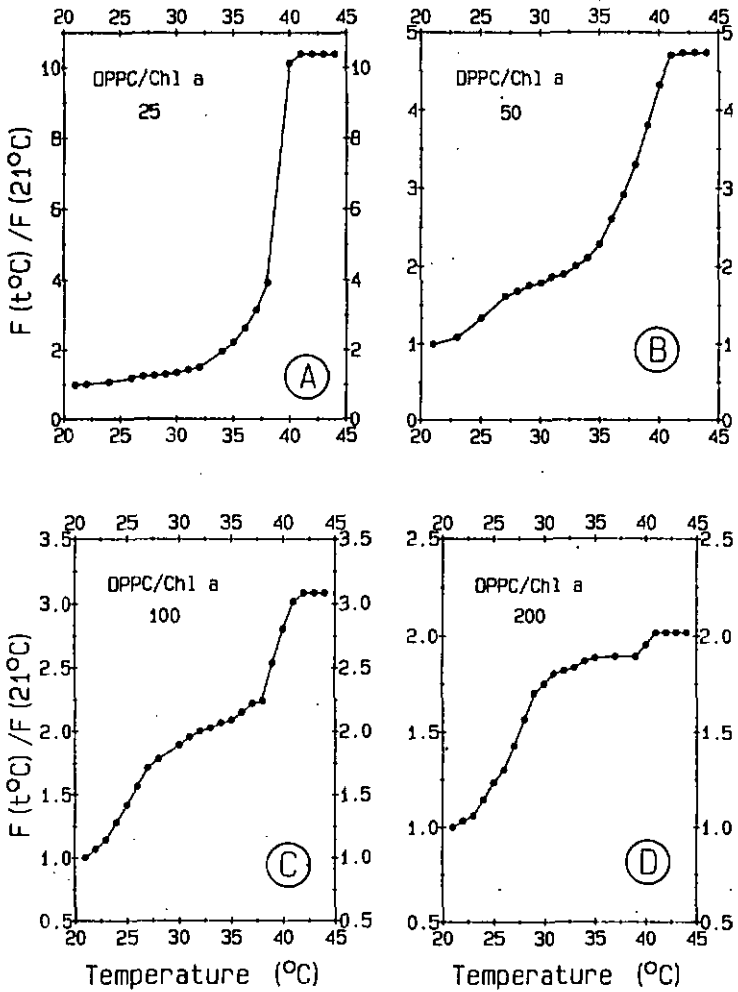


Fig. 5: Courbes d'intensité de fluorescence en fonction de la température, voir la légende de la Fig. 4 mais pour des rapports DPPC/Chl a (mol/mol) différents: (A) 25, (B) 50, (C) 100 et (D) 200. La concentration de DPPC est la même pour les quatre courbes, soit  $33.3 \mu\text{M}$ , alors que celle de la Chl a varie.

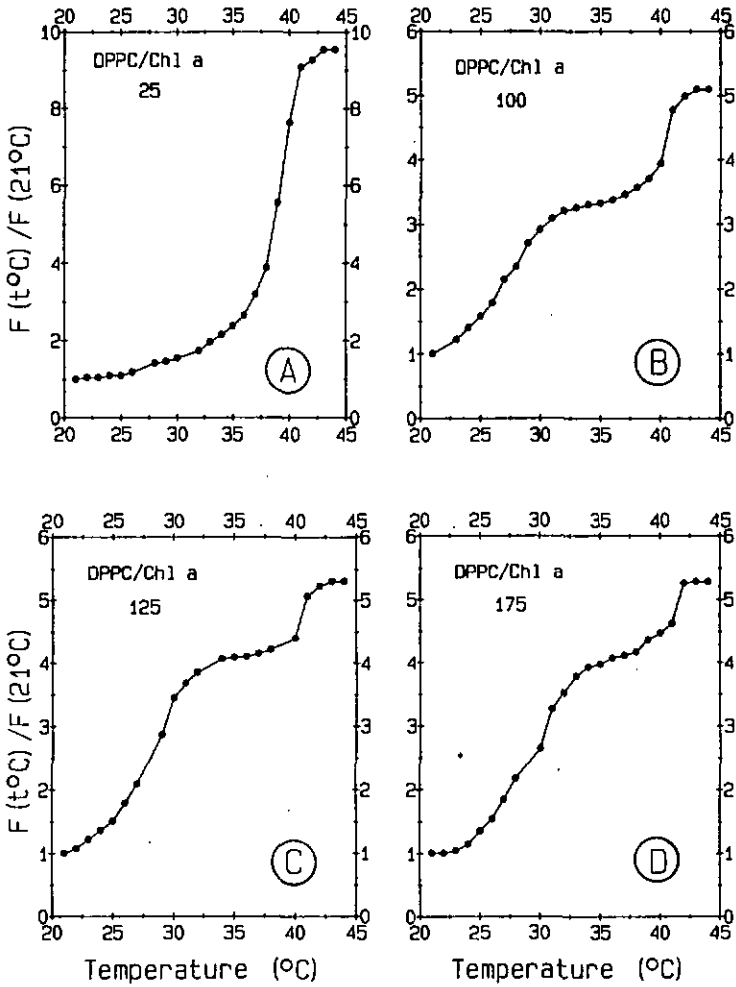


Fig. 6: Courbes d'intensité de fluorescence en fonction de la température, voir la légende de la Fig. 4 mais pour des rapports DPPC/Chl *a* (mol/mol) différents: (A) 25, (B) 100, (C) 125 et (D) 175. La concentration de la Chl *a* est la même pour les quatre courbes, soit  $0.67 \mu\text{M}$ , alors que celle de la DPPC varie.

Il ressort de ces 8 courbes de fluorescence (Figs 5 et 6) qu'il est possible, selon les conditions, d'amplifier soit le phénomène de la pré-transition, soit celui de la transition. Cependant, nous devons nous restreindre à un domaine d'intensité de fluorescence qui est limité, aux faibles concentrations de Chl *a* par le pouvoir de détection de notre fluorimètre et, aux fortes concentrations de Chl *a*, par un "quenching" de la fluorescence (Lee, 1975a). De plus, on a constaté que la  $T'_c$  est labile et fortement dépendante du rapport lipide/Chl *a*, contrairement à la  $T_c$ . Nous avons donc choisi, pour les expériences de "screening", de mesurer le changement d'intensité de fluorescence de la Chl *a* dans différents lipides, le rapport lipide/Chl *a* étant le plus souvent de 50 (Fig. 5B).

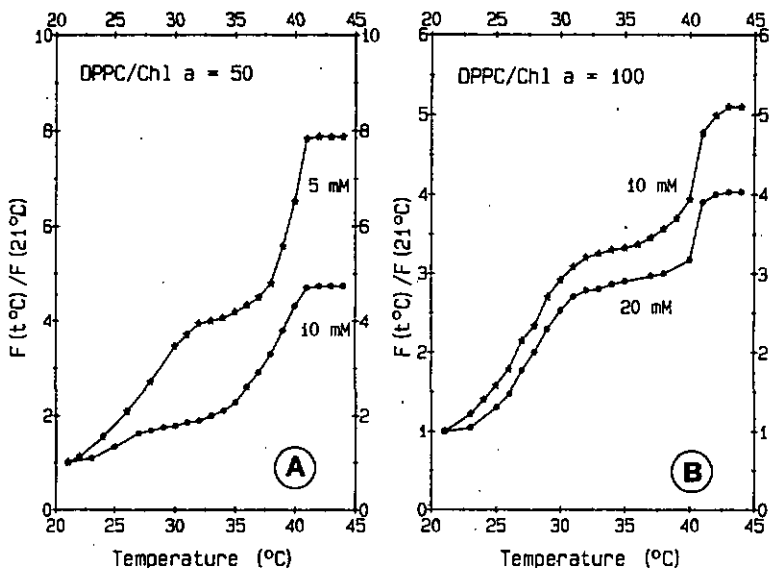


Fig. 7: Courbes d'intensité de la fluorescence en fonction de la température, voir la légende de la Fig. 4. (A) le rapport DPPC/Chl *a* est de 50 (mol/mol), la concentration de la DPPC dans l'éthanol (avant l'injection) est soit de 5 mM (\*), soit de 10 mM (·). (B) le rapport DPPC/Chl *a* est de 100 (mol/mol), la concentration de la DPPC dans l'éthanol (avant l'injection) est soit de 10 mM (\*), soit de 20 mM (·).

Parmi les paramètres qui déterminent le diamètre des vésicules lors de leur confection par la méthode de l'injection, on peut considérer: la vitesse d'injection, la vitesse d'agitation de la solution dans laquelle l'injection est effectuée, le volume de la phase aqueuse, la taille et la forme du récipient de "réaction", la concentration du lipide dans l'alcool (Kremer et al.1977b), etc. De tous ces paramètres, il semble que ce soit la concentration du lipide dans l'éthanol qui soit déterminante (Kremer et al.1977b).

La Fig. 7A et B présente pour deux rapports lipide/Chl *a* différents, les changements d'intensité de fluorescence en fonction de l'augmentation de température pour des liposomes préparés à partir de deux concentrations différentes de lipide dans l'éthanol. Il apparaît que l'amplitude de fluorescence est sensiblement plus petite lorsque la concentration de DPPC dans l'éthanol est plus élevée (Fig. 7A et B). Or, selon Kremer et al. (1977b) le diamètre moyen des liposomes augmente proportionnellement avec la concentration des lipides dans l'éthanol. Ceci suggère que la quantité de Chl *a* qui passe sous forme monomérique entre la phase liquide cristalline et la phase gel est plus importante lorsque les liposomes sont petits, suite probablement à de fortes interactions entre les molécules de chl *a* et de lipide qui désagrègent les amas de chl *a*. Il se pourrait donc que les petits liposomes, qui sont soumis à de fortes contraintes dues à leur grande courbure (Tanford, 1979; White, 1980; Cornell et al.1980; Eigenberg & Chan, 1980), privilégient la forme monomérique de la Chl *a*. Par ailleurs, pour une même concentration de lipide dans l'éthanol (10 mM), mais à des rapports lipide/Chl *a* différents (50 et 100, Fig. 7A et B), on observe à nouveau une abolition de la prétransition lorsque le rapport lipide/Chl *a* diminue. Nous avons choisi une concentration de lipide dans l'éthanol de 5 mM lors de l'étude de l'effet des herbicides sur les liposomes. Cette concentration, relativement petite, présente les avantages de favoriser la dispersion des lipides dans le mélange alcool-eau lors de l'injection et d'obtenir une bonne homogénéité dans la taille des vésicules (Kremer et al.1977b). D'autre part, lorsque le lipide est en faible concentration dans l'alcool, il est possible d'adapter une vitesse d'injection lente sans qu'apparaissent des agrégats lipidiques (agrégats visibles à l'oeil nu lors de l'injection lente d'une solution éthanolique plus concentrée en lipide). Par ailleurs, il a été reconnu que l'alcool (dans ces conditions < 0.1x) ne perturbe en rien le comportement thermotropique des liposomes (Batri & Korn, 1973; Kremer et al.1977b).

Considérons maintenant la vitesse d'injection de la solution éthanolique de lipide dans la phase aqueuse (Fig. B): Chez les liposomes qui n'ont pas subi "d'annealing" (préchauffage), on observe une disparition de la prétransition lors d'une injection rapide (1-1.5 ml/min) et la  $T_c$  est plus difficilement déterminable. Ces deux observations sont probablement attribuables à une cohésion non optimale entre les molécules de lipide. En effet, il est reconnu que le changement d'état (gel --> liquide cristallin) sur une plage restreinte de température est associé à une coopération maximale entre les molécules de lipides (Hinz & Sturtevant, 1972; Van Dijk et al.1978).

Nous avons comparé, pour les deux vitesses d'injection, les changements d'intensité de fluorescence en fonction de la température pour des liposomes préparés par injection, i) à température ambiante et qui ont été chauffés lentement (1 °C/min) jusqu'à 50 °C (slow "annealing") et ii) injectés directement dans une solution à 50 °C (fast "annealing"). Dans les deux cas, nous avons travaillé à l'obscurité. Après une heure à 50 °C, les suspensions liposomales sont refroidies à température ambiante avant d'effectuer les mesures de fluorescence (Fig. 8). On observe que les deux types d'"annealing" atténuent significativement l'amplitude de fluorescence, abolissent la prétransition et abaissent la température de transition (Fig. 8A et B). En effet, dans le cas "normal" (sans préchauffage) la  $T_c = 41$  °C, dans le cas d'un "annealing" lent  $T_c = 40$  °C et dans le cas d'un "annealing" rapide  $T_c < 39$  °C (Fig. 8A).

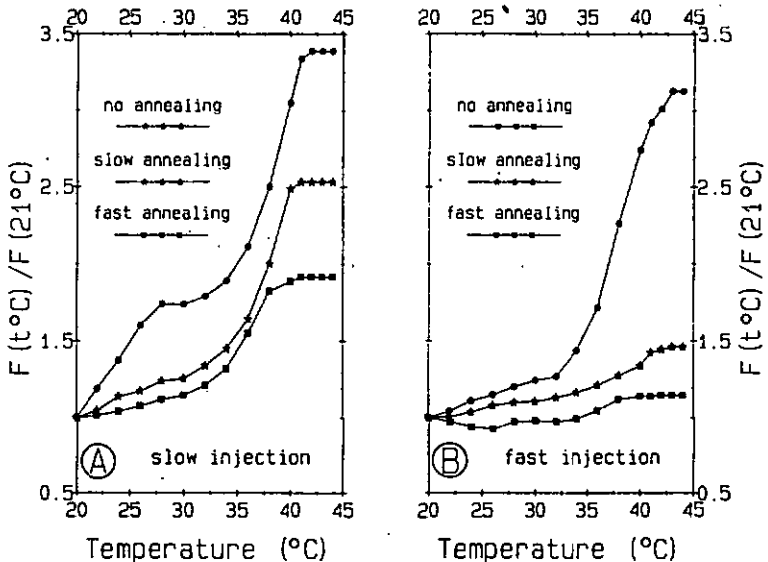


Fig. 8: Courbes d'intensité de la fluorescence en fonction de la température, voir la légende de la Fig. 4. Le rapport DPPC/Chl *a* est de 50 (mol/mol), la concentration de la DPPC dans l'éthanol (avant l'injection) est de 5 mM. (A) Les liposomes sont obtenus par la méthode de l'injection lente suivie d'un préchauffage lent (\*) ou rapide (■), ou encore sans préchauffage (○). (B) Les liposomes sont obtenus par la méthode de l'injection rapide suivie d'un préchauffage lent (\*) ou rapide (■), ou encore sans préchauffage (○).

Lorsque l'injection est effectuée rapidement et que les liposomes ont subi un "annealing" (lent ou rapide), la détermination de la  $T_c$  devient hasardeuse. De plus, un "annealing" abaisse la  $T_c$  et diminue considérablement l'amplitude d'intensité de la fluorescence, un "annealing" rapide étant en ce sens plus efficace qu'un "annealing" lent. Selon Genz & Holzwarth (1986a), un abaissement de la  $T_c$  est associé, outre à la présence d'impuretés dans la bicouche, à la forte courbure de celle-ci chez les petites vésicules, ce qui suggère qu'un "annealing" peut provoquer une diminution de la taille des liposomes. Cependant, selon Lawaczeck *et al.* (1975), un "annealing" est nécessaire pour stabiliser les vésicules en suspension ainsi que pour les rendre imperméables aux ions. En fait, il semblerait qu'un préchauffage permette de chasser l'eau en excès et d'ordonner les molécules de lipide au sein de la bicouche membranaire (Avramovic-Zikic & Colbow, 1978). Or, nous devons constater qu'en présence de Chl *a* et en préparant les liposomes par la méthode de l'injection, cette procédure devient désavantageuse.

Enfin, il nous paraît indispensable de contrôler la réversibilité du phénomène de changement d'état des lipides. Nous avons donc préparé des liposomes (DPPC/Chl *a* = 75) que nous avons chauffé (1 °C/min) entre 22 et 42 °C, puis refroidis (1 °C/min) de 42 à 22 °C. Nous observons (Fig. 9) une grande similitude entre les deux courbes. Toutefois, une légère hystérèse apparaît entre le signal fluorimétrique de chauffage et celui de refroidissement, mais de manière constante comme l'a souligné Lee (1975b). En effet, nous avons répété le cycle de chauffage-refroidissement trois fois avec la même suspension de liposomes (résultats non montrés) et avons remarqué, à chaque fois, un léger déplacement de la courbe de fluorescence vers les hautes températures lors du refroidissement par rapport à celle enregistrée lors du chauffage. De plus, il est apparu que l'intensité de fluorescence baisse légèrement à chaque cycle, vraisemblablement suite à une photo- et/ou thermodestruction de la Chl *a*. Cette réversibilité suggère que pratiquement toutes les molécules de Chl *a* restent intégrées à la bicouche membranaire lors du chauffage des liposomes à des températures supérieures à  $T_c$ , ce qui est en accord avec Lee (1975a). Il est reconnu que le phénomène d'hystérèse est en étroite relation avec la vitesse de passage de l'état gel à l'état liquide cristallin ou vice versa. Effectivement, si nous chauffons une suspension de liposomes relativement lentement (environ 1 °C/min), mais que nous la refroidissons rapidement, une hystérèse beaucoup plus marquée apparaît entre les deux courbes (résultats non montrés).

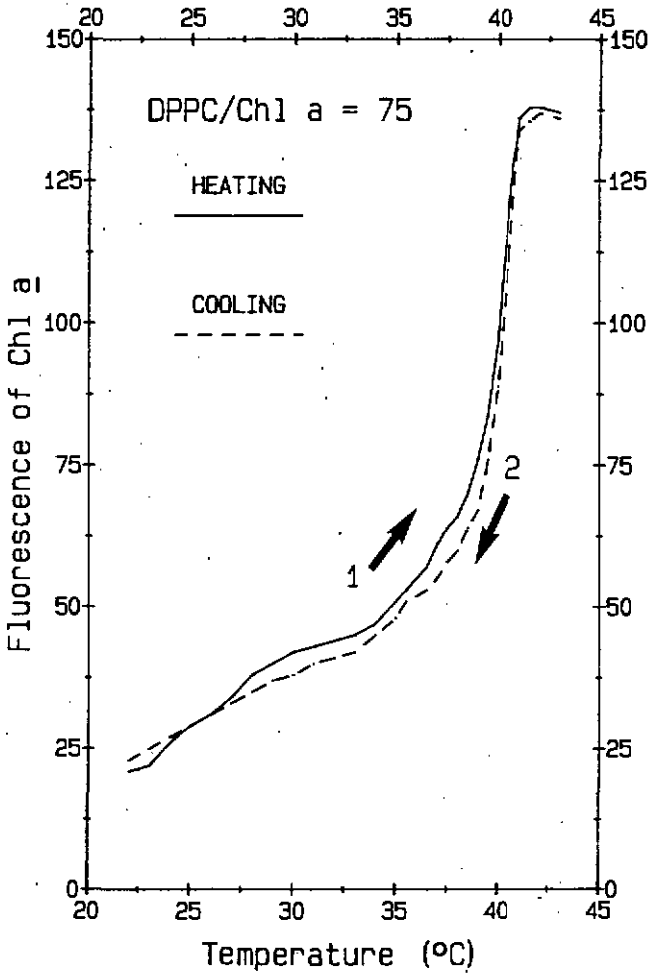


Fig. 9: Courbe de changement d'intensité de la fluorescence émise par la Chl a en fonction de l'augmentation de température. Les conditions sont les mêmes que celles décrites pour la Fig. 4 mais le rapport DPPC/Chl a est de 75 (mol/mol). La solution liposomale a d'abord été chauffée (scan 1), puis refroidie (scan 2).

## 4.1.2 Les liposomes dépourvus de sonde

Il nous intéressait également de travailler avec des liposomes exempts de Chl *a*, afin de rechercher si la présence de cette sonde modifie le comportement thermotrope des liposomes. La technique de mesure de la turbidité permet ce genre d'étude, mais exige une concentration lipidique supérieure (0.25-0.5 mM) à celle utilisée dans les expériences fluorimétriques. Nous avons préparé des liposomes selon Kręmer *et al.* (1977b), que nous avons chauffés entre 20 et 45 °C en mesurant le changement d'absorbance de la suspension à 436 nm (Chong & Colbow, 1976). La Fig. 10 présente ces mesures pour deux cycles de chauffage-refroidissement. Il apparaît que le premier chauffage (1 °C/min) provoque une forte baisse d'absorbance centrée à 26-27 °C et une augmentation d'absorbance centrée à environ 39 °C. Lorsque la suspension est refroidie (1 °C/min), l'amplitude du changement d'absorbance ne dépasse guère 0.015 et l'allure de la courbe diffère significativement de la courbe de chauffage aux températures inférieures à 39 °C. Si un deuxième cycle de chauffage-refroidissement est imposé à la suspension liposomale ("annealing"), on constate que la forte baisse d'absorbance ( $A = 0.15$ ) enregistrée lors du premier chauffage est réduite à 0.01 et qu'elle est déplacée vers 25°C. Le changement d'absorbance de 39°C est déplacé vers 38.5°C sans que l'amplitude soit grandement modifiée (env. 30% plus petite). Si on refroidit à nouveau la suspension, on constate que la courbe se rapproche grandement de celle du premier refroidissement. Ainsi, dans les deux cycles chauffage-refroidissement, nous notons une hystérèse marquée de notre système. Plusieurs interprétations peuvent être émises quant aux origines de ce type de courbe et de cette hystérèse:

- 1) Une diminution de turbidité peut être associée à la pénétration de l'eau entre les bicouches de lipide dans un état gel (Abramson, 1970), à une hydratation dans la région des têtes polaires (Abramson, 1970) ou encore à l'événement de la prétransition. Dans tous les cas, elle est la conséquence d'une expansion latérale et d'un amincissement de la bicouche accompagné d'un changement de volume des liposomes (Antunes-Madeira *et al.* 1980).
- 2) Une augmentation de la turbidité peut être associée à une fusion de petites vésicules avec des vésicules de plus grande taille (Chong & Colbow, 1976; Kremer *et al.* 1977a; Avramovic-Zikic & Colbow, 1978); elle peut être également associée au changement de l'état gel à l'état liquide cristallin des lipides (Abramson, 1970).

Il se peut que la première chute d'absorbance irréversible (Fig. 10, courbes de chauffage) corresponde effectivement à une hydratation des têtes polaires et à la pénétration de molécules d'eau entre les couches de lipide à l'état gel (Kluge, 1983) et non pas au phénomène de la prétransition, qui est un événement réversible et discret par rapport à celui de la transition. Par contre, l'augmentation d'absorbance ne correspond vraisemblablement pas ou alors que dans une mesure réduite, au phénomène de fusion des vésicules. En effet, il y a souvent fusion lorsque les liposomes ont des tailles hétérogènes ou lorsqu'ils sont soumis aux ultrasons. Dans ce dernier cas, les liposomes sont très

"tendus" de part la forte courbure des sphères (Avramovic-Zikic & Colbow, 1978; Chong & Colbow, 1976; Kantor et al., 1977, Lawaczeck et al., 1975; van Dijck et al., 1978). De plus, s'il devait y avoir phénomène de fusion, celui-ci prendrait place préférentiellement à la  $T_m$  (Papahadjopoulos et al. 1976). Or, l'augmentation d'absorbance vers 39 °C est réversible, ce qui ne saurait être le cas lors de la fusion des vésicules. Aussi, nous pensons que cette augmentation d'absorbance est associée à la transition entre l'état gel et l'état liquide cristallin des lipides.

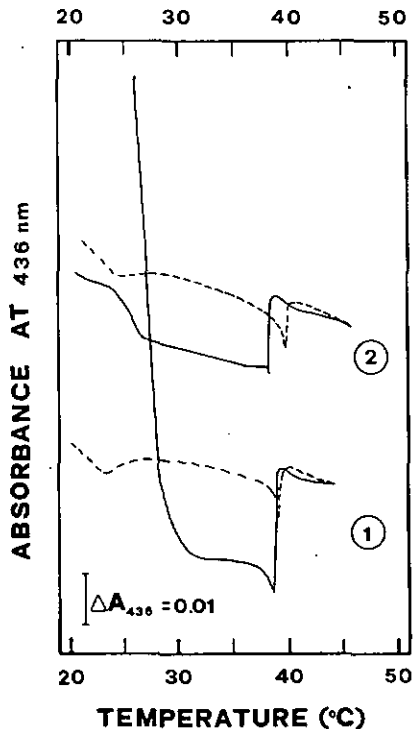


Fig. 10: Changement de turbidité d'une suspension de liposomes de DPPC (D.5 mM) dans du MOPS 10 mM, pH 7.5, en fonction de la température. Les liposomes ont été préparés par la méthode de l'injection rapide. La suspension a été chauffée (—) et refroidie (-----) une première fois (1), puis une seconde fois (2). La turbidité est mesurée dans un spectrophotomètre Aminco DW-2a en mode "split beam" à  $436 \pm 3$  nm.

Ainsi, les liposomes exempts de toute sonde et préparés par la méthode de l'injection ne semblent pas être stables. En effet, il existe une forte hystérèse du système entre les signaux de turbidité mesurés lors du chauffage des liposomes et ceux mesurés pendant leur refroidissement (Antunes-Madeira et al. 1980). De plus, le système n'est pas entièrement réversible (Fig. 10). Ceci suggère que la Chl *a* joue un rôle stabilisateur dans des liposomes préparés par cette technique, puisque lorsque cette sonde est présente, seule une très faible hystérèse apparaît (Fig. 9). Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons fabriqués des vésicules selon le même protocole mais en présence de Chl *a* (DPPC/Chl *a* = 50) et à la concentration de 0.5 mM de lipide, ce qui assure une turbidité suffisante de la suspension liposomale. Pour éviter une interférence entre les propriétés turbidimétriques des vésicules d'une part et d'absorbance de la Chl *a* d'autre part, nous avons choisi une longueur d'onde d'analyse à laquelle cette sonde n'absorbe pas, soit 480 nm (Fig. 3). Quoi qu'il en soit, nous avons observé que des liposomes avec sonde et dont la turbidité est mesurée soit à 436 nm, soit à 480 nm, présentent des "scans" quasiment identiques (résultats non montrés). Or, on peut supposer que des liposomes sans sonde, enregistrés à 436 ou 480 nm, présentent également des "scans" turbidimétriques semblables. La Fig. 11 montre que lors du chauffage de la suspension, une diminution relativement constante de turbidité apparaît entre 20 et 38 °C avec toutefois une légère baisse à partir de 32 °C. Par contre, entre 38 et 40 °C on assiste à une chute importante d'absorbance. Lors du refroidissement, entre 45 et 20 °C, on observe une variation d'absorbance qui suit assez fidèlement la trace turbidimétrique du "scan" précédent, confirmant ainsi une hystérèse de faible amplitude en présence de Chl *a* et par voie de conséquence, le rôle stabilisateur de cette sonde incorporée au sein des liposomes préparés par la méthode de l'injection. Par ailleurs, il semble que ce soit plutôt le groupement phytol de la Chl *a* qui stabilise la membrane car des liposomes de DPPC contenant 2 mol% de phytol se comportent d'une manière très proche de ceux contenant les molécules entières de Chl; ils présentent notamment une hystérèse réduite (résultats non montrés), similaire à celle rencontrée lors des mesures en DSC (Antunes-Madeira et al. 1980). La légère dépression d'absorbance centrée vers 32 °C peut être associée à la prétransition, tandis que le changement abrupt d'absorbance centré à 39 °C est attribué au changement d'état des lipides (gel --> liquide cristallin) (Antunes-Madeira et al. 1980). Si la technique turbidimétrique exige une plus grande concentration de lipide, elle implique également la présence d'une plus grande proportion d'alcool (3-5%). Or, il n'est pas exclu qu'autant d'éthanol perturbe le comportement thermotropique des lipides et déplacent les  $T_c$  et  $T_g$  vers des températures plus basses, ce qui expliquerait, au moins partiellement, l'écart entre les  $T_c$  déterminées par la méthode soit fluori-, soit turbidimétrique (comparer la Fig. 9 avec les Figs 10 et 11). Il est intéressant de noter que les courbes des Figs 9 et 11 sont pratiquement "stéréoisomériques", ce qui est vraisemblablement associé à une visualisation de phénomènes identiques par les deux techniques (fluorescence et turbidimétrie).

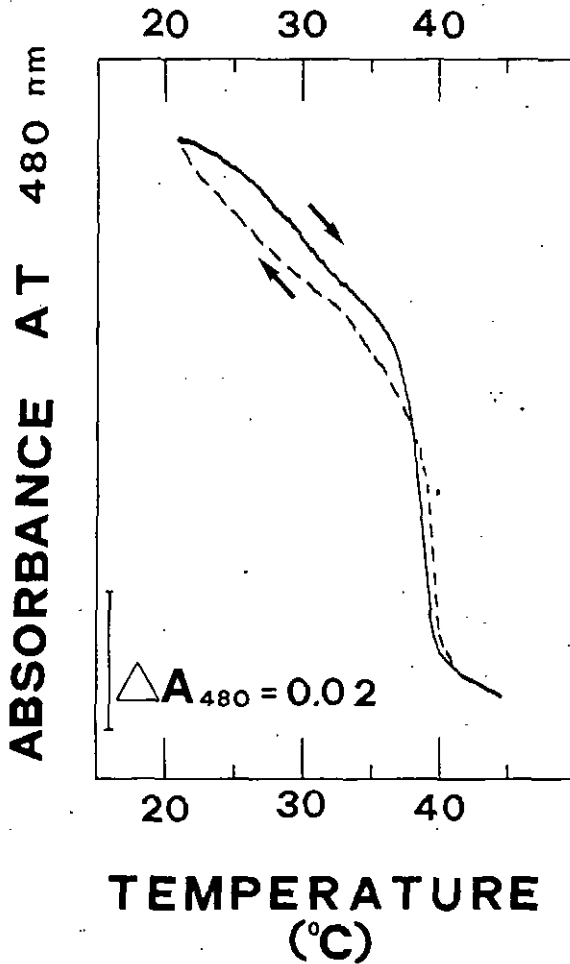


Fig. 11: Changement de turbidité d'une suspension de liposomes de DPPC (0.5 mM) contenant 2 mol% de Chl *a* dans du MOPS 10 mM, pH 7.5, en fonction de la température. Les liposomes ont été préparés par la méthode de l'injection rapide. La suspension a été chauffée puis refroidie. La turbidité est mesurée dans un spectrophotomètre Aminco DW-2a en mode "split beam" à  $480 \pm 3$  nm, afin d'éviter toute interférence avec l'absorbance de la chlorophylle.

Afin d'étudier la transition de phase de lipides arrangés en vésicules stables et exemptes de toute sonde, nous avons adopté une méthode de préparation des liposomes quelque peu modifiée par rapport aux précédentes (3.2.2). La Fig. 12 présente les variations d'absorbance lues à 436 nm pour une meilleure résolution du phénomène (Antunes-Madeira *et al.* 1980).

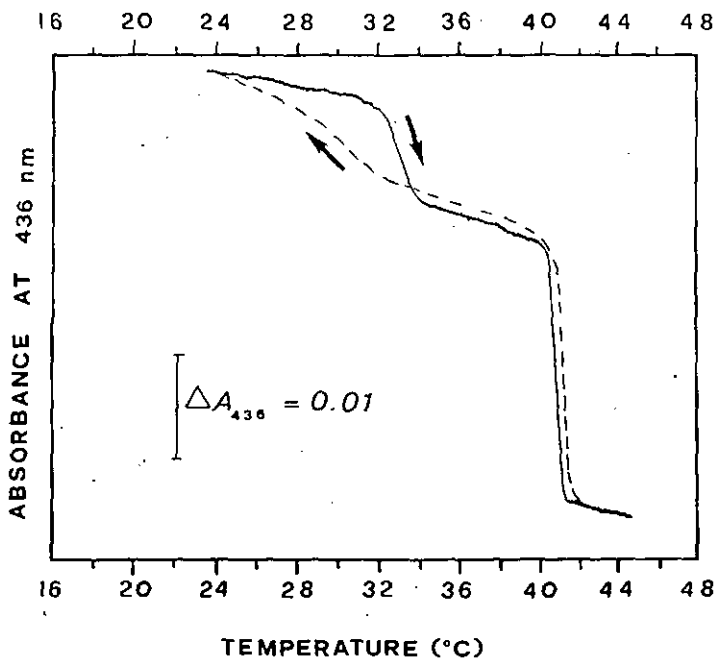


Fig. 12: Changement de turbidité d'une solution de liposomes de DPPC (0.25 mM) dans du MOPS 10 mM, pH 7.5, en fonction de la température. Les liposomes ont été préparés par la méthode de l'injection rapide, puis dialysés pendant 72 h contre un milieu MOPS 10 mM, pH 7.5. Enfin, la suspension a été chauffée, puis refroidie (annealing). La turbidité est mesurée dans un spectrophotomètre Aminco DW-2a en mode "split beam" à  $436 \pm 3$  nm.

La faible baisse d'absorbance entre 24 et 44 °C est interrompue par deux diminutions abruptes de turbidité correspondant à la prétransition et à la transition (le point d'inflexion des courbes étant situé à 33 et 41 °C, respectivement). L'amplitude de la baisse d'absorbance à la transition est plus grande d'environ, trois fois par rapport à la prétransition. On remarque une légère hystérèse entre le "scan" de chauffage et celui de refroidissement, particulièrement aux basses températures. Il semble donc être possible de préparer des liposomes "purs" (sans sonde et exempts d'alcool) et stables. Trois conditions semblent toutefois être requises: i) un "annealing", ii) un temps de repos entre l'injection de la solution éthanolique de lipide et la mesure turbidimétrique, iii) une dialyse. En effet, on peut imaginer que le préchauffage favorise la cohésion entre les molécules de lipides, ce que suggèrent Lowaczek *et al.* (1975), pour autant que la phase de refroidissement soit lente (>1°C/min). Le temps de repos permet aux molécules de lipides de s'hydrater complètement et de s'arranger dans un état d'énergie minimal (Janiak *et al.* 1976; Quinn, 1984). Quant à la dialyse, elle permet l'élimination de l'alcool des structures membranaires.

En conclusion, il apparaît que, chez les liposomes de DPPC, la Chl *a* agit comme un stabilisateur de la phase lipidique, probablement en favorisant l'arrangement des chaînes acylées au sein de la bicouche et en accélérant le processus d'hydratation des têtes polaires des molécules lipidiques. Ainsi, les changements de fluorescence de la Chl *a* traduisent assez fidèlement le comportement thermotropique des lipides. Cependant, la Chl *a* atténue le phénomène de la prétransition, probablement suite au remplissage par les groupements phytol des espaces induits par les gros groupements des têtes polaires au sein de la bicouche. Elle *a*, en outre, un léger effet fluidifiant ( $T_c$  plus basse que normale).

Un "annealing" des liposomes contenant de la Chl *a* rend difficile l'étude du comportement thermotropique par la mesure de l'émission de fluorescence, suite probablement à la destruction de la Chl *a*. Par contre, en absence de toute sonde, la méthode de préparation des liposomes nécessite un préchauffage qui favorise un arrangement optimal des molécules de lipides au sein de la bicouche.

#### 4.2 Effets des herbicides sur le comportement thermotropique des liposomes

Les effets de l'atrazine et du DCMU sur le comportement thermotropique de vésicules constituées de DMPC, DPPC et DSPC (visualisés par les changements de fluorescence de la Chl *a*) sont présentés dans la Fig. 13. Les vésicules contrôles montrent les comportements habituels (Lee, 1975a et b, 1977) à partir desquels les valeurs  $T_c$  de 23.3, 41.1, et 54.1 °C ont été déterminées pour DMPC, DPPC et DSPC, respectivement. Une prétransition est observée pour la DMPC (11-12°C) et pour la DPPC (32°C), mais n'a jamais été détectée chez la DSPC. Les  $T_c$  et  $T'_c$  rencontrées dans la littérature se situent entre 23-24°C et 11-12°C pour la DMPC et 54-58°C et 49-51°C pour la DSPC, respectivement (Hinz & Sturtevant, 1972; Lee, 1977, 1983; Lee *et al.* 1986; D'Leary *et al.* 1986); pour la DPPC, voir § 4.1.1.

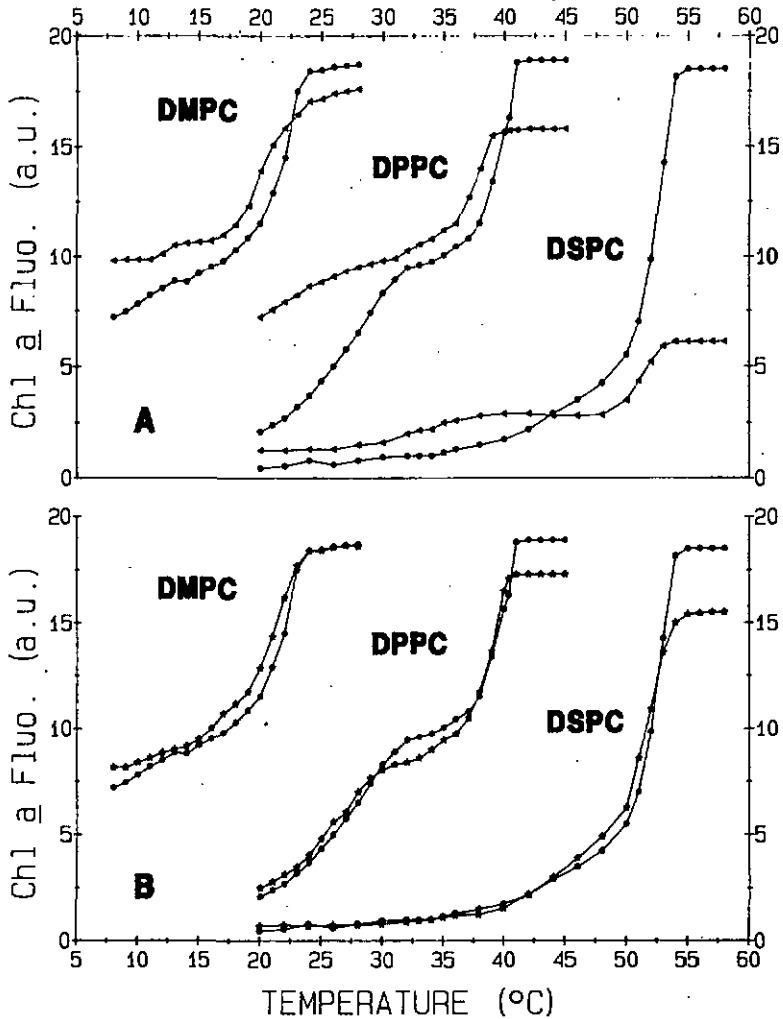


Fig. 13: Changement d'intensité de fluorescence de la Chl *a* intégrée dans trois types de liposomes en fonction de la température. Les conditions sont identiques à celles décrites dans la Fig. 4. (A) traitement des liposomes par le DCMU et (B) traitement des liposomes par l'atrazine.

Légende: Liposomes contrôle (•) et traités par 0.033 mM de DCMU (○) ou d'atrazine (\*). DMPC - Dimyristoylphosphatidylcholine, DPPC - Dipalmitoylphosphatidylcholine et DSPC - Distéaroylphosphatidylcholine. a.u. = unités arbitraires.

Les niveaux de fluorescence à la  $T_c$  sont similaires pour les trois espèces de PC mais l'amplitude du changement de fluorescence est plus grande pour la DSPC que pour la DPPC et que pour la DMPC. En fait, l'amplitude augmente avec le nombre de carbones dans les chaînes acylées, ce qui est associé à l'augmentation de la variation d'enthalpie de ces trois espèces de PC lors de la transition de la phase gel à la phase liquide cristalline (Quinn, 1984).

La présence du DCMU (166  $\mu\text{M}$ ) altère de manière différenciée le comportement thermotropique des vésicules de PC composée de chaînes d'acides gras de longueur différente (Fig. 13A). En effet, plus le nombre de carbones est élevé, plus le DCMU atténue l'amplitude de fluorescence. D'une manière générale, l'intensité de fluorescence est plus élevée aux températures inférieures à la  $T_c$ , mais plus basse aux températures supérieures, relativement aux contrôles correspondants. Les valeurs des  $T_c$  sont légèrement diminuées (d'environ  $2^\circ\text{C}$ ), mais de manière plus marquée pour la DPPC que pour les DM- et DSPC. De plus, la prétransition chez la DPPC est observable sur une plage de température plus large et plus basse. Il apparaît, en outre, une stabilisation de la fluorescence centrée à  $40^\circ\text{C}$  chez la DSPC qui suggère l'apparition d'une prétransition.

L'atrazine (166  $\mu\text{M}$ ) par contre, n'altère que faiblement le comportement thermotropique de ces trois espèces lipidiques (Fig. 13B), quand bien même, à l'instar du DCMU, elle abaisse le niveau de la fluorescence aux températures situées au-delà de la  $T_c$ .

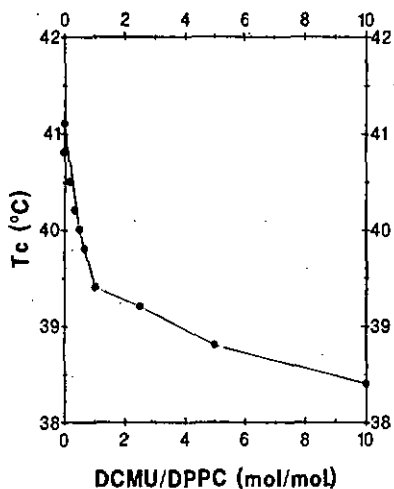


Fig. 14: Déplacement de la température de transition de phase ( $T_c$ ) de liposomes de DPPC de l'état gel à l'état liquide cristallin en fonction du rapport herbicide/lipide. La concentration de la DPPC est de 0,033 mM.

Dans le cas du DCMU, la baisse de la  $T_c$  est proportionnelle à la quantité d'herbicide jusqu'à un rapport DCMU/DPPC (mol/mol) de 1 (Fig. 14), ce qui suggère un phénomène de saturation de la phase membranaire par l'herbicide. Lorsque la valeur de ce rapport augmente au-delà de cette valeur, on assiste à une "rupture" de la droite mais la  $T_c$  continue à diminuer en fonction de la concentration de DCMU quoique plus faiblement. Par contre, l'intensité de la fluorescence à 21°C augmente significativement avec très peu d'herbicide (0.03 mM) puis reste constante (Fig. 15), alors qu'elle diminue de manière proportionnelle à la concentration de DCMU à 44°C (Fig. 15). Cette dernière observation est probablement associée au fait que l'herbicide "quench" la fluorescence émise par la Chl a aux températures élevées (Izawa, 1969).

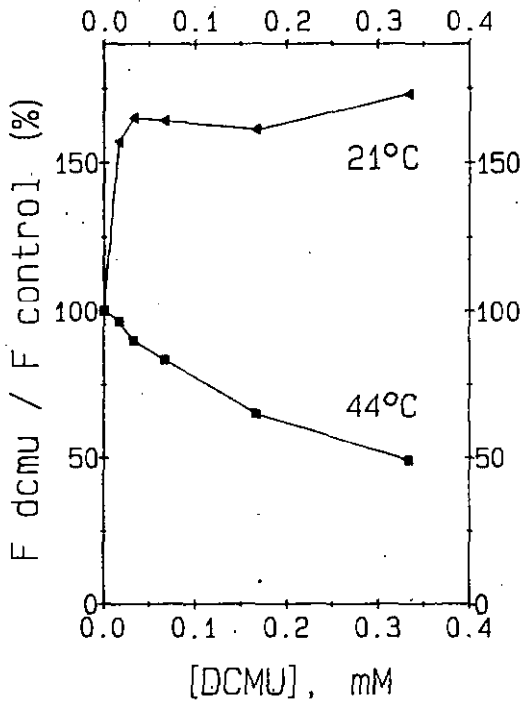


Fig. 15: Changement d'intensité de fluorescence de la Chl a dans des liposomes de DPPC (DPPC/Chl a = 50, mol/mol) après traitement de ces derniers par des concentrations croissantes de DCMU. Les mesures sont effectuées pour des liposomes à l'état gel à 21°C (▲) ou à l'état liquide cristallin à 44°C (■). Pour plus d'information, voir la Fig. 4.

Nous avons contrôlé (à 25 et 43°C) si le DCMU déplaçait le spectre d'émission de la fluorescence de la Chl *a* vers des longueurs d'onde plus courtes, ce qui expliquerait ces changements de niveau de fluorescence. Comme on peut le constater dans la Fig. 16, tel n'est pas le cas! On peut aussi envisager que l'herbicide chasse les molécules de Chl *a* hors de la bicouche, ou encore que le DCMU induise la formation de domaines riches en Chl *a* dans lesquels on assisterait à un fort quenching de la fluorescence. Cependant, ces deux hypothèses n'expliquent pas l'augmentation d'intensité de fluorescence par le DCMU aux températures inférieures à la  $T_c$ .

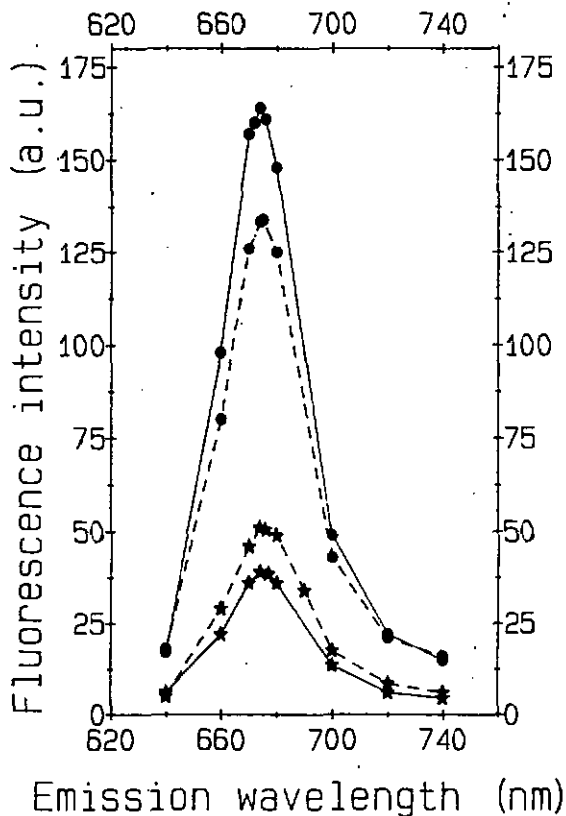


Fig. 16: Spectres d'émission de fluorescence de la Chl *a* imbriquée dans des liposomes de DPPC (0,033 mM), rapport DPPC/Chl *a* = 50. Liposomes contrôlé (—), liposomes traités avec 0,033 mM de DCMU (----) lorsque les lipides sont dans un état gel à 25°C (\*) ou dans un état liquide cristallin à 43°C (•).

Nous avons confectionné des liposomes de deux galactolipides afin de rechercher le rôle des têtes polaires dans l'altération du comportement thermotropique des lipides induit par les herbicides (Fig. 17). Les  $T_c$  des DGDG et MGDG totalement saturés ont été déterminées à 48.5 et 66°C, respectivement. Ces valeurs sont difficilement comparables avec celles de la littérature, puisqu'elles varient en fonction de l'origine du matériel biologique, de la proportion des différents acides gras et de leur degré d'insaturation. Cependant nos valeurs se rapprochent de celles de Gounaris et al. (1983): 57-73°C pour le MGDG, Mansourian & Quinn (1986): 57°C pour le MGDG et Curatolo (1987): 79°C pour le MGDG saturé d'Epinard et 55°C pour le DGDG distéarique. On observe aussi, que la plage de température sur laquelle la transition se déroule est plus étendue, comparée à celle rencontrée pour les phospholipides (Fig. 13), ce qui est associé au degré de coopérativité entre les chaînes acylées (MacDonald, 1978). Il semble donc normal qu'elle soit plus large puisqu'il existe une hétérogénéité au sein des acides gras de nos DGDG (83%  $C_{18:0}$ , 16%  $C_{16:0}$ ) et MGDG (75%  $C_{18:0}$ , 25%  $C_{16:0}$ ).

Le DCMU abaisse la  $T_c$  d'environ 2°C et diminue l'intensité de fluorescence à 680 nm, au-dessus et en-dessous de la  $T_c$ , chez des liposomes préparés à partir des deux galactolipides (Fig. 17A). L'atrazine (Fig. 17B) ne semble pas altérer significativement le comportement thermotropique du DGDG (pas de déplacement de la  $T_c$  et peu de changement d'intensité de fluorescence). Par contre, le MGDG transitionne un degré plus bas en présence de cet herbicide. De plus, l'intensité de fluorescence émise par la Chl *a* contenue dans les liposomes de MGDG est fortement atténuée aussi bien aux températures inférieures que supérieures à la  $T_c$ .

Il se peut que la tête polaire du MGDG, plus petite que celle du DGDG ou de la PC, affaiblisse la cohésion de la bicouche au niveau des têtes polaires, permettant ainsi à l'atrazine de mieux pénétrer la membrane. De plus, il serait tentant de considérer les deux herbicides comme jouant un rôle plutôt rigidifiant que fluidifiant dans des SUV de galactolipides aux températures inférieures à la  $T_c$ , puisque l'on assiste à une baisse (plutôt qu'à une stimulation) de l'intensité de fluorescence. Cependant, si un déplacement de la  $T_c$  semble bien exprimer un changement de viscosité de la membrane, une modification de l'intensité de la fluorescence semble être attribuée davantage à une interaction sonde-herbicide encore mal comprise et pas nécessairement en relation avec la fluidité.

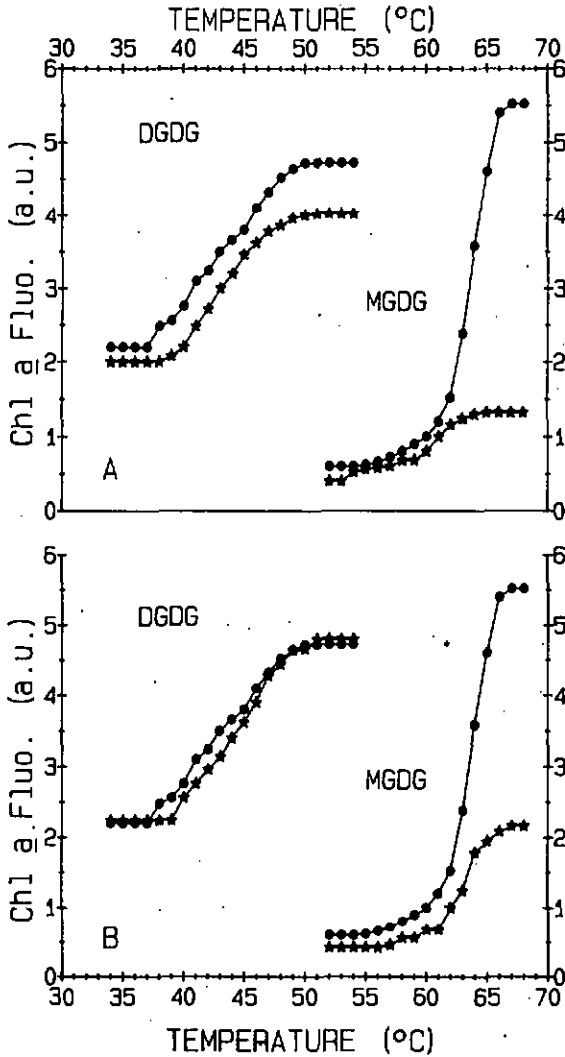


Fig. 17: Changement d'intensité de fluorescence de la Chl *a* imbriquée dans des liposomés de DGDG (digalactosyldiacylglycérol) ou de MGDG (monogalactosyldiacylglycérol) d'Epinar, après saturation totale des doubles liaisons avec le catalyseur d'Adams. (A) traitement avec 0.033 mM DCMU, (B) traitement avec 0.033 mM atrazine. Les conditions sont identiques à celles de la Fig. 13. Courbes des contrôles (•) et des liposomés traités (\*).

On peut supposer que les herbicides interfèrent avec les molécules de Chl *a* et ainsi modulent l'émission de fluorescence, sans nécessairement agir directement sur la phase lipidique. De plus, le rapport Chl *a*/lipide utilisé dans les expériences fluorimétriques étant relativement élevé, nous ne pouvons pas exclure une possible influence de la sonde elle-même sur le comportement thermotropique des vésicules lipidiques (ce que nous avons déjà suggéré plus haut). Pour ces raisons, nous avons mesuré les changements d'absorbance d'une suspension de liposomes exempts de Chl *a* en fonction de la température (Fig. 18). On constate que la  $T_c$  a été déplacée de 41.5 à 40.0°C par le DCMU, contrairement à l'atrazine qui ne modifie pratiquement pas cette valeur. La prétransition n'est pas abolie par le DCMU, mais elle est déplacée d'environ 2°C vers les basses températures, ce que l'on n'observe pas avec l'atrazine. L'amplitude du changement d'absorbance après addition des deux herbicides ne varie que faiblement (4 et 8% plus petite que le contrôle entre 24 et 42°C pour le DCMU et l'atrazine, respectivement). De plus, il existe une certaine hystérèse du système contrôle entre 24 et 34°C, qui tend à disparaître aux températures plus élevées. Par contre, les herbicides amplifient l'hystérèse et suppriment la prétransition dans les courbes de refroidissement, l'atrazine étant à cet égard plus actif que le DCMU. Ainsi, le DCMU semble induire une certaine fluidification de la phase lipidique, puisque celle-ci subit sa prétransition et sa transition à des températures plus basses, relativement au contrôle. Par ailleurs, la prétransition n'est pas abolie irréversiblement par la présence des herbicides, puisqu'elle réapparaît lors d'un deuxième chauffage (résultat non montré). Ces observations suggèrent: 1) que les herbicides interfèrent avec la Chl *a* et 2) que l'atrazine partitionne préférentiellement dans une phase lipidique à l'état liquide cristallin. En effet, le DCMU peut induire un rapprochement des molécules de Chl *a* au niveau des têtes polaires des lipides et favoriser ainsi la formation de dimères au détriment des multimères de la Chl, sans que ce changement soit nécessairement en relation avec la microviscosité membranaire. Quant à la deuxième suggestion, elle est basée sur l'observation que la plus grande hystérèse est observée aux températures inférieures à la  $T_c$ , mais après que l'atrazine ait pu pénétrer la phase lipidique à l'état liquide cristallin.

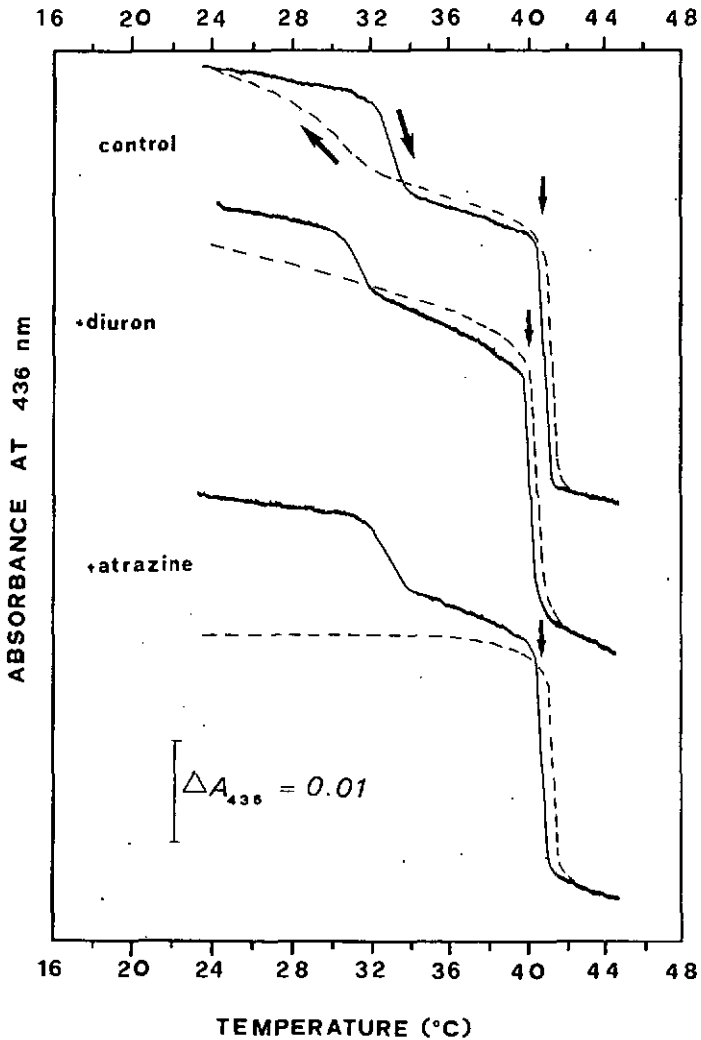


Fig. 18: Changement de turbidité d'une suspension de liposomes de DPPC (0.25 mM) dans du MOPS 10 mM, pH 7.5, en fonction de la température. Les liposomes ont été préparés par la méthode de l'injection rapide, puis dialysés pendant 72 h contre un milieu milieu MOPS 10 mM, pH 7.5. La suspension a été chauffée, puis refroidie avec ou sans herbicide (0.033 mM). La turbidité est mesurée dans un spectrophotomètre Aminco DW-2a en mode "split beam" à  $436 \pm 3$  nm.

Comme l'atrazine et le DCMU inhibent le flux d'électrons du PS-II et que ce complexe protéinique est imbriqué dans la membrane thylacoïdale, nous avons recherché les effets de ces herbicides sur des vésicules de lipides thylacoïdaux hydrogénés. Les mesures de fluorescence avec la Chl *a* donnent des résultats fantaisistes, suite, probablement, à une dégradation de la Chl *a* en présence des lipides fortement acides tels que le SQDG et le PG. Nous avons donc utilisé la méthode turbidimétrique (Fig. 19). Quatre observations sont à mentionner: 1) aucune prétransition n'apparaît; 2) la plage de températures sur laquelle se déroule la transition principale est étendue ( $>7^{\circ}\text{C}$ ); 3) la  $T_c$  passe de  $60.2$  à  $57^{\circ}\text{C}$  après addition du DCMU et à  $59.8^{\circ}\text{C}$  après addition d'atrazine; 4) l'amplitude du changement d'absorbance entre  $30$  et  $70^{\circ}\text{C}$  est peu altérée par le DCMU (7%), mais diminue d'environ 25% en présence d'atrazine. Ainsi, un mélange hétérogène de lipides composés de plusieurs espèces moléculaires ne passe pas par un changement de structure (prétransition) aux températures inférieures à la  $T_c$ , mais se trouve dans un état où les phases gel et liquide-cristalline coexistent sur une plage importante de températures. Le DCMU, bien qu'il montre un effet fluidifiant sur les liposomes de lipides thylacoïdaux, ne semble pas modifier grandement l'enthalpie de la transition, contrairement à l'atrazine (25%). Seule une très faible hystérèse apparaît entre les courbes de chauffage et de refroidissement (résultats non montrés).

Dans une troisième série d'expériences turbidimétriques, on mesure les changements d'absorbance à  $480\text{ nm}$  d'une suspension de liposomes de DPPC contenant de la Chl *a* et traités avec du DCMU ou de l'atrazine (Fig. 2D). On observe que le DCMU déplace la  $T_c$  vers les basses températures, contrairement à l'atrazine et que l'amplitude du changement d'absorbance entre  $20$  et  $45^{\circ}\text{C}$ , diminue d'env 20 et 5% en présence de DCMU et d'atrazine, respectivement. Le DCMU semble donc affecter plus grandement le changement d'enthalpie de ce système, comparé à l'atrazine. Bien que la prétransition soit discrète dans le contrôle, il semble qu'elle disparaisse en présence de DCMU mais pas en présence d'atrazine. On suggère ainsi que le DCMU fluidifie la phase lipidique de DPPC.

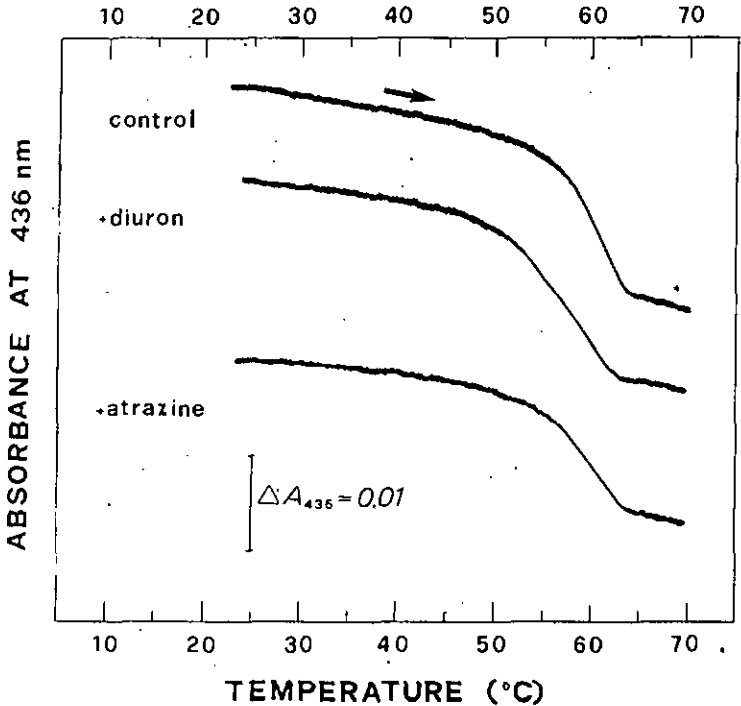


Fig. 19: Changement de turbidité en fonction de la température d'une suspension de liposomes. Les liposomes sont composés d'un extrait lipidique dépigmenté de membranes thylacoïdales d'Epinard après hydrogénation des doubles liaisons avec le catalyseur d'Adams. MGOG - 51.5%, DGDG - 29.9%, SQDG - 11.4% et PG - 7.2%. La concentration lipidique est de 0.25 mM dans du MOPS 10 mM, pH 7.5. Après hydrogénation, la composition en acide gras se résume à 20.5%  $C_{18:0}$ , 77.9%  $C_{18:2}$  et 1.6% de  $C_{18:3}$ . Les liposomes ont été préparés par la méthode de l'injection rapide, ils ont ensuite été dialysés pendant 72 h. La suspension a été chauffée puis refroidie avec ou sans herbicide (0.033 mM). La turbidité est mesurée dans un spectrophotomètre Aminco DW-2a en mode "split beam" à  $436 \pm 3$  nm.

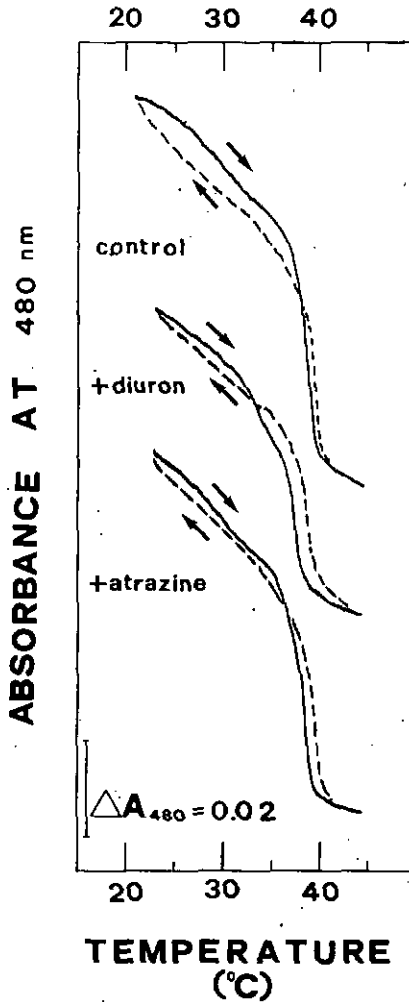


Fig. 20: Changement de turbidité d'une suspension de liposomes de DPPC (0.5 mM) contenant 2 mol% de Chl a dans du MOPS 10 mM, pH 7.5, en fonction de la température. Les liposomes ont été préparés par la méthode de l'injection rapide (3.4% éthanol). La suspension a été chauffée puis refroidie en présence ou non de DCMU ou d'atrazine (0.033 mM). La turbidité est mesurée dans un spectrophotomètre Aminco DW-2a en mode "split beam" à  $480 \pm 3$  nm, afin d'éviter toute interférence avec l'absorbance de la chlorophylle.

Dans le but de mieux interpréter les effets des herbicides sur le comportement thermotropique des lipides, nous les avons comparés avec ceux, bien connus, du cholestérol et de l'alcool benzylique. Le cholestérol est reconnu comme agent fluidifiant au-dessous de la  $T_c$  et rigidifiant au dessus (Colley & Metcalfe, 1972; Demel & de Kruyff, 1976; Oldfield & Chapman, 1972). Par contre, l'alcool benzylique fluidifie la phase lipidique sur toute la gamme de température (Turner & Oldfield, 1979).

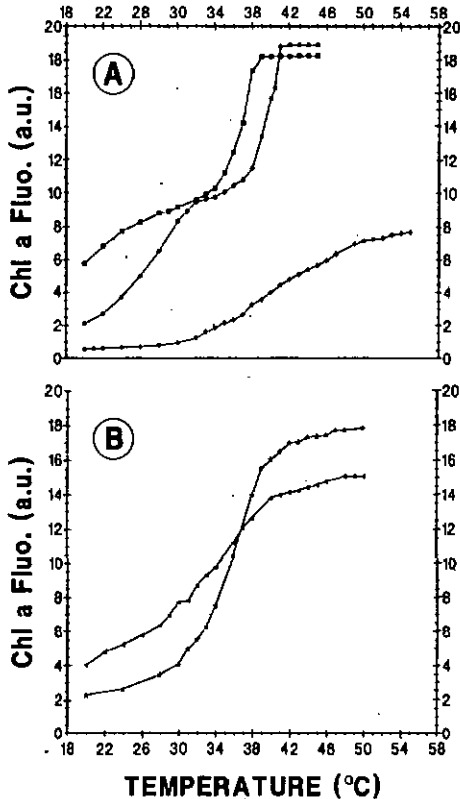


Fig. 21: Courbes de changement d'intensité de la fluorescence émise par la Chl *a* en fonction de l'augmentation de température. La Chl *a* est incluse dans des liposomes de DPPC (0.033 mM) en suspension dans MOPS 10 mM, pH 7.5, DPPC/Chl *a* = 50 (mol/mol). (A) Courbes contrôle (○), + alcool benzylique, 10 mM (■) et + cholestérol 20 mol% (△). (B) Liposomes de DPPC contenant 20 mol% de cholestérol et traités par 0.033 mM de OCMU (◄) ou d'atrazine (\*). La lumière d'excitation est de  $440 \pm 2.5$  nm et celle d'émission est enregistrée à  $680 \pm 10$  nm. Pour plus d'information, voir 3.2.1 et 3.3.

La Fig. 21A présente les effets de ces deux molécules sur des liposomes de DPPC (visualisés par les changements d'intensité de fluorescence en fonction de la température). On constate qu'en présence de cholestérol, i) l'intensité de fluorescence est plus faible que celle du contrôle sur toute la plage de température mesurée, ii) que la plage de température de la phase de transition est importante (env 20°C) et iii) que la  $T_c$  est difficilement observable, en accord avec les observations classiques (Houslay & Stanley, 1982). Ainsi, une fluidification de la membrane à l'état gel par le cholestérol, n'est pas identifiable par une augmentation d'intensité de la fluorescence de la Chl *a*, contrairement à l'alcool benzylique qui induit une augmentation d'intensité de fluorescence en-dessous de la  $T_c$  et une diminution au dessus. Il se peut que le cholestérol favorise l'apparition de domaines riches en Chl *a* et des domaines riches en lipides, voire en cholestérol (séparation de phase). Dans le cas d'une séparation de phase des composés, le cholestérol favoriserait les formes dimériques et/ou multimériques au détriment de la forme monomérique de la Chl *a*; une telle possibilité est suggérée par Lee (1976), mais pour un pourcentage de cholestérol plus élevé. En présence d'alcool benzylique, la  $T_c$  et la  $T'_c$  sont déplacées vers des températures plus basses, alors que seule la  $T'_c$  disparaît en présence de 20 mol% de cholestérol.

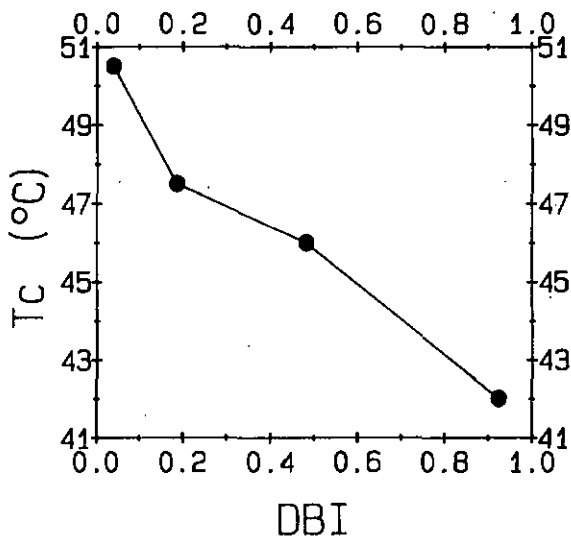


Fig. 22: Déplacement de la température de transition de phase ( $T_c$ ) de liposomes de DCDG de farine saturé par le catalyseur d'Adam (14.9%  $C_{18:0}$ , 82.6%  $C_{18:0}$  et 1.5%  $C_{18:3}$ ). Le "Double Bond Index" (DBI) est modulé par le remplacement progressif des lipides saturés par des lipides natifs (7%  $C_{18:0}$ , 2.8%  $C_{18:0}$ , 5.1%  $C_{18:1}$ , 79.3%  $C_{18:2}$  et 5.8%  $C_{18:3}$ ). Les mesures de  $T_c$  ont été effectuées par la méthode fluorimétrique: DGDG/Chl *a* = 50, conc. de DGDG = 0.033 mM.

Nous avons suggéré précédemment que le DCMU jouait un rôle fluidificateur des liposomes de DPPC aux températures inférieures à la  $T_c$ . Cette suggestion repose sur le fait qu'en présence de DCMU, la  $T_c$  est déplacée vers les basses températures. En effet, si nous mesurons la  $T_c$  de liposomes constitués d'un lipide saturé et de quantités croissantes d'un lipide insaturé (p.ex. du DGDG natif d'épinard, Fig. 22), on constate que la  $T_c$  est d'autant plus basse que la proportion d'espèces insaturées augmente. L'abaissement de la  $T_c$  par l'alcool benzylique est, à l'instar du DCMU, proportionnel à la quantité de l'agent mis en présence (Fig. 23). Cependant, le DCMU est beaucoup plus efficace que l'alcool benzylique. En effet, une diminution de la  $T_c$  de 41 à 39°C est obtenue pour un rapport DCMU/DPPC (mol/mol) de 0.5 alors qu'elle est obtenue pour un rapport alcool benzylique/DPPC de 145 (comparer Figs 14 et 23). D'autre part, la courbe d'abaissement de la  $T_c$  en fonction du rapport alcool benzylique/DPPC (Fig. 23) ne présente aucune "rupture", ce qui suggère que l'AB ne sature pas la phase membranaire, ou n'induit pas de séparation de phase entre les molécules de lipide et celles de Chl *a*, dans le domaine de concentration étudié.

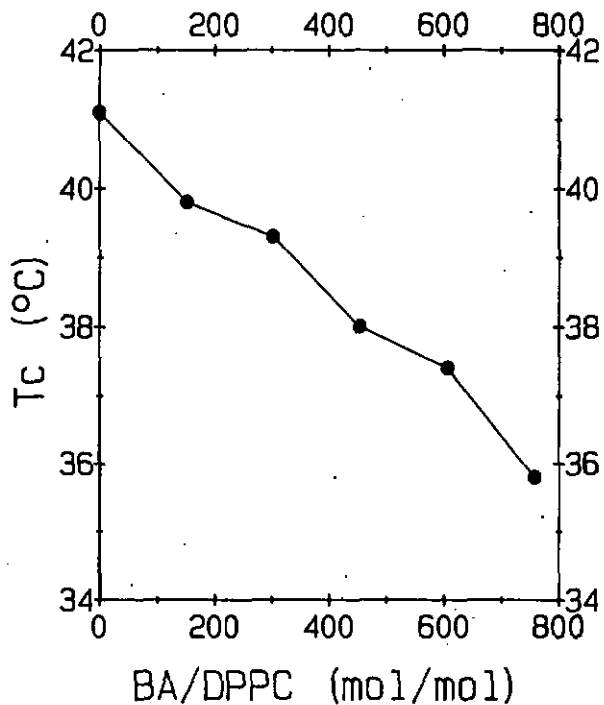


Fig. 23: Déplacement de la température de transition de phase ( $T_c$ ) de liposomes de DPPC de l'état gel à l'état liquide cristallin en fonction du rapport alcool benzylique (BA)/lipide. La concentration de la DPPC est de 0,033 mM.

Nous avons observé un effet antagoniste entre les herbicides et le cholestérol sur le comportement thermotropique des lipides, visualisé par les changements d'intensité de fluorescence en fonction de la température (comparer Figs 13 et 21A). En traitant des liposomes contenant 20 mol% de cholestérol avec des herbicides, on peut s'attendre à ce que ces derniers restaurent un comportement thermotropique proche de celui du contrôle (exempt de cholestérol).

La Fig. 21B montre que l'augmentation de fluorescence en fonction de la température, fortement atténuée par la présence de cholestérol, est partiellement restaurée par l'addition d'herbicides, l'atrazine étant à cet égard plus efficace que le DCMU. Le cholestérol augmente la mobilité des têtes polaires, jouant un rôle de "spacer" (Shepherd & Büldt, 1979), ce qui pourrait favoriser la pénétration de l'atrazine et restaurer le signal fluorimétrique dans une plus large mesure que le DCMU. La prétransition, qui est supprimée par l'inclusion de cholestérol dans les vésicules de DPPC (Fig. 21A) n'a pas pu être restaurée par les herbicides.

En mesurant la réduction du cyt c par l'ascorbate dans des conditions telles que le A mesuré reflète le passage (sortie) de l'ascorbate à travers la bicouche, nous avons estimé la perméabilité à l'ascorbate chez des liposomes traités au DCMU et à l'atrazine en fonction de la température (Fig. 24). Si les herbicides n'accroissent pas significativement la perméabilité, ils la favorisent en revanche à des températures plus basses, relativement aux liposomes non traités. Le DCMU est à cet égard beaucoup plus puissant que l'atrazine, puisqu'à 38°C, 85% d'ascorbate ont déjà été libérés en présence de DCMU, contre 55 seulement en présence d'atrazine et 50% chez le contrôle. La perméabilité de la bicouche lipidique à l'ascorbate dépend donc de la température ainsi que de l'état et de la structure de la membrane (Kraïnev & Valner, 1989). D'une manière générale, la présence du DCMU permet de diminuer de 2°C la température à laquelle l'efflux d'ascorbate a lieu chez les vésicules contrôle. De plus, on constate que la perméabilité des liposomes de DPPC à l'ascorbate, qui augmente entre 20 et 42-43°C, est essentiellement nulle hors de ce domaine de température.

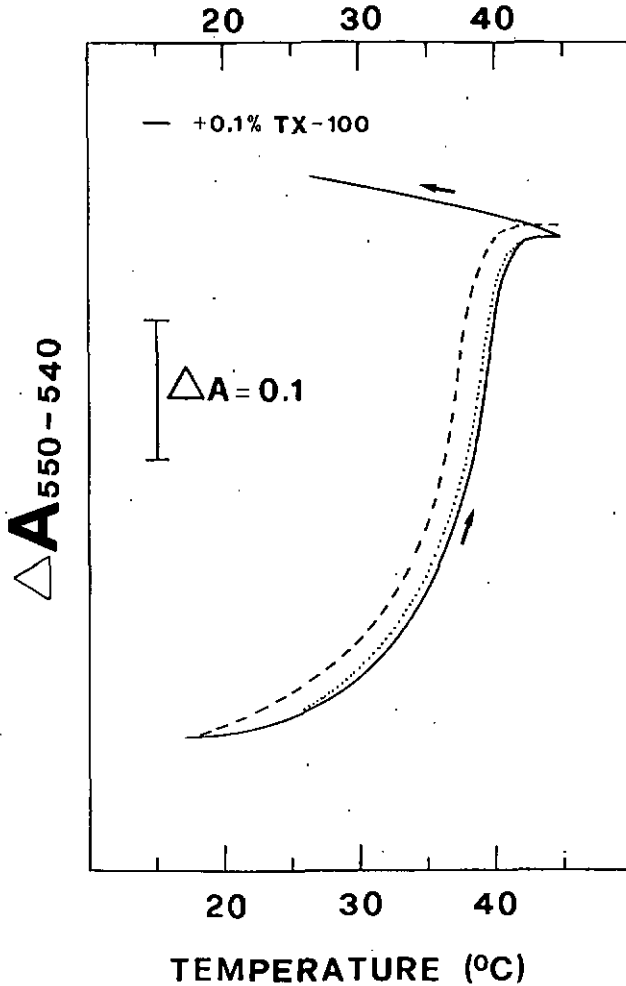


Fig. 24: Mesure de la perméabilité des membranes liposomales de DPPC (20 mM) à l'ascorbate, en fonction de l'augmentation de température. Pour plus de détail sur la technique, voir 3.2.3. Courbe contrôle (—), + DCMU à 0.033 mM (-----) et + atrazine à 0.033 mM (.....). Le niveau maximal de réduction du cytochrome c en présence de 0.1% TX-100 est indiqué en haut à gauche.

#### 4.3 Coefficient de partage des herbicides

Dans le but d'expliquer les effets perturbateurs des deux herbicides sur les vésicules de DPPC (DCMU > atrazine, Figs 13, 18, 20, 24), sur les vésicules de DPPC contenant du cholestérol (atrazine > DCMU, Fig. 21) et sur des vésicules composées de lipides thylacoïdaux (DCMU > atrazine, Figs 17, 19), nous avons estimé la capacité de pénétration de ces herbicides dans la phase lipidique au dessus de la  $T_c$  en mesurant leur coefficient de partition ( $K_p$ ). La Fig. 25 présente la dialyse progressive du DCMU (Fig. 25A) et de l'atrazine (Fig. 25B) du compartiment (a) vers le (b). Environ 24 heures sont nécessaires afin d'atteindre l'équilibre. Comparés au contrôle (courbes 1), les deux herbicides diffusent plus rapidement et plus abondamment lorsque les vésicules de DPPC sont dans le compartiment (b) (courbes 2) mais plus lentement et en plus faible quantité lorsque les liposomes sont présents dans le compartiment (a) (courbes 3). Avec le DCMU ces différences sont plus marquées qu'avec l'atrazine. Des expériences similaires ont été conduites avec des vésicules contenant 20 mol% de cholestérol et avec des vésicules préparées à partir de lipides thylacoïdaux hydrogénés (résultats détaillés non montrés). A partir de ces résultats, les coefficients de partition ont été déterminés (Tab. I). On constate que le DCMU partitionne 40 fois plus que l'atrazine dans des liposomes de DPPC (200/5). Chez les vésicules de DPPC contenant 20 mol% de cholestérol, la pénétration de l'atrazine est fortement favorisée, ce qui réduit l'écart à environ 6 fois (220/35). Dans des liposomes de lipides thylacoïdaux, le DCMU partitionne mieux que dans des vésicules de DPPC ( $K_p=290$  contre 200), alors que l'atrazine ne partitionne que très faiblement dans les deux cas ( $K_p=5$ ).

La partition des herbicides dans le système lipides thylacoïdaux hydrogénés/eau n'est pas fondamentalement différente de celle observée dans le système DPPC/eau. Ceci suggère que la nature des têtes polaires n'a que peu d'influence sur la partition des herbicides. Par contre, il semblerait que la longueur des chaînes acylées joue un rôle prépondérant dans la partition des petites molécules. En effet, Antunes-Madeira & Madeira (1984, 1987) mesurèrent des  $K_p$  de 1950, 650 et 270 pour le parathion et de 225, 135 et 48 pour le malathion (deux insecticides) dans des membranes de DM-, DP- et DSPC, respectivement. Pour les trois types de vésicules étudiés, le coefficient de partition du DCMU a toujours été plus élevé que celui de l'atrazine. Comme la pénétration de l'atrazine est accrue par un facteur 7 lorsque du cholestérol est inclus (20 mol%) dans les liposomes de DPPC, il est très probable que les deux herbicides interagissent principalement avec les chaînes acylées de la bicouche.

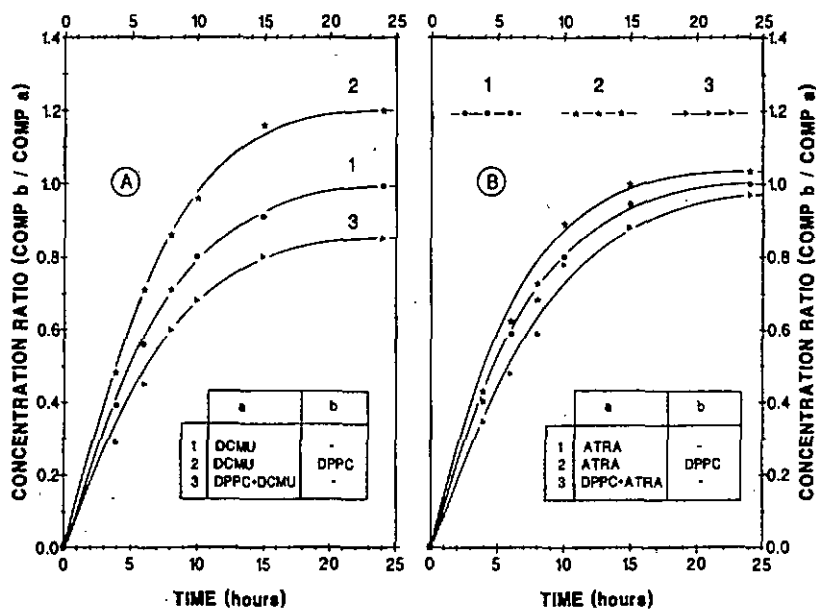


Fig. 25: Courbe de diffusion des herbicide des compartiments (a) vers les compartiments (b) en fonction du temps et à 50°C. Pour une meilleure compréhension, voir Fig. 2 et § 3.4.

- (A) Diffusion du DCMU; courbe 1 - DCMU en (a) seulement, courbe 2 - DCMU en (a) et DPPC en (b) et courbe 3 - DCMU et DPPC en (a).
- (B) Diffusion de l'atrazine; courbe 1 - atrazine en (a) seulement, courbe 2 - atrazine en (a) et DPPC en (b) et courbe 3 - atrazine et DPPC en (a).

A partir des résultats de la Fig. 21, on pourrait conclure que les herbicides abolissent l'effet du cholestérol, l'atrazine étant à cet égard plus efficace que le DCMU. Par contre, à partir des résultats du Tab. I, on réalise que le DCMU partitionne dans la phase lipidique dans des proportions beaucoup plus importantes que l'atrazine. Ainsi, pour une même concentration d'herbicide (bulk), l'atrazine apparaît comme un agent plus perturbateur que le DCMU, lorsque les conditions lui permettent de pénétrer les bicouches lipidiques (c-à-d quand les vésicules sont dans un état liquide cristallin ou fluide ou/et en présence d'un agent chimique tel que le cholestérol, qui induit du désordre en espaçant les molécules de lipides à l'état gel).

PARTITION COEFFICIENTS IN VESICLES MADE OF :

HERBICIDES	DPPC	DPPC + 20 mol% CHOLESTEROL	HYDROGENATED THYLAKOID LIPIDS
DCMU	200	220	290
ATRAZINE	5	35	5

Tab. I: Les coefficients de partition ( $K_p$ ) du DCMU et de l'atrazine dans divers liposomes correspondent aux rapports de la concentration d'herbicide dans la phase lipidique / la concentration d'herbicide libre dans le milieu aqueux extérieur (MOPS 10 mM, pH 7.5). Pour les liposomes de DPPC et de DPPC + 20 mol% de cholestérol, les  $K_p$  ont été calculés à partir de mesures effectuées à 50°C et pour les liposomes de lipides thylacoïdaux hydrogénés, à 60°C.

## 5 RESUME

Nous avons étudié les effets de deux herbicides PS-II importants (l'atrazine et le DCMU) sur le comportement thermotropique de plusieurs classes de lipides saturés différant soit par la longueur de leurs chaînes acylées, soit par le groupement de leur tête polaire. Nous avons aussi déterminé la partition de ces deux herbicides entre un milieu aqueux et la partie lipidique de vésicules unilamellaires. Les résultats montrent que l'atrazine et le DCMU altèrent le comportement thermotropique des lipides dans des proportions différentes, ce qui peut être expliqué, en partie, par leurs différents coefficients de partition.

## 6 CONCLUSIONS DE LA PREMIERE PARTIE

Les herbicides DCMU et atrazine suppriment la prétransition et abaissent la  $T_c$  des membranes lipidiques en ayant une action fluidifiante. L'atrazine a cependant des effets plus limités dans des vésicules à l'état gel. De plus, ces deux molécules partitionnent à des degrés différents dans les bicouches lipidiques. On aura toutefois noté, dans cette première partie, que les concentrations des différents herbicides sont élevées (env. 1000 fois supérieures à celles utilisées pour atteindre une demi-inhibition sur des membranes thylacoïdales).

**DEUXIEME PARTIE:**

**PHENOLOGIE ET MORPHOLOGIE DE**

***SOLANUM NIGRUM L.***

Suivant l'angle sous lequel on l'examine et la classification inéluctablement artificielle que l'on adopte, l'adaptation spécifique comporte des aspects biochimiques, physiologiques, anatomiques, morphologiques, au point que l'ensemble des sciences de la vie pourrait être ramené à des problèmes adaptatifs. L'adaptation spécifique assure la pérennité de chaque espèce, tant que le milieu auquel celle-ci est adaptée restera lui-même permanent. Toute modification notable des conditions extérieures, supprimant l'équilibre préexistant, engendrera, au contraire, une inadaptation qui provoquera la disparition de l'espèce ou, dans le cas le plus favorable, son évolution.

Charles Bocquet

TABLE DES MATIERES DE LA 2<sup>ème</sup> PARTIE

1	INTRODUCTION . . . . .	55
2	BUT DE LA DEUXIEME PARTIE . . . . .	55
3	MATERIEL . . . . .	56
4	METHODES . . . . .	57
4.1	<u>Comptage chromosomique</u> . . . . .	57
4.2	<u>Germination</u> . . . . .	57
4.2.1	Extraction et stockage des graines . . . . .	57
4.2.2	Germination dans le phytotron en boîte de Petri . . . . .	57
4.2.3	Germination en terre dans la serre . . . . .	58
4.3	<u>Choix du "biotope" cultural</u> . . . . .	58
4.3.1	La culture en serre tempérée . . . . .	58
4.3.2	La culture en phytotron . . . . .	58
4.3.3	La culture en couche à l'extérieur . . . . .	59
4.4	<u>La phénologie</u> . . . . .	59
4.4.1	Détermination du nombre de feuilles émises jusqu'au premier pédoncule floral . . . . .	59
4.4.2	Mesure de la hauteur . . . . .	59
4.4.3	Détermination du nombre de fruits mûrs portés par le premier pédoncule floral . . . . .	60
4.5	<u>La morphologie</u> . . . . .	60
4.5.1	L'aspect général des plants . . . . .	60
4.5.2	Les feuilles . . . . .	60
4.5.2.1	Le poids sec des feuilles . . . . .	60
4.5.2.2	La longueur des pétioles foliaires . . . . .	60
4.5.2.3	La pilosité des feuilles . . . . .	61
4.5.2.4	Le nombre de dents foliaires . . . . .	61
4.5.2.5	L'indice de découpeure des feuilles . . . . .	61
4.5.2.6	La surface foliaire . . . . .	61
4.5.3	Les fruits et les graines . . . . .	61
4.5.3.1	Le diamètre des fruits . . . . .	62
4.5.3.2	Le poids frais des fruits . . . . .	62
4.5.3.3	Le nombre de graines contenues dans les fruits . . . . .	62
4.5.3.4	Le poids des graines . . . . .	62
4.5.3.5	Le pourcentage de graines avortées . . . . .	62

5	TRAITEMENT MATHÉMATIQUE DES DONNÉES . . . . .	62
6	ORIGINE ET ABBREVIATION DES SIX BIOTYPES . . . . .	63
6.1	<u>Origine des six biotypes</u> . . . . .	63
6.2	<u>Abréviation des six biotypes</u> . . . . .	63
7	RÉSULTATS ET DISCUSSIONS . . . . .	64
7.1	<u>Comptage chromosomique</u> . . . . .	64
7.2	<u>La germination</u> . . . . .	65
	7.2.1 Le stockage des graines . . . . .	65
	7.2.2 Modes de mise en germination . . . . .	66
	7.2.2.1 Germination en boîte de Petri . . . . .	66
	7.2.2.2 Germination en terre en serre tempérée . . . . .	66
7.3	<u>Choix du "biotope" cultural</u> . . . . .	70
7.4	<u>La phénologie</u> . . . . .	77
7.5	<u>La morphologie</u> . . . . .	81
	7.5.1 L'aspect général des plantes . . . . .	82
	7.5.2 Les feuilles . . . . .	85
	7.5.3 Les fruits et les graines . . . . .	89
8	RÉSUMÉ . . . . .	93
9	CONCLUSIONS DE LA DEUXIÈME PARTIE . . . . .	96

## 1 INTRODUCTION

Depuis la découverte des premières populations présentant une résistance chloroplastique aux triazines (Ryan, 1970; Bandeen & Mc Laren, 1976), ce mode de résistance a été observé chez plus d'une douzaine d'espèces végétales (Gressel et al., 1982) et décrit par Souza Machado et al. (1977) et Pfister & Arntzen (1979). Toutefois, les relations existant entre biotypes sensibles sauvages et biotypes sélectionnés par des traitements herbicides répétés sont encore inconnues.

En raison d'une croissance lente et d'une fructification tardive chez les individus résistants de *Chenopodium album*, Gressel (1979) postula que ces biotypes sont moins bien adaptés au milieu d'origine que les individus sensibles. De fait, Conrad & Radosevich (1979) ont montré une meilleure compétitivité des individus sensibles par rapport aux résistants chez *Senecio vulgaris* et *Amaranthus retroflexus*, comme l'ont montré, dans une moindre mesure, Marriage & Warwick (1980) chez *Chenopodium album*.

Ces observations sont en accord avec l'hypothèse émise par Gressel & Segel (1978) selon laquelle ces populations résistantes se sont développées après désherbage chimique, à partir de types résistants, normalement contre-sélectionnés en l'absence de traitement herbicide mais existant néanmoins en faible fréquence dans les stations.

Cependant, le manque de données sur les populations de ces individus résistants dans les populations originelles, ainsi que l'observation de l'extension de ces biotypes, même en l'absence de la pression de sélection due à l'herbicide (Gasquez et al., 1981), nous ont amenés à préciser les différences de comportement qu'ils pourraient présenter par rapport aux sensibles.

## 2 BUT DE LA DEUXIEME PARTIE

Cette deuxième partie nous permettra de présenter le matériel qui est à la base d'un tel travail de doctorat. Afin de connaître le matériel biologique, nous avons entrepris plusieurs cultures successives de la morelle noire (*Solanum nigrum* L.) que nous avons échelonnées sur une période de dix mois. Nous disposons de six biotypes de cette mauvaise herbe, trois résistants et trois sensibles à l'atrazine.

Cette approche devrait nous permettre, pour les six biotypes:

- de déterminer le degré de germination.
- de définir des conditions optimales de culture;
- d'apprécier la phénologie dans les conditions culturales choisies.
- de caractériser la morphologie.

Ainsi nous espérons maîtriser et résoudre un problème déterminant des sciences biologiques, qui est la "logistique" du matériel vivant. En effet, il est capital, lors d'une étude physiologique, d'optimiser et de standardiser les méthodes de culture afin que le matériel utilisé soit, dans les limites du monde vivant, aussi stable que possible. Au terme de cette étude, nous devrions être en mesure de choisir un biotype résistant et un biotype sensible bien distincts l'un de l'autre qui nous permettront d'aborder le thème principal de notre travail, qui est l'interaction des herbicides avec les lipides acylés des membranes thylacoïdales.

Dans cette deuxième partie, nous chercherons à obtenir:

- des conditions culturales permettant de suivre plusieurs cultures dans l'année.
- une production aussi faible que possible des éléments reproducteurs qui ralentissent la croissance et provoquent une augmentation des alcaloïdes dans les plantes (alpha, beta et gamma solanines, chaconines, solanocapsine, solasidine, solasonine, etc...) qui perturbent l'extraction de membranes fonctionnelles.
- un grand nombre de feuilles, avec une surface foliaire la plus grande possible.

### 3 MATERIEL

#### Identification de la plante

Une des espèces les plus répandues dans le genre *Solanum* (Solanaceae) est la plante connue sous le nom de morelle noire, *Solanum nigrum* L. (Edmonds, 1979; Weller & Phipps, 1978/79; Ogg et al., 1981). Elle est répertoriée dans 61 pays entre les latitudes 54° N et 45° S et dans 37 types différents de culture (Holm et al. 1977).

Bentham & Hooker, (1924) décrivent *Solanum nigrum* ainsi :

*annuelle ou bisannuelle, drassée à plusieurs ramifications et d'environ 30 cm de haut. En Angleterre généralement glabre ou presque et poilue ou rugueuse sur le Continent. Feuilles pétiolées, ovales à dents angulaires et irrégulières. Fleurs petites, blanches, disposées en cymes, voire même contractées en ombelles sur de courts pédoncules latéraux. Baies petites, noires, généralement globulaires, mais parfois, plus spécialement sur le Continent, vertes, jaunes ou légèrement allongées.*

## 4 METHODES

### 4.1 Comptage chromosomique

Pour ce comptage, nous avons utilisé l'extrémité de racines de plantules âgées de cinq jours et ayant germé au phytotron dans des boîtes de Petri.

- a) Pré-traitement dans une solution d'hydroquinoline pendant deux heures. Le pré-traitement provoque un raccourcissement des chromosomes qui rend leur comptage plus aisé.
- b) Fixation dans une solution composée d'une part d'acide acétique glacial et de trois parts d'alcool absolu.
- c) Pré-coloration en ajoutant à 15 ml de la solution précédente une goutte d'acétate de fer et dix gouttes de carmin acétique. Repos à l'obscurité et à température ambiante durant trois semaines.
- d) Coloration dans une solution de 5 ml de carmin acétique additionnée d'une goutte d'acétate de fer. Repos une heure, puis chauffage deux minutes sans ébullition. Adjonction de deux ml d'acide acétique à 45%.
- e) Observation d'un mm d'extrémité radiculaire placé entre lame et lamelle dans une goutte de solution de coloration. Ecrasement de la préparation par pression (squash). Comptage au microscope à immersion.

### 4.2 Germination

#### 4.2.1 Extraction et stockage des graines

Les fruits sont pressés et les graines nettoyées sous un courant continu d'eau froide (Holm *et al.*, 1977). Les graines sont soit directement semées, soit séchées sur papier buvard à température ambiante pendant 2-3 jours puis stockées au réfrigérateur (+4°C) dans des récipients fermés.

#### 4.2.2 Germination dans le phytotron en boîte de Petri

Nous avons utilisé des boîtes de Petri en plastique de 7 cm de diamètre au fond desquelles est disposé un papier buvard mouillé en permanence avec de l'eau distillée. Aucune solution nutritive n'est rajoutée. Cent graines par population et par boîte constituent notre échantillon.

#### 4.2.3 Germination en terre dans la serre

Des bacs à semis en Eternit (23x13x6 cm) sont remplis avec un mélange complet de terre, composé de 6 parts de terre franche, 1-2 part(s) de sable grossier et d'un  $\text{Kg/m}^3$  d'engrais complet (HATO). Chaque bac à semis a été séparé en son milieu par une planchette de bois permettant de semer deux populations par bac. Le jour de la mise en germination, les semis sont arrosés avec une solution contenant un fongicide (PREVICUR) concentré à 0.1%. Les semis sont recouverts d'une fine couche de terre tamisée.

#### 4.3 Choix du "biotope" cultural

Trois possibilités nous étaient offertes à l'Institut de Botanique de l'Université de Neuchâtel :

- la culture en serre tempérée
- la culture en phytotron
- la culture en couche à l'extérieur

##### 4.3.1 La culture en serre tempérée

Nous avons choisi, pour toutes nos cultures, le même mélange complet de terre décrit sous le point 4.2.3.

Lorsque les plantes ont atteint le stade de l'émission des cotylédons et/ou de la première feuille, ils sont transférés des bacs à semis dans des pots en terre cuite de 7 cm de diamètre, à raison d'une plante par pot. Les pots sont alors disposés sur des plateaux pour en faciliter le maniement. Il est à noter que si la transplantation est trop tardive, les plantules subissent vraisemblablement un traumatisme et, de ce fait, développent rapidement leur appareil reproducteur (Penel et al., 1985).

La température et l'humidité relative ont été mesurées tout au long de notre étude à l'aide d'un thermohygromètre (GIR-17). Le nombre d'heures d'éclairage diurne quotidien nous a été communiqué par les services de l'observatoire de Neuchâtel (Jornod, 1987). De novembre à début février, nous avons suppléé au faible éclairage diurne par un complément de lumière artificielle fourni par six ampoules de 75W entourées d'une corolle en aluminium qui permet d'augmenter l'irradiance au niveau des plantes.

##### 4.3.2 La culture en phytotron

Nous n'avons cultivé qu'une population dans le phytotron avec le même matériel décrit précédemment, les conditions étant les suivantes :

- photopériode	14 h de lumière de 0700 à 2100 10 h d'obscurité de 2100 à 0700						
- irradiance	2.5 mW/cm <sup>2</sup> lampes Osram-L-fluora 65W/77R, Sylvania grolux F65 TL/6RO, Philips (pope) FT 65W/34 de luxe						
- température et humidité	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">température(°C) humidité(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>jour :</td> <td>26 70</td> </tr> <tr> <td>nuit :</td> <td>20 85</td> </tr> </tbody> </table>	température(°C) humidité(%)		jour :	26 70	nuit :	20 85
température(°C) humidité(%)							
jour :	26 70						
nuit :	20 85						

#### 4.3.3 La culture en couche à l'extérieur

Les morelles ont été cultivées dans le jardin expérimental après que leurs germination et initiation de croissance se soient déroulées en serre.

#### 4.4 La phénologie

Remarque: phénologie et morphologie sont basées sur un échantillonnage de 50 individus lors de chaque culture et pour chaque biotype.

##### 4.4.1 Détermination du nombre de feuilles émises jusqu'au premier pédoncule floral

Elle se fait par simple dénombrement, la paire de cotylédons comptant pour un.

##### 4.4.2 Mesure de la hauteur

Mesurée en cm, elle s'effectue au moyen d'une règle métallique graduée. La mesure porte sur la distance séparant le collet du méristème apical le plus élevé.

#### 4.4.3 Détermination du nombre de fruits mûrs portés par le premier pédoncule floral

Elle se fait également par simple comptage des fruits mûrs (violets ou jaunes) portés sur le premier pédoncule reproducteur.

#### 4.5 La morphologie

Nous avons porté notre attention sur trois paramètres:

- l'aspect général des plantes
- les feuilles
- les fruits

##### 4.5.1 L'aspect général des plants

Il dépend, outre de la hauteur, du nombre de ramifications de la tige et du diamètre de cette dernière, qui peut déterminer un port plutôt érigé ou couché du végétal. Le diamètre est mesuré à l'aide d'un calibre et exprimé en cm.

##### 4.5.2 Les feuilles

Six paramètres de la 8ème ou 9ème feuille de chaque plante seront étudiés:

- le poids sec
- la longueur du pétiole
- la pilosité
- le nombre de dents
- l'indice de découpe
- la surface

###### 4.5.2.1 Le poids sec des feuilles

est déterminé en mg, après séchage des feuilles à 35°C, pendant trois semaines.

###### 4.5.2.2 La longueur des pétioles foliaires

est mesurée à l'aide d'une règle et exprimée en cm.

## 4.5.2.3 La pilosité des feuilles

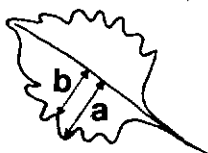
est déterminée à l'aide d'une loupe binoculaire à faible grossissement (10x). Elle porte sur une portion d'un cm<sup>2</sup> située arbitrairement au centre de la face abaxiale de la feuille, à droite de la nervure principale. Cette portion est déterminée par un cache.

## 4.5.2.4 Le nombre de dents foliaires

est déterminé par simple comptage.

## 4.5.2.5 L'indice de découpage des feuilles (I.d.f)

tient compte de la profondeur des découpures et fait abstraction de la grandeur des feuilles, toujours très variable d'un individu à l'autre. Cet indice est le rapport entre la profondeur du sinus entre deux lobes foliaires et la largeur du lobe, mesurée de la nervure principale jusqu'à l'extrémité d'un lobe moyen d'une feuille caulinaire (Gremaud, 1981).



$$\text{I.d.f} = \frac{b}{a}$$

lorsque l'indice tend vers un, la feuille est entière, lorsqu'il tend vers zéro, la feuille est très découpée.

## 4.5.2.6 La surface foliaire

est déterminée à l'aide d'un appareillage digital "Automatic Area Meter" (AAM-S Hayaski Denka) qui permet une lecture directe de la surface en cm<sup>2</sup>.

## 4.5.3 Les fruits et les graines

Cette étude tient compte de 50 fruits récoltés au hasard sur chaque plant.

Cinq paramètres sont considérés :

- le diamètre
- le poids frais
- le nombre de graines par fruits
- le poids des graines
- le pourcentage de graines avortées

#### 4.5.3.1 Le diamètre des fruits

dont la mesure s'effectue à l'aide d'un calibre et qui est exprimée en cm.

#### 4.5.3.2 Le poids frais des fruits

déterminé par pesée directe juste après la récolte des fruits et exprimé en mg.

#### 4.5.3.3 Le nombre de graines contenues dans les fruits

est déterminé par simple comptage.

#### 4.5.3.4 Le poids des graines

correspond à une pesée directe basée sur cent graines.

#### 4.5.3.5 Le pourcentage de graines avortées

est estimé par comptage du nombre de graines dans des fruits immatures (n=25) et exprimé par rapport au nombre de graines contenues dans des fruits mûrs (n=25).

## 5 TRAITEMENT MATHEMATIQUE DES DONNEES

Face à la grande quantité de données traitées, nous avons opté pour un traitement statistique par l'informatique. Pour ce faire, nous avons utilisé les ordinateurs VAX / VMS du centre de calcul de l'Université de Neuchâtel et nous nous sommes appuyés sur les modes de langages et logiciels suivants :

- "EDT" pour l'entrée des données numériques
- "FORTRAN" pour les programmes se rapportant aux données numériques de l'éditeur EDT
- "P-STAT" pour le traitement purement statistique

## 6 ORIGINE ET ABBREVIATION DES SIX BIOTYPES

### 6.1 Origine des six biotypes

Quatre biotypes nous ont été offerts par M. le Dr J.. Gasquez de l'INRA (Dijon, France).

Un biotype nous a été offert par M. le Dr E. Beuret de la Station de Recherches Agronomiques de Changins (Suisse).

Un biotype a été récolté dans des cultures de vigne de la région neuchâteloise (Suisse).

### 6.2 Abréviation des six biotypes

Comportement des biotypes vis-à-vis de l'herbicide :

R - résistants

S - sensibles

Couleur des baies :

j - jaunes

n - noires

Provenance des biotypes :

F - France

CH - Suisse

Avant de commencer cette étude, les six biotypes ont été mis en culture, les fruits récoltés et les graines extraites. Ainsi les graines des différents biotypes auront subi le même traitement et auront toutes le même âge lorsqu'elles seront mises en germination pour cette étude phénologique et morphologique.

## 7 RESULTATS ET DISCUSSIONS

7.1 Comptage chromosomique

Chez *Solanum nigrum*, on a décrit de nombreuses sous-espèces et variétés fondées sur la couleur et la forme des baies et pourtant dans *Florea europea*, les plantes à baies jaunes et globuleuses ne peuvent être déterminées. En fait ce complexe est composé de trois niveaux de ploïdie:  $2n=24$  et  $2n=48$  qui sont à l'origine de l'hexaploïde  $2n=72$  (Tandon & Rao, 1966). Les plus répandus sont les tétraploïdes (*S. luteum*) qui ont des baies plutôt allongées, jaunes, orangées ou rouges et surtout les hexaploïdes (*S. nigrum*) avec des baies globuleuses noires. La distinction de sous-espèces par la couleur des baies apparaît comme superflue, car les populations sont souvent mixtes avec des individus hétérozygotes pour ce caractère. Chez les hexaploïdes, le déterminisme est monogénique avec dominance du noir sur le jaune (Gasquez et al., 1981). En fait, il n'existerait que deux sous-espèces de *Solanum nigrum* hexaploïde, qui sont la sous-espèce *nigrum* à poils non glanduleux et la sous-espèce *schultesii* à poils glanduleux (Weller & Phipps, 1978).

Nous avons entrepris un comptage chromosomique afin de vérifier que nos six biotypes appartiennent bien au même niveau de ploïdie. Ainsi, les six populations sont hexaploïdes à 72 chromosomes (Fig.1).

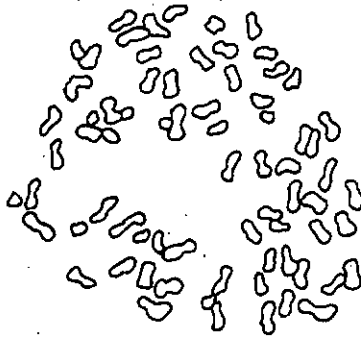


Fig. 1: Noyau cellulaire en division, vu au microscope (1500 X). Dessin obtenu par projection en chambre claire-prisme à miroir.

Les trois populations résistantes ainsi que les trois populations sensibles appartiennent au même degré de ploïdie. En outre, déjà Gasquez et Compout (1981) relataient que les individus résistants aux triazines d'une population de *Chenopodium album* ne sont constituées que d'un seul phénotype.

## 7.2 La germination

### 7.2.1 Le stockage des graines

Trois méthodes de conservation des graines sont communément utilisées (Holm et al., 1977):

- conservation à température ambiante des graines sèches.
- envelopper les graines dans du papier et les mettre dans du sable humide maintenu à 17°C.
- conservation à 4°C des graines sèches dans un récipient fermé.

Les deux premières méthodes présentent le désavantage de faire germer les graines uniquement sous l'influence d'une forte alternance de température (Lauer, 1953; Steinbauer et al., 1955; Wakhloo, 1964), alors qu'un stockage à 4°C permet aux graines de germer sitôt celles-ci mises en germination en condition humide et à température ambiante. Nous avons donc choisi ce dernier mode de conservation, puisqu'il permet une germination au phytotron où la température est relativement constante. De plus, il présente un taux de germination supérieur à ceux résultant des autres modes de stockage (Rogers & Ogg, 1981).

Les graines conservées sèches à température ambiante germent très bien après un mois de stockage (Burget & Brunside, 1972), mais leur longévité n'est que de deux ou trois ans (Givelberg & Horowitz, 1984), alors qu'à basse température, nous pouvons compter sur un taux de germination satisfaisant (70-100%) sur une longue période (jusqu'à six ans).

## 7.2.2 Modes de mise en germination

## 7.2.2.1 Germination en boîte de Petri

Ce mode de germination a toujours été effectué au phytotron, en conditions stables mais avec des graines d'âge différent (Tab.I).

CONDITIONS		% DE GERMINATION AU PHYTOTRON DANS H2O					
AGE DES GRAINES (MOIS)		0*	3	4	6	10	20
B	R/j/F	100.0	90.0	80.9	86.5	62.0	?
I	S/j/F	98.0	100.0	100.0	97.3	100.0	?
O							
T	R/n/F	100.0	100.0	100.0	99.7	100.0	?
Y	S/n/F	100.0	100.0	99.0	99.7	100.0	?
P							
E	R/n/CH	88.0	100.0	94.3	81.2	96.0	100.0
S	S/n/CH	88.0	90.0	59.0	81.2	90.0	95.0

\* Germination des graines sitôt après leur extraction des fruits.

Tab. I: Pourcentage de germination dans des boîtes de Petri au phytotron de graines d'âge différent des six biotypes.

Nous constatons, pour les graines de tous les biotypes et à tous les âges confondus, un taux élevé de germination ( $93 \pm 10\%$ ) lorsque celle-ci est effectuée dans des boîtes de Petri au phytotron et soumise à des conditions physico-chimiques constantes. Dans le laps de temps étudié, l'âge des graines ne semble pratiquement pas affecter le pourcentage de germination; des graines âgées de vingt mois ont encore un pourcentage maximal de germination pour le biotype R/n/CH. Par contre Ogg & Dawson (1984) ainsi que Givelberg & Horowitz (1984) observent une baisse de la germination en fonction du temps chez les graines de *Solanum nigrum* âgées entre six et douze mois. Comme le montre le Tab.I., il n'est pas possible de différencier les biotypes entre eux sur la base de leur taux de germination en boîte de Petri au phytotron, bien que les taux de germination du biotype R/j/F diminuent légèrement en fonction du temps de stockage.

## 7.2.2.2 Germination en terre en serre tempérée

Nous ne considérerons plus l'âge des graines puisqu'il ne semble pas influencer le pourcentage de germination, pour des graines âgées de vingt mois ou moins, mais plutôt l'époque de l'année pendant laquelle ces graines ont été mises à germer en conditions physico-chimiques variables (Tab.II).

CONDITIONS		SERRE / TERRE (% de germination)			
EPOQUE		DECEMBRE	AVRIL	MAI	JUILLET
B	R/j/F	4.3	32.1	?	30.0
I	S/j/F	15.7	56.2	?	41.0
O					
T	R/n/F	2.0	28.3	?	45.0
Y	S/n/F	0.0	19.8	?	79.0
P					
E	R/n/CH	2.7	7.7	26.0	3.0
S	S/n/CH	1.7	34.7	30.8	23.0

Tab. II: Germination des graines des six biotypes en terre et dans la serre à différentes époques de l'année.

Dans ce 2ème tableau, nous observons, pour les graines de tous les biotypes et aux quatre époques de l'année confondus, une moins bonne homogénéité entre les différents biotypes et surtout une forte baisse des pourcentages de germination ( $23.5 \pm 20.9\%$ ) par rapport aux germinations effectuées en phytotron ( $93.0 \pm 10\%$ ). Il apparaît également que les germinations effectuées en hiver présentent des taux très faibles, alors qu'au printemps ils tendent à augmenter. Ainsi, au mois de décembre alors que l'éclairement ( $< 11$  h) et la température ( $< 20$  °C) sont faibles, le taux de germination est également faible, voire nul (0 - 15.7%), ce que Robert & Lockett (1978) mirent déjà en évidence chez la même mauvaise herbe. Par contre, des graines semées au printemps, quand la température et la durée d'éclairement s'accroissent (Fig.3), les pourcentages de germination augmentent sensiblement (7.7 - 56.2%), et en juillet, les taux de germination sont encore élevés (3 - 79%).

Il apparaît de fortes variations dans les pourcentages de germination entre les biotypes, mais pas de manière régulière aux différentes époques de l'année prises en considération. Néanmoins, on constate, considéré globalement pour les mois d'avril, mai et juillet, un plus fort pourcentage de germination chez les biotypes sensibles que chez les résistants (Tab.III).

BIOTYPES	% de germination	
	sensibles	résistants
j/F	48.6	31.1
n/F	49.4	36.7
n/CH	29.5	12.2

Tab. III: Pourcentages de germination des différents biotypes considérés globalement pour les mois d'avril, mai et juillet.

Le facteur externe limitant la germination est la température (Courtenay, 1968), cependant il existe un lien étroit entre la température et l'éclairement (Toole et al., 1955). Lorsque la température est constante, la germination optimale a lieu entre 20 et 30°C (Burgert & Burnside, 1972; Givelberg & Horowitz, 1984) avec alternance de périodes lumineuses et obscures. Un faible taux de germination est obtenu seulement sous lumière continue avec une température avoisinant 15°C, de même qu'à l'obscurité totale et à une température de 35°C (Singh, 1970).

D'une manière générale, nous avons observé un meilleur pourcentage de germination en phytotron qu'en serre. Dans ce dernier cas, le taux de germination oscille entre 0 et 16% en décembre pour une température variant entre 15 et 21°C et passe en avril de 8 à 56% pour une température située entre 18 et 23°C. Il atteint en juillet 79% aux températures variant entre 22 et 28°C (Tab.2). Notons à propos de ce dernier taux, que la serre joue un rôle tampon relativement à la température. En effet, l'amplitude de variation entre les températures diurnes et nocturnes est fortement atténuée, ce qui n'est pas le cas dans la nature où les plantes doivent affronter une amplitude de température plus grande qui peut, ainsi, devenir un facteur limitant (Ogg & Dawson, 1981). En outre, les germinations en boîte de Petri au phytotron sont plus homogènes dans le temps que les germinations effectuées en terre en serre tempérée (Fig.2). Les graines cessent de germer après environ 20 jours en boîte de Petri au phytotron, alors qu'environ 40 jours sont nécessaires en terre en serre tempérée.

Sans étudier en détail le phénomène de la dormance, il apparaît que celle-ci serait induite par les chaleurs de l'été (Courtenay, 1968) et prolongée par les froids de l'hiver jusqu'en février (Givelberg et al., 1984), lorsque les alternances de température provoquent sa levée (Koch, 1970; Feast & Roberts, 1970; Roberts & Boddrell, 1983). La levée de la dormance est due à un changement dans l'équilibre stimulateurs - inhibiteurs à l'intérieur de la graine, la germination survenant lorsque cet équilibre se déplace vers la stimulation (García-Baudin & Aguirre, 1983). La dormance n'est pas uniquement thermolabile, mais également photolabile. En effet, lors de la germination en boîte de Petri, les graines sont en contact direct avec la lumière et nous avons constaté que le pourcentage de germination est supérieur, comparé à celui des graines recouvertes d'une couche de terre. Ceci pourrait mettre en évidence une photosensibilité positive. La dormance serait alors de type tégumentaire: la lumière captée par un photorécepteur, le phytochrome, localisé dans l'embryon, déclenche un mécanisme qui permet de surmonter l'inhibition germinative due aux téguments (Heller, 1979).

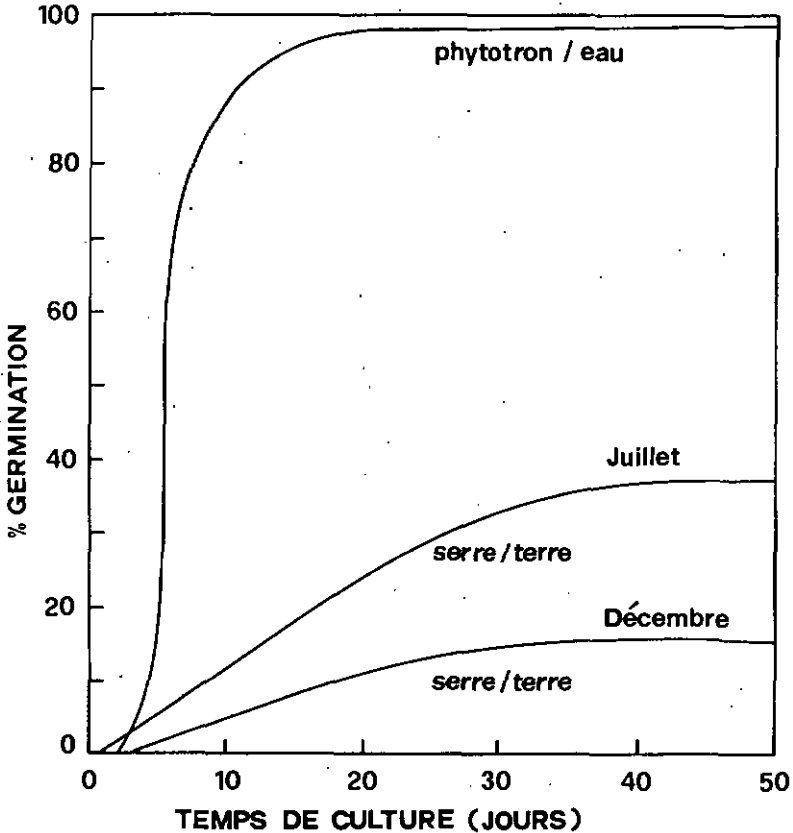


Fig. 2: Pourcentage de germination du biotype S/j/F en fonction du temps de culture en phytotron et en serre tempérée à deux époques de l'année.

Des cas de dormance atteignant 39 ans ont été signalés chez des graines de *Solanum nigrum* profondément enfouies dans le sol (Toole & Brown, 1946), mais généralement, à la faveur des labours, les graines de morellé germent au printemps de l'année suivant les moissons.

La dormance peut être évitée lorsque des graines sont semées mouillées, après leur extraction des fruits mûrs (Wakhloo, 1964). Dans ce cas, le taux de germination est élevé (dans notre cas 88 et 100%), mais les semences sont peu aisées. Dans le cas d'extraction des graines de fruits immatures, le pourcentage de germination est faible, (entre 2 et 22%).

### 7.3 Choix du "biotope" cultural

Les facteurs externes (température, humidité relative, photopériode) de même que le temps nécessaires à la maturation des cinq cultures sont représentés dans la Fig.3.

Par souci de clarté, nous comparerons le biotype S/j/F cultivé soit au phytotron, soit en serre tempérée, et ceci à cinq époques de l'année (Figs 4, 5 et 6). Néanmoins, nous avons étudié et quantifié les différentes conditions de culture pour les cinq autres biotypes, il nous est apparu superflu de les présenter car le comportement de ces biotypes est proche de celui de S/j/F, pris ici comme exemple.

Concernant la culture en couche, nous n'avons pas fait de mesure, nous limitant à estimer la croissance et l'aspect général des différents biotypes. En effet, il nous est rapidement apparu que les cultures à l'extérieur n'offraient pas un matériel adéquat à notre étude (long temps de culture, surface foliaire petite, feuilles endommagées par les intempéries).

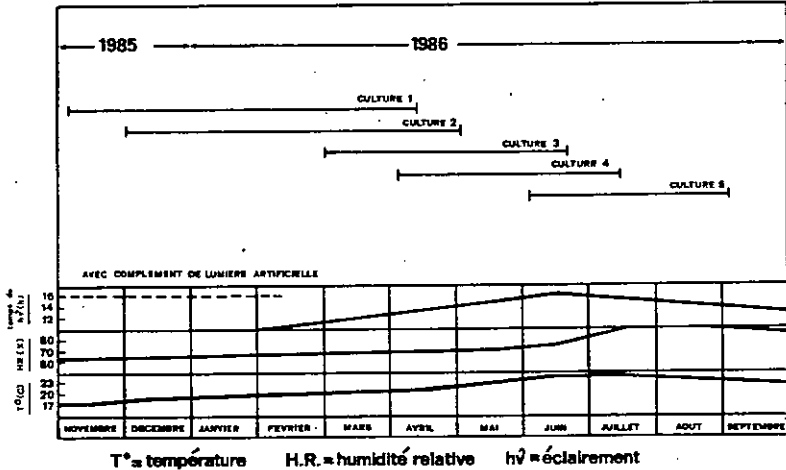


Fig. 3: Paramètres et conditions de culture en serre tempérée. Pour plus d'information, voir le texte.

Pendant dix mois, nous avons entrepris cinq cultures successives (Fig. 3). Dans cette figure, nous avons représenté les époques de l'année pendant lesquelles les cultures ont été effectuées ainsi que les conditions extérieures principales. Le nombre d'heures de lumière diurne nous a été communiqué par les services de l'Observatoire de Neuchâtel (Jornod, 1987). De novembre à début février, nous avons suppléé à la courte période lumineuse par un complément de lumière artificielle. L'humidité relative ainsi que la température ont été mesurés tout au long de notre étude à l'aide d'un thermohygromètre (GIR-17). Nous constatons que pour atteindre le même état de croissance les cultures nécessitent moins de temps lorsque la période d'éclairciment s'allonge (de novembre 1985 à début septembre 1986). Par contre, le temps de culture s'allonge à nouveau lorsque les heures de lumière diminuent (septembre - décembre 1986), résultats non montrés. Ainsi, il est possible d'augmenter le nombre de cultures à six, voire sept par année, de mars à septembre, en ne laissant qu'un mois d'intervalle entre chaque germination. Les facteurs limitants ne sont alors, plus que la place disponible dans la serre tempérée et le temps nécessaire pour effectuer les expériences physiologiques et biochimiques.

Le début de la croissance, estimé par le nombre de feuilles émises jusqu'à l'apparition du premier pédoncule floral du biotype S/j/F, varie sensiblement pour les différentes cultures considérées (Fig.4). Pour les cultures hivernales (cultures 1 et 2), le temps et le nombre de feuilles émises jusqu'à l'apparition du premier pédoncule floral sont grands. Pour les trois autres cultures (3, 4 et 5), le temps d'apparition du premier pédoncule floral varie relativement peu (28 à 42 jours); par contre, le nombre total des feuilles augmente (résultats non montrés). Cette observation est en étroite corrélation avec l'augmentation du temps d'exposition journalier à la lumière. Concernant la culture au phytotron, le temps nécessaire à l'apparition des premiers organes reproducteurs est court, ce qui paraît normal puisque la période de lumière est maximale (16 heures); la plante va ainsi rapidement chercher à se reproduire. Il semble donc bien exister une relation de cause à effet entre le nombre d'heures de lumière et l'apparition des premiers organes reproducteurs.

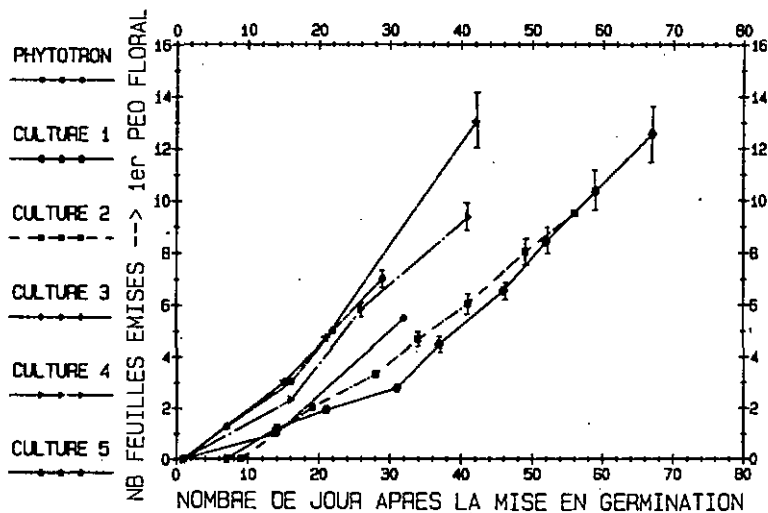


Fig.4 Nombre de feuilles émises jusqu'à l'apparition du premier pédoncule floral en fonction du nombre de jours de culture en phytotron et en serre tempérée à 5 époques de l'année

La hauteur du biotype S/j/F varie sensiblement pour les différentes cultures en serre considérées (Fig.5). De l'automne à l'été, la taille des plantes s'accroît et le temps nécessaire jusqu'à l'achèvement de la croissance de la plante diminue. Quant au phytotron, où la période d'éclairement est de 16 h mais sans variation du photopériodisme, les plantes sont plus petites et poussent lentement. Ainsi, la morelle serait sensible à l'alternance des périodes lumineuse et obscure. Lorsque cette alternance est en faveur de la période lumineuse la croissance de la plante tend à être optimale.

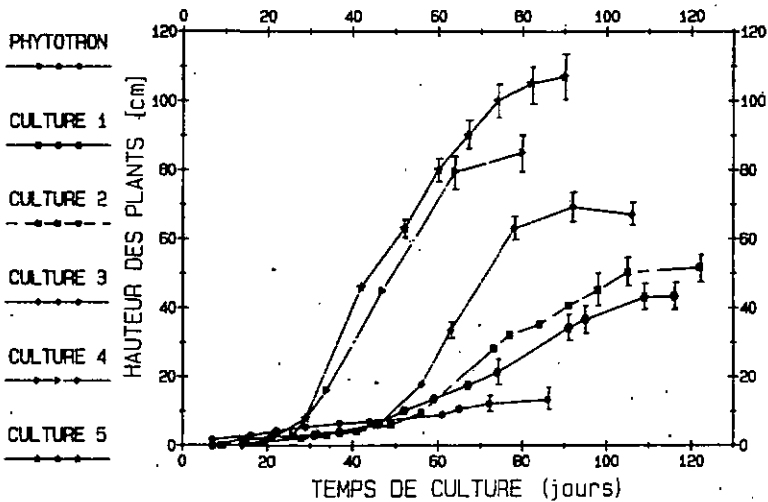


Fig.5 Hauteur des plantes (S/j/F) en fonction du temps de culture en phytotron et en serre tempérée à 5 époques différentes de l'année

Par la mesure du nombre de fruits mûrs portés par le premier pédoncule floral du biotype S/j/F (Fig.6), il est possible de déterminer le moment où la plante cesse de grandir et entre dans la phase de sénescence. On observe que lorsque les jours sont courts, la plante ne développe que tardivement son appareil reproducteur (culture 1 et 2). Par contre on ne peut pas observer un lien entre la hauteur des plantes (Fig.5) et le nombre d'éléments reproducteurs portés par les pédoncules floraux: une plante vigoureuse (taille élevée) développe un nombre d'organes reproducteurs voisin de celui d'une plante chétive (taille petite). Ainsi, bien que certaines conditions ne semblent pas favorables pour une culture optimale de *Solanum nigrum*, cette mauvaise herbe est dotée d'un haut pouvoir de reproduction dans diverses conditions culturales et pendant une longue période de l'année.

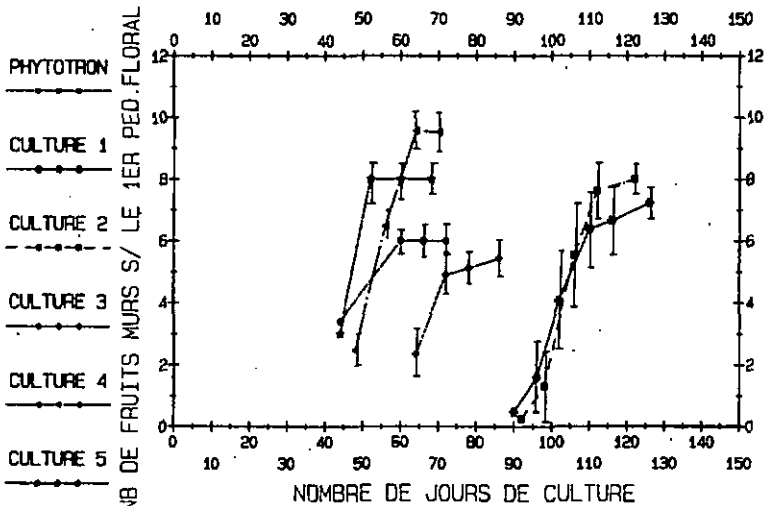


Fig.6 Nombre de fruits mûrs portés par le 1er pédoncule floral en fonction du nombre de jours de culture en phytotron et en serre tempérée à cinq époques différentes de l'année

Nous référant au but de cette troisième partie (recherche de conditions culturales afin d'obtenir: i) plusieurs cultures dans l'année, ii) une production faible et lente des organes reproducteurs et iii) un grand nombre de feuilles avec une surface foliaire la plus grande possible), nous constatons que les conditions optimales ne sont pas obtenues facilement. En effet, la culture en couche (résultats non montrés) ne présente que peu d'avantages. Quant à la culture en phytotron, elle offre l'avantage d'être précoce et de produire peu d'éléments reproducteurs. Par contre, la hauteur des plants est très faible et la croissance lente. Quant aux cultures en serre, nous observons que la culture "hivernale" est défavorable. Par contre, dès le mois de mars et jusqu'à septembre, plusieurs paramètres intéressants sont réunis:

- initiation rapide de la culture
- hauteur et nombre de feuilles des plantes élevés .
- croissance rapide
- nombre de fruits portés par le premier pédoncule floral comparable aux autres cultures

Ainsi, les conditions les plus favorables semblent être réunies lors de la culture en serre tempérée, entre mars-avril et septembre.

Par ailleurs, *Solanum nigrum* est reconnue pour être une plante de jour court. Elle développe un appareil végétatif lorsque les jours sont longs, fleurit sitôt que ceux-ci diminuent et termine la maturation des fruits aux portes de l'hiver. Il est à noter qu'une grande variabilité existe, et que, bien souvent la floraison peut commencer en avril ou en juin-juillet pour des graines semées en mars (Keeley & Thullen, 1983).

La morelle est une plante de pleine lumière (Landolt, 1977) voire d'endroits modérément ensoleillés (Häfliger & Brun-Hool, 1968), et décrite par Singh (1971) comme héliophyte en hiver et sciaphyte pendant les mois chauds de l'été. Elle est également reconnue pour être une plante d'endroits modérément chauds (jusqu'à 30°C) et humides (Keeley & Thullen, 1983).

Comme nous le constatons, les avis divergent entre auteurs et les conditions optimales ne semblent pas être chose aisée à définir, l'interaction entre différents paramètres tels que: sol - température - photopériode - humidité doit jouer un rôle important. Néanmoins, nous sommes en mesure d'effectuer un premier choix dans la culture de la morelle, qui se porte sur une culture en serre tempérée dans la période de mars-avril à septembre.

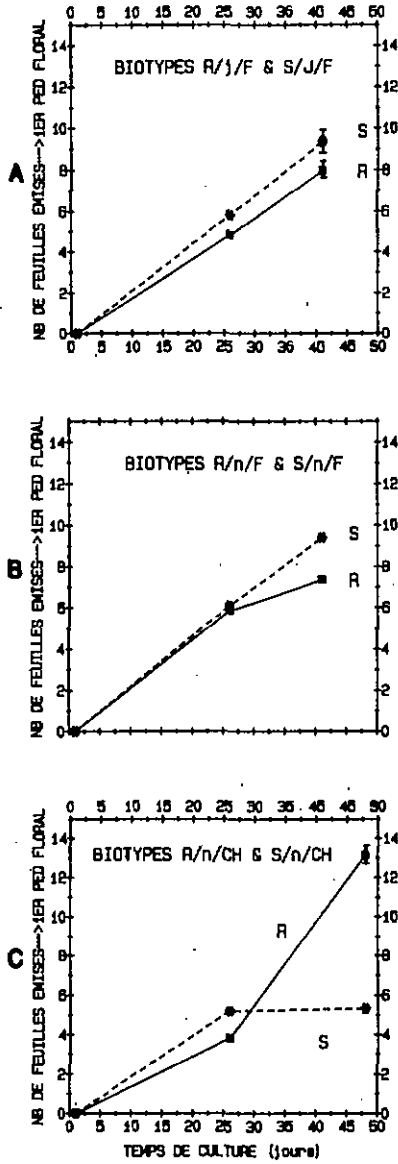


Fig.7 Nombre de feuilles émises jusqu'à l'apparition du premier pédoncule floral des différents biotypes cultivés lors de la culture 4 (avril à mi-juillet).

#### 7.4 La phénologie

Comparant maintenant les différents biotypes entre eux, nous nous sommes limités à ne présenter que la culture 4 (avril - juillet) puisque c'est durant cette époque de l'année et un peu au delà que nous utilisons les morelles pour notre étude physiologique portant sur l'interaction des herbicides avec les membranes thylacoidales.

Considérons les mêmes paramètres que sous le point 7.3 :

- nombre de feuilles émises jusqu'à l'apparition du premier pédoncule floral (Fig.7).
- hauteur des plantes (Fig.8).
- nombre de fruits portés par le 1er pédoncule floral (Fig.9).

Ces trois paramètres nous permettent de caractériser la plante lors d'une culture complète, depuis l'initiation de la croissance en passant par le stade de pleine croissance et jusqu'à la sénescence.

Si l'on considère la vitesse d'apparition du premier pédoncule floral ainsi que le nombre de feuilles émises jusqu'à ce stade (Fig.7), on constate qu'ils diffèrent légèrement d'un biotype à l'autre. Les biotypes sensibles sont un peu plus précoces et émettent un nombre de feuilles plus faible que les résistants correspondants. La différence la plus marquée apparaît chez les biotypes suisses où la population sensible a déjà émis le premier pédoncule floral après 26 jours de culture, alors que la population résistante n'a émis que 59 % de feuilles avant d'atteindre ce stade. Mais, si l'initiation de la croissance du biotype R/n/CH est lente, une fois celle-ci amorcée, elle est beaucoup plus rapide (0.62 feuille/j) que celle du biotype S/n/CH (0.27 feuille/j). Le biotype S/n/CH a toujours été le plus précoce et R/n/CH le plus tardif comparés aux cinq autres biotypes.

Ainsi, il ressort de cette première analyse que le développement du premier pédoncule floral apparaît un peu plus tard chez les biotypes résistants que chez les sensibles correspondants, que le nombre de feuilles émises jusqu'à l'apparition du premier pédoncule floral est plus important chez S/j/F et S/n/F que chez les résistants correspondants, ce qui ne se vérifie pas chez les biotypes suisses. Et, finalement, que les plus grandes différences apparaissent entre ces mêmes biotypes suisses.

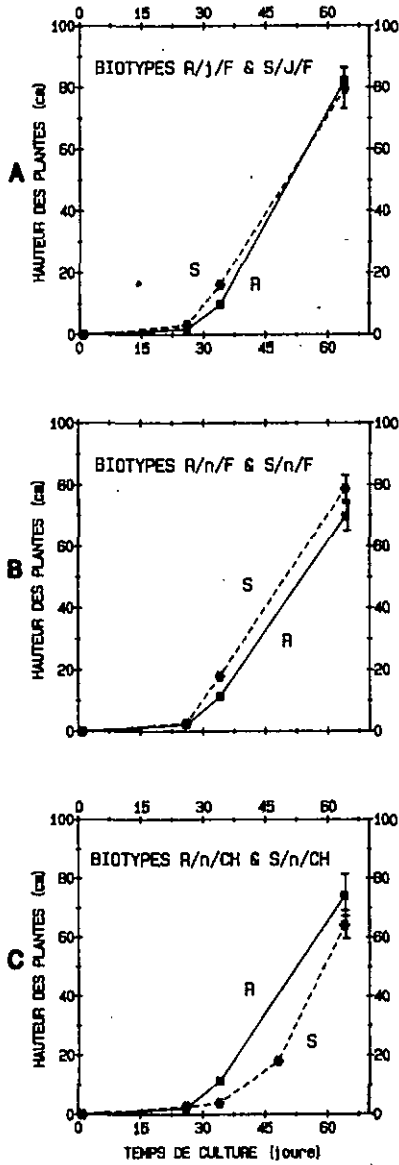


Fig. 8 Hauteur des différents biotypes cultivés lors de la culture 4 (avril à mi-juillet).

Si l'on considère la hauteur des différents biotypes (Fig.8), il apparaît que les biotypes résistants sont légèrement plus petits, jusqu'au 26ème jour de culture, que les sensibles correspondants. Par contre, les biotypes R/j/F et R/n/CH dépassent les biotypes sensibles correspondants, mais après un temps de culture différent (55 et 27 jours, respectivement). Ainsi, si les biotypes résistants sont plus tardifs, ils deviennent plus vigoureux en fin de culture. Ceci ne s'observe pas chez R/n/F qui reste tout au long de la culture plus petit que S/n/F. Il est à noter que les deux biotypes sensibles français ont un comportement très proche entre eux, et qu'il en va de même pour les trois biotypes résistants. Seul le biotype S/n/CH croît lentement et n'atteint pas la hauteur des autres biotypes, des écarts de hauteur pouvant aller jusqu'à 18 cm entre R/j/F et S/n/CH. Pourtant la différence de hauteur entre les trois biotypes résistants confondus et les trois biotypes sensibles également confondus n'est que de 4 cm, en faveur des résistants.

Ainsi, il apparaît que les biotypes résistants sont plus tardifs que les sensibles bien que leur hauteur soit supérieure en fin de culture.

En ce qui concerne le nombre de fruits portés par le premier pédoncule floral (Fig.9), on constate que les deux biotypes sensibles français ont un comportement voisin. Par contre le biotype sensible suisse est plus précoce et moins productif que les cinq autres biotypes. Quant aux biotypes résistants, ils ont une phénologie décalée dans le temps, R/n/F étant le plus précoce et R/n/CH le plus tardif; leur productivité, ainsi que leur vitesse de production de baies sont comparables. D'une manière générale, les biotypes sensibles sont quelque peu plus productifs que les résistants (8.17 et 8.07 fruits portés sur le premier pédoncule floral, respectivement), la différence la plus marquée étant de 3.1 entre S/j/F et S/n/CH.

Ainsi, on constate que les biotypes français ont un comportement très voisin. Par contre les biotypes suisses sont, soit précoces et peu productifs (S/n/CH), soit tardifs et productifs (R/n/CH).

Afin de pouvoir comparer tous les biotypes entre eux, nous avons donné des appréciations semi-quantitatives allant de un à six, six étant la meilleure, pour chacun des paramètres mesurés (Tab.IV).

	NB FEUILLES		HAUTEUR		NB DE FRUITS		TOTAUX	
	V	P	V	P	V	P	TV	TP
R/j/F	6	6	2	2	3	3	11	11
S/j/F	5	5	3	6	2	5	10	16
R/n/F	2	2	5	3	5	2	12	17
S/n/F	4	4	4	4	4	4	12	12
R/n/CH	3	3	1	5	1	6	5	14
S/n/CH	1	1	6	1	6	1	13	3

Tab. IV: Appréciation globale de la vitesse de croissance et de la productivité des différents biotypes. V est la vitesse et P la productivité. TV est le total des vitesses et TP le total des productivités.

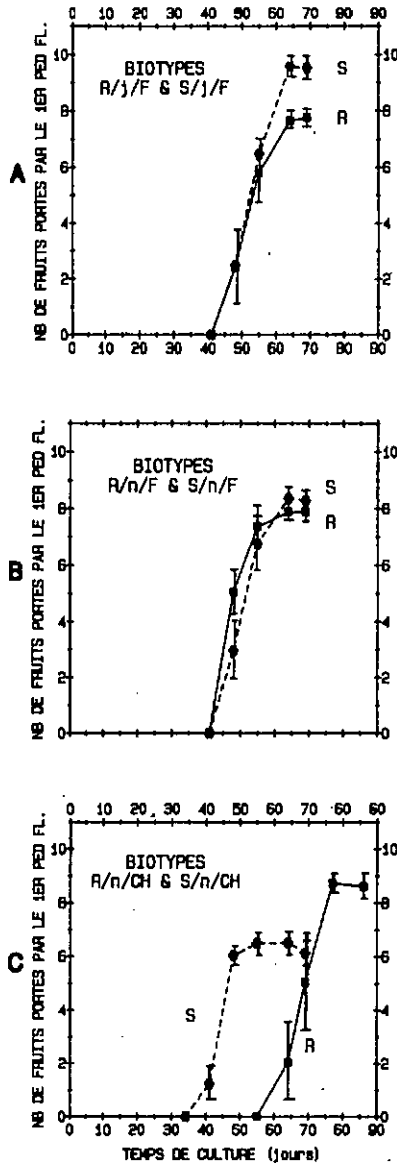


Fig.9 Nombre de fruits portés par le premier pédoncule floral des différents biotypes cultivés lors de la culture 4 (avril à mi-juillet).

Ainsi, S/n/CH est le plus précoce, mais le moins productif et R/n/CH le plus tardif, mais pas le plus productif, puisque S/j/F est quelque six cm plus grand. Au vu du Tab. IV il est difficile de différencier les biotypes résistants français ainsi que S/n/F quant à leur précocité, tout comme il n'est pas aisé de faire la différence entre la productivité de R/j/F et S/n/F. D'une manière générale, il n'y a pas de grosse différence entre les biotypes résistants et sensibles. Pourtant, si on additionne les différents totaux:

TV biotypes résistants	- 28
TV biotypes sensibles	- 35
TP biotypes résistants	- 32
TP biotypes sensibles	- 31

il apparaît tout de même que les biotypes sensibles sont plus précoces que les résistants, mais que leur productivité est voisine.

### 7.5 La morphologie

Bien que la description donnée sous le point 3 soit satisfaisante pour l'identification de la plante, elle n'illustre pas de manière adéquate la grande plasticité morphologique de cette espèce. Ainsi, dans les régions chaudes, la variation morphologique permet de décrire plus de 40 types différents de plantes. Mais, selon Gasquez (1984), beaucoup d'espèces ou de sous-espèces sont distinguées par des caractères très restreints au déterminisme souvent très simple, sans relation avec la réalité génétique. Ceci tend à surcharger la systématique et parfois à entraîner des erreurs.

Pour illustrer ce polymorphisme, considérons les travaux de Weller, (1978): à l'Institut National de Recherches Laitières de Schinfield (GB), toutes les plantes appartiennent à la sous-espèce *nigrum*, mais présentent un large éventail de formes. Les plantes sont soit étendues soit érigées jusqu'à 90 cm. Les poils multicellulaires de la tige sont appliqués ou dégagés. Les pétioles des feuilles et les pédoncules des fruites varient entre 18 et 30 mm et 4 et 8 mm respectivement. Le nombre de baies par plantes de 19 à 356 et celui des graines par baie de 33 à 54.

Nous étudierons donc dans ce paragraphe :

- l'aspect général des plantes
- les feuilles (le poids sec, la longueur des pétioles, la pilosité, le nombre de dents foliaires, l'indice de découpe et la surface)
- les fruits (le diamètre, le poids frais, le nombre de graines / fruit, le poids des graines et le pourcentage de graines avortées)

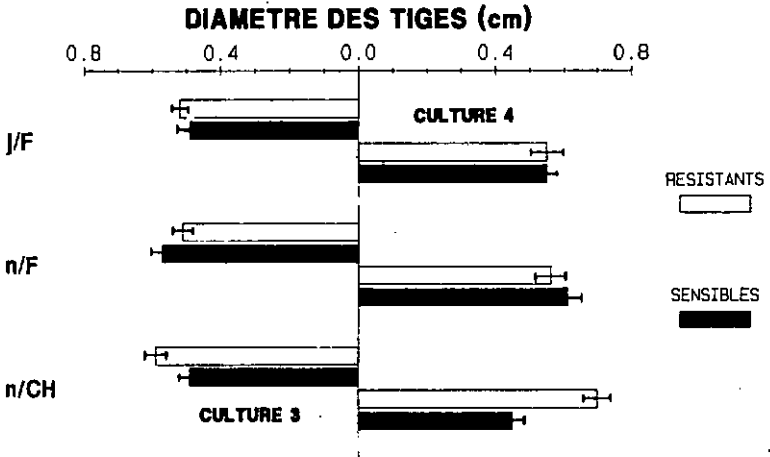


Fig.10 Diamètre des tiges des différents biotypes cultivés à deux périodes de l'année. Cultures 3 et 4, mars à juin et avril à mi-juillet, respectivement.

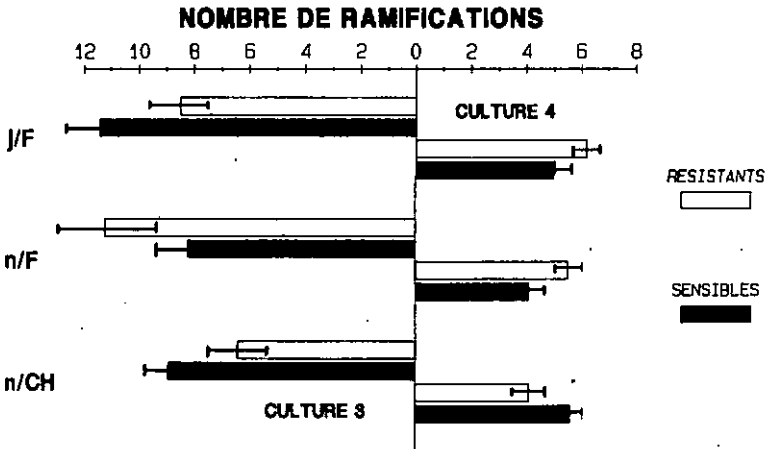


Fig.11 Nombre de ramifications émises par les différents biotypes cultivés à deux périodes de l'année. Cultures 3 et 4, mars à juin et avril à mi-juillet, respectivement.

### 7.5.1 L'aspect général des plantes

Le diamètre de la tige nous informe sur la droiture du port. En effet, une tige de fort diamètre procure à la plante un maintien érigé, alors qu'une tige à diamètre plus réduit supportera plus difficilement le poids de la plante et aura un aspect de type courbe voire rampant.

On observe, dans la Fig.10, que le diamètre des tiges varie peu entre les différents biotypes: tous biotypes confondus, les variations standard n'excèdent pas 7.5 et 13.5% pour les cultures 3 et 4, respectivement. Ainsi, on ne peut pas vraiment parler d'une différence de port. Par contre, il existe un lien entre la hauteur des biotypes (Fig.8) et le diamètre de leur tige. En effet, une plante élevée aura également un diamètre de tige élevé.

D'une manière générale, les biotypes résistants ont un diamètre de tige plus élevé que les sensibles; par exemple, culture 3: 0.540 et 0.517 cm, culture 4: 0.603 et 0.537 cm, respectivement. L'écart le plus important se situe entre les deux biotypes suisses lors de la culture 4 et est égal à 0.25 cm.

Quant au nombre de ramifications (Fig.11), les écarts entre biotypes sont beaucoup plus importants que pour le paramètre mesuré précédemment: tous biotypes confondus, les variations standard dépassent 19 et 15% pour les cultures 3 et 4, respectivement. Il apparaît que la culture en début de printemps (mars à juin) présente des plantes plus touffues que des plantes mises en culture un mois plus tard (9.10 et 5.08, ramifications par plante, pour les cultures 3 et 4, respectivement, tous biotypes par culture confondus). Il est intéressant de constater que si, d'une manière générale, la culture 3 présente des sections de tige plus petites que la culture 4 (Fig.10), il en va inversement du nombre de ramifications. D'autre part, les biotypes sensibles sont plus touffus que les résistants lors de la culture 3 (9.5 et 8.7 ramifications par plante, respectivement) et inversement lors de la culture 4 (4.9 et 5.3 ramifications par plante, respectivement). Nous observons là une phéno-morphologie différente entre biotypes résistants et sensibles.

Par les mesures de ces deux paramètres, il nous apparaît, une fois de plus, qu'il n'est pas aisé de tirer des lois autant en ce qui concerne la phénologie que la morphologie des biotypes résistants et sensibles. L'époque de l'année pendant laquelle les cultures sont entreprises joue un grand rôle. S/j/F apparaîtra plus touffu que le résistant correspondant lors de la culture 3 et inversement lors de la culture 4.

En conclusion sur l'aspect général des plantes, nous constatons que les biotypes français ont un diamètre de tige voisin. Par contre, celui-ci est toujours supérieur chez R/n/CH et inférieur chez S/n/CH par rapport aux autres biotypes. Concernant maintenant le nombre de ramifications, il n'est pas possible de mettre en évidence des différences entre biotypes résistants et sensibles, l'époque de mise en culture semblant influencer sur la morphologie.

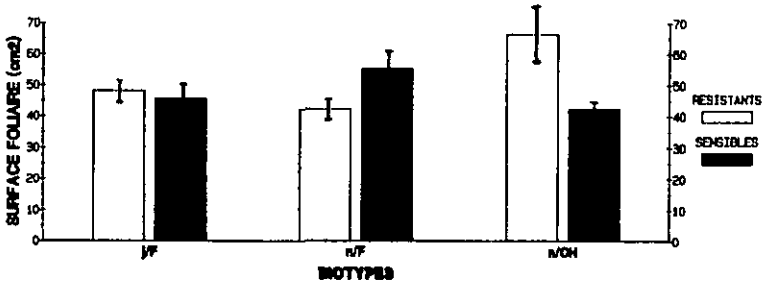


Fig.12 Surface foliaire des différents biotypes cultivés lors de la culture 4 (avril à mi-juillet).

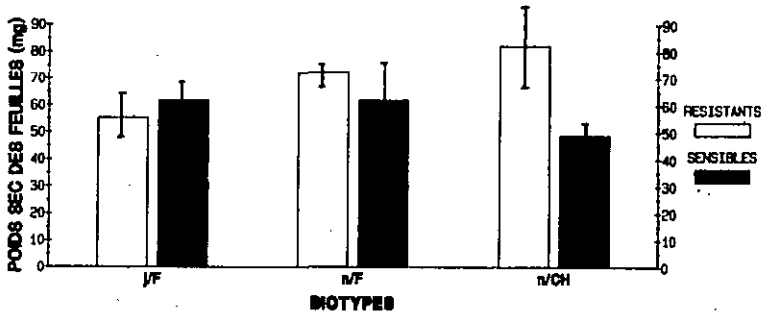


Fig.13 Poids sec des feuilles des différents biotypes cultivés lors de la culture 4 (avril à mi-juillet).

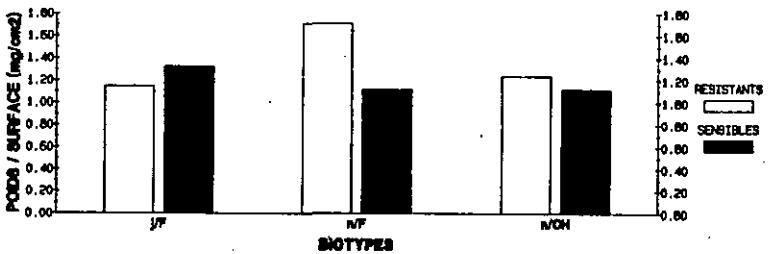


Fig.14 Rapports du poids sec des feuilles par la surface foliaire des différents biotypes cultivés lors de la culture 4 (avril à mi-juillet).

## 7.5.2 Les feuilles

## - Surface foliaire

La comparaison de la surface foliaire des différents biotypes (Fig.12) montre que les écarts entre biotypes sont faibles, hormis le biotype R/n/CH qui possède des feuilles, en moyenne, beaucoup plus grandes que tous les autres biotypes (34 % plus grandes que celles des biotypes R/n/F et S/n/CH).

## - Poids sec des feuilles

Quant au poids sec des feuilles (Fig.13), il apparaît que les écarts entre les biotypes français sont faibles. Pour les deux biotypes suisses il n'en va pas de même puisque le poids sec des feuilles du biotype R/n/CH est 40% plus élevé que celui du biotype S/n/CH.

Il va de soi que la surface et le poids foliaires sont interdépendants. Pour cette raison, nous avons exprimé la masse de matière sèche par unité de surface (Fig.14). Ainsi, on constate que les biotypes résistants développent une biomasse foliaire par  $\text{cm}^2$  plus importante que les biotypes sensibles, hormis pour le biotype S/j/F. Calculé globalement, les plantes résistantes présentent des feuilles 13 % plus lourdes que celles des biotypes sensibles pour une même unité de surface. On observe également que le biotype R/n/F développe la plus grande biomasse par  $\text{cm}^2$  et est, considéré sur la moyenne des cinq autres biotypes, 30% plus productif.

## - Le nombre de dents foliaires

Ce paramètre montre, hormis la grandeur des feuilles, l'aspect général de ces dernières. Dans la Fig.15, on constate que R/n/CH et S/j/F présentent des feuilles au nombre de dents plus élevé que les quatre autres biotypes. L'indentation n'est pas toujours facile à voir, surtout dans les stades très jeunes, cependant elle nous permet d'identifier facilement certains biotypes.

Par contre, bien que le biotype R/n/CH présente le plus grand nombre de dents par feuilles, il n'est pas le biotype aux feuilles les plus dentées. En rapportant le nombre de dents foliaires à la surface des feuilles (Fig.16), il est aisé de faire apparaître les biotypes aux feuilles les plus découpées. En effet, le nombre de dents, comme le poids des feuilles sont interdépendants avec la surface foliaire et il apparaît bien que le biotype S/j/F soit le plus denté. Génétiquement parlant, l'indentation est un caractère dominant sur la forme ronde (Gasquez, communication personnelle). Au vu de la Fig.16, il apparaît que seul le biotype S/j/F possède ce caractère dominant, alors que R/n/F et R/n/CH ont un comportement intermédiaire plutôt dominant et R/j/F et S/n/CH plutôt récessif, alors que R/n/F, lui, présente des feuilles pratiquement exemptes de dents et aurait donc un caractère essentiellement récessif quant à l'indentation des feuilles.

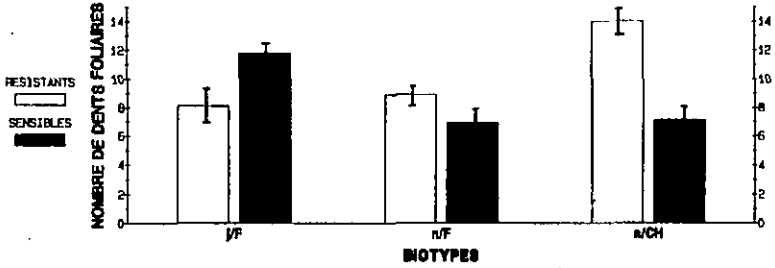


Fig.15 Nombre de dents foliaires des différents biotypes cultivés lors de la culture 4 (avril à mi-juillet)

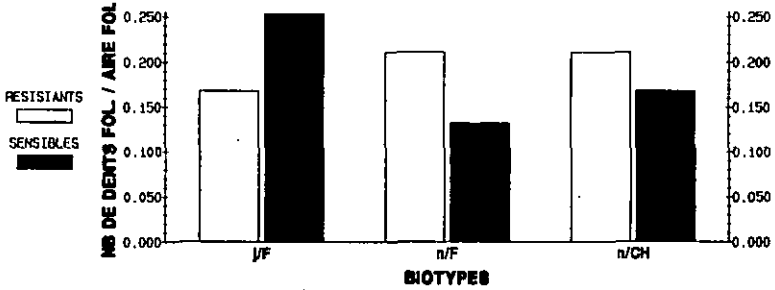


Fig.16 Rapport du nombre de dents foliaires sur la surface foliaire des biotypes cultivés lors de la culture 4 (avril à mi-juillet)

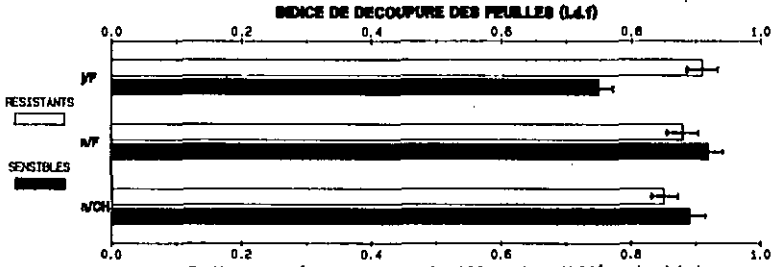


Fig.17 Indice de découpe des feuilles des différents biotypes cultivés lors de la culture 4 (avril à mi-juillet)

## - L'indice de découpeure des feuilles (I.d.f)

La mesure de ce paramètre nous permet d'apprécier l'indentation des feuilles, (Fig.17). Le biotype S/j/F comprend, outre le plus grand nombre de dents par surface foliaires, le plus faible I.d.f, alors que les autres biotypes ont un I.d.f qui tend d'avantage vers un, exprimant ainsi une marge foliaire simple ou peu échancrée.

Par l'étude de la marge des feuilles, nous observons, d'une manière globale, que les biotypes résistants sont plus dentés que les sensibles, bien qu'il soit impossible de tirer des conclusions quant au phénomène de la résistance chloroplastique. Par contre, elle permet de reconnaître aisément certains biotypes.

## - La longueur des pétioles

Cette mesure (Fig.18) suit la même tendance que celle de la surface foliaire; une grande feuille ayant en général un long pétiole. Il peut être intéressant de rechercher une expression contenant à la fois les paramètres surface et poids foliaires et longueur des pétioles. Nous avons donc multiplié la longueur des pétioles LP (cm) par le rapport poids / aire foliaire P/A (mg/cm<sup>2</sup>), voir Tab.V.

	LP x P/A (mg / cm)	
	R	S
j/F	3.4	2.0
n/F	2.0	3.4
n/CH	3.6	2.6

Tab. V: Longueur du pétiole (LP) multipliée par le rapport poids et surface foliaires (P/A).

Exprimé ainsi, il est possible de représenter d'une manière simple l'ensemble de ces paramètres et de constater que les pétioles des biotypes R/j/F, S/n/F et R/n/CH supportent plus de biomasse foliaire pour une même unité de longueur que les autres biotypes. Par contre, ceci ne semble pas être en relation avec le phénomène de la résistance chloroplastique.

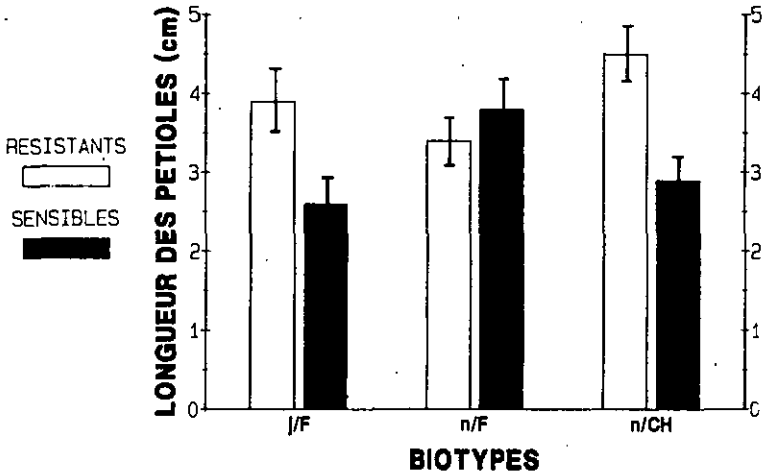


Fig.18 Longueur des pétioles des différents biotypes cultivés lors de la culture 4 (avril à mi-juillet).

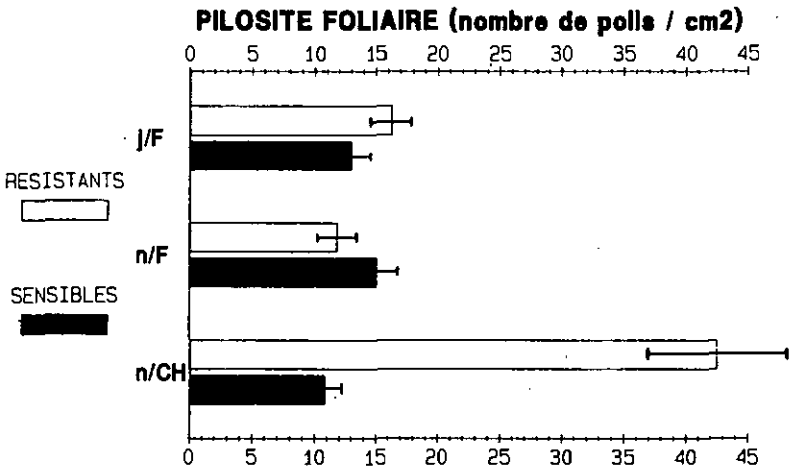


Fig.19 Pilosité foliaire des différents biotypes cultivés lors de la culture 4 (avril à mi-juillet).

### - La pilosité foliaire

La Fig.19 fait clairement apparaître que la plupart des biotypes ont une pilosité foliaire relativement faible (13.4 ± 2.04 poils par cm<sup>2</sup>) hormis le biotype R/n/CH, qui lui, a une pilosité 68.5% plus élevée que les autres, considérés ici globalement.

En conclusion sur la morphologie des feuilles, nous observons que les biotypes résistants développent une plus grande biomasse par cm<sup>2</sup>, que leurs feuilles sont en moyenne plus fortement dentées en nombre et en profondeur, et que leur pétiole porte plus de biomasse foliaire par unité de longueur. Quant à la pilosité, seul R/n/CH est beaucoup plus pubescent que les autres biotypes.

L'étude de la morphologie des feuilles ne nous permet pas de tirer de conclusions quant au phénomène de la résistance chloroplastique, compte tenu qu'il y a toujours, pour chaque paramètre mesuré, un biotype qui ne suit pas la tendance des résistants ou celle des sensibles.

### 7.5.3 Les fruits et les graines

Les fruits sont de petites baies globulaires vertes virant au noir ou au jaune en mûrissant (Bentham & Hooker, 1924) rattachées directement au réceptacle (Ogg et al., 1981).

Les graines ont une forme discoïdale, elles ont un diamètre avoisinant 1.6 mm (Wakloo, 1964). Leur couleur crème (biotypes R/j/F et S/j/F) peuvent virer légèrement sur le vert (biotypes S/n/F et S/n/CH) ou le violet (biotypes R/n/F et R/n/CH).

### - Le diamètre des fruits

La Fig.20 montre que les fruits des biotypes sensibles sont légèrement plus gros que ceux des biotypes résistants (1.4 et 2.6% plus gros pour les cultures 3 et 4, respectivement). Étonnamment, c'est pour la culture 3, lorsque les plantes croissent moins bien (Fig.5), que les fruits sont les plus gros, comparés à ceux issus de la culture 4. Par ailleurs, nous avons également constaté que le nombre de fruits portés par le premier pédoncule floral est plus grand pour la culture 4 que pour la culture 3 (Fig.6). Ainsi les plantes "compenseraient" leur faible nombre de fruits par des baies plus volumineuses.

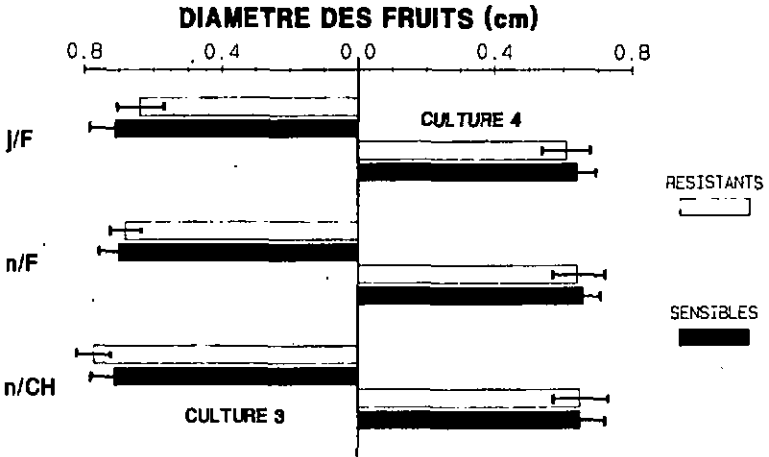


Fig.20 Diamètre des fruits des différents biotypes cultivés lors des cultures 3 (mars à juin) et 4 (avril à mi-juillet).

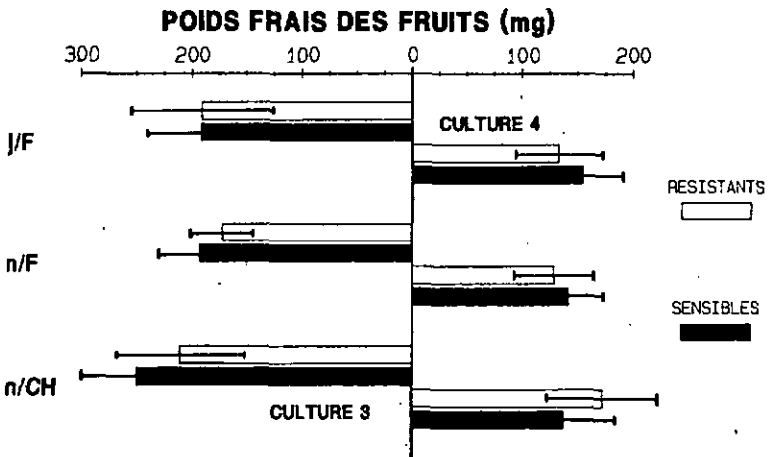


Fig.21 Poids frais des fruits des différents biotypes cultivés lors des cultures 3 (mars à juin) et 4 (avril à mi-juillet).

- Le poids frais des fruits

Ce paramètre (Fig.21) corrobore les résultats décrits dans la Fig. 20. Les fruits issus de la culture 3 sont en moyenne 28% plus lourds que ceux issus de la culture 4. D'autre part, les fruits des biotypes sensibles de la culture 3 sont 10% plus lourds que ceux des résistants, ce qui ne s'observe pas lors de la culture 4 où les fruits des sensibles ont un poids égal à ceux des résistants, considérés ici globalement et compte tenu des écarts-types ( $\sigma=87\pm 24$  mg). Au vu d'écarts-types aussi importants, on ne peut tirer de grandes conclusions comparatives, mais simplement montrer des tendances, surtout entre les différentes cultures.

- Le nombre de graines par fruit

Cette mesure (Fig.22) est intéressante à plusieurs titres. D'une part, les écarts entre les cultures 3 et 4 sont faibles (33.0 et 32.0 graines par fruit, respectivement, tous biotypes confondus), compte tenu que les fruits de la culture 3 sont plus volumineux et plus lourds que ceux de la culture 4 (Fig. 20 et 21). Cette différence est donc probablement due essentiellement à une teneur en eau supérieure lors de la culture 3. D'autre part, il apparaît, dans tous les cas, que les biotypes sensibles contiennent plus de graines que les résistants (24.9 et 21.0 % de plus lors des cultures 3 et 4, respectivement).

- Le poids sec des graines

Si le nombre des graines par fruit est en faveur des biotypes sensibles, il en va de même pour le poids des graines (Fig.23). L'écart est faible entre les moyennes des biotypes résistants et sensibles (7.8 et 7.9 mg, respectivement), et le poids des graines des différents biotypes assez homogène ( $\pm 12\%$ ).

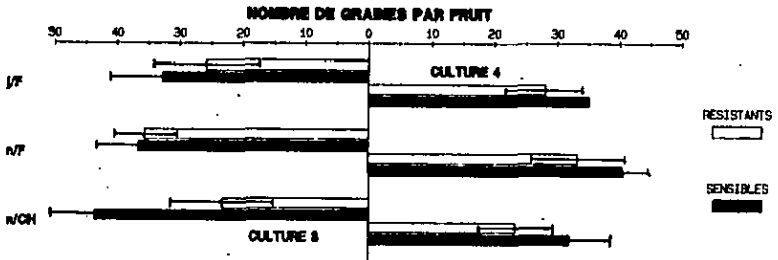


Fig.22 Nombre de graines par fruit des différents biotypes cultivés lors des cultures 3 (mars à juin) et 4 (avril à mi-juillet)

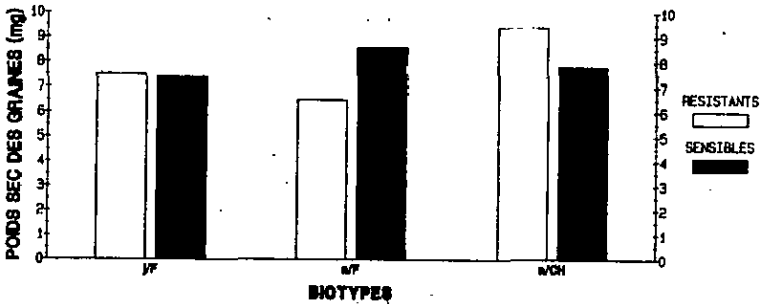


Fig.23 Poids sec des graines des différents biotypes cultivés lors de la culture 4 (avril à mi-juillet)

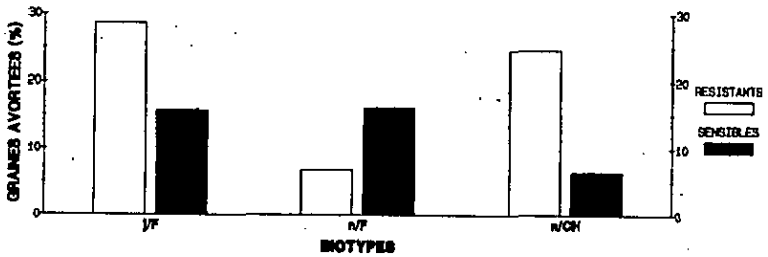


Fig.24 Pourcentages des graines avortées au cours de la maturation des fruits lors de la culture 4 (avril à mi-juillet).

- Le pourcentage de graines avortées

Un point particulier a retenu notre attention. Il s'agit du développement des graines au cours de la maturation des fruits (Fig. 24). Nous trouvons communément, dans le monde végétal, deux stratégies de développement des graines. Certaines espèces ont des fruits immatures contenant un petit nombre de graines qui va augmenter au cours de la maturation. D'autres espèces ont des fruits immatures renfermant une grande quantité de graines dont une partie avortera au profit du développement de certaines graines seulement (Heller, 1979). *Solanum nigrum* semble faire partie de la deuxième catégorie. En effet, le nombre de graines dans un fruit immature est supérieur à celui d'un fruit mûr de même diamètre. Nous assistons donc à un phénomène abortif lié à la maturation. Ce phénomène abortif est très prononcé chez les biotypes résistants R/n/CH et R/j/F, mais moins marqué chez le biotype R/n/F. Ainsi les biotypes résistants seraient plus soumis à ce phénomène (20%) que les biotypes sensibles (12.7%). Une étude plus détaillée serait nécessaire afin de pouvoir infirmer ou confirmer ce résultat, car il est pensable que cet avortement soit lié au phénomène de la résistance chloroplastique.

Ainsi, entre juin et juillet, lorsque les jours raccourcissent:

- le diamètre des fruits diminue.
- le nombre de graines contenues dans les fruits peut varier entre 20 et 45 (Salisbury, 1961), ce que nous observons également ( $33 \pm 6$ ). Gasquez et al. (1981) ne mentionnent pas de différence entre le nombre de graines trouvé dans des fruits provenant de biotypes résistants ou sensibles de *Solanum nigrum* (35), alors qu'en ce qui nous concerne, il apparaît que les biotypes sensibles présentent un nombre de graines par fruit sensiblement supérieur à celui rencontré chez les résistants (env 25 % supérieur).
- les graines des biotypes résistants avortent dans des proportions plus élevées que celles des sensibles (20 et 12.7%, respectivement).

## 8 RESUME

- Le degré de ploïdie est identique chez les six biotypes, ce sont des hexaploïdes à  $2n = 72$ .
- Nous observons un taux élevé et homogène de germination au phytotron pour les différents biotypes et pour des graines âgées jusqu'à vingt mois ( $93 \pm 7\%$ ).
- La germination en terre est hétérogène entre biotypes et le taux de germination est faible ( $29.8 \pm 14.8\%$ ).

- Les biotypes sensibles présentent un meilleur taux de germination en serre tempérée dans la terre que les résistants (47.7 et 26.0%, respectivement).
- La culture en serre tempérée semble être optimale au printemps et au début de l'été. La croissance des plantes est rapide, la biomasse foliaire importante et l'apparition des appareils reproducteurs n'entrave pas ou peu la croissance (Gaspar et al., 1987) ni n'altère la qualité du matériel photosynthétique pour autant que les membranes thylacoidales soient isolées à partir de matériel jeune (six à dix semaines depuis la mise en germination, variable selon les biotypes). Quant aux cultures au phytotron et en couche, les critères requis ne sont pas satisfaits. Il apparaît notamment que les plantes restent petites, qu'elles portent un grand nombre d'appareils reproducteurs, que leur croissance est lente et que les feuilles sont souvent endommagées par les intempéries, ceci pour les cultures en couche.
- Les biotypes résistants sont plus tardifs que les sensibles, mais leur hauteur est supérieure en fin de culture.
- Pour tous les paramètres mesurés, les écarts les plus importants apparaissent entre les deux biotypes suisses, qui sont soit très précoces, mais produisent peu de phanes (sensible), soit tardifs et très productifs (résistant).
- L'époque de l'année de mise en culture influence l'aspect et la morphologie des plantes.
- Le pouvoir reproducteur des différents biotypes intègre trois paramètres (Figs 9, 22 et 24) :
  - \* le nombre de fruits (F)
  - \* le nombre de graines par fruit (G)
  - \* le pourcentage de graines avortées (GA)

Par l'expression  $PR = (F \times G \times GA)/100$ , il nous est possible d'estimer le pouvoir de reproduction (PR) des différents biotypes, cultivés dans nos conditions (Tab.VI).

BIOTYPES	PR		Baisse du PR (%) des R par rapport aux S
	R	S	
j/F	154.5	286.2	46
n/F	225.9	284.8	21
n/CH	150.4	181.6	17
moyennes	176.9	250.9	29

Tab. VI: Pouvoir reproducteur (PR) des différents biotypes cultivés lors de la culture 4 (avril à mi-juillet).

Ainsi, il ressort que le pouvoir reproducteur, ou pouvoir de dissémination des biotypes résistants est inférieur de 29 % à celui des sensibles. Nous pouvons alors parler d'une moins grande "fitness" des biotypes résistants par rapport aux sensibles. La "fitness" est estimée par l'expression contenant à la fois la mesure de survie d'un groupe de germination et la mesure des graines viables produites et dispersées (Putwain *et al.*, 1982). Dans des conditions au champ où la compétition pour l'espace est un facteur limitant, la fréquence des biotypes résistants devrait être radicalement supprimée par les biotypes sensibles. Lorsque la pression exercée sur une population sauvage est soutenue afin de sélectionner un certain caractère, ces individus sélectionnés sont moins adaptables ou "fits", ce qui a été décrit par Haldane (1960) comme le prix de la sélection. Cependant, les explications génétiques de la "fitness" sont complexes. Néanmoins, dans les cas classiques, lorsque le type sauvage et le type sélectionné sont cultivés séparément, il peut n'y avoir aucune différence de taux de biomasse par unité de surface entre eux. Les différences de "fitness" peuvent apparaître seulement lorsque les types sélectionné et sauvage sont en compétition dans des conditions non sélectionnantes (Gressel & Segel, 1982).

Pour cette espèce, des décalages, tantôt en faveur des sensibles, tantôt en faveur des résistants, pour la germination, le développement et la précocité de floraison, nécessitent des études plus précises avec des populations d'autres origines, car il est possible que, selon les régions, les résistants puissent être décalés. Ainsi il existe des stations où les résistants arrivent à coloniser, en l'absence de la pression de sélection de l'herbicide, de nombreux espaces libres (bords de champs, chemins, cours de ferme), ce que n'avaient jamais fait les biotypes sensibles. En fait, ces comparaisons sont encore partielles et il ne semble pas possible d'en déduire systématiquement une meilleure adaptation des sensibles par rapport aux résistants (Gasquez *et al.*, 1981).

L'étude morphologique n'a fait que confirmer les travaux de Weller (1978) quant au grand polymorphisme de cette espèce, qui tient probablement au fait que la morelle est une plante hautement autogame et qui tend, par ce fait, à isoler des formes particulières. Certains de ces caractères sont pratiques pour l'identification des différents biotypes (indentation des feuilles, pilosité, couleur des baies etc...). Pour des comparaisons précises, il faudrait comparer soit des sensibles et des résistants qui auraient le même génotype et ne différeraient que par la résistance, soit mettre en place des essais portant sur de très nombreux génotypes sensibles et résistants (chose difficile, car on ne connaît encore que peu de génotypes résistants). En fait, il faudrait pouvoir comparer des individus résistants avec des génotypes sensibles, maintenant très rares, qui pré-existaient dans la station où est apparu le phénomène de la résistance chloroplastique.

## 9 CONCLUSIONS DE LA DEUXIEME PARTIE

Au terme de cette étude phéno-morphologique dans plusieurs conditions et à différentes périodes de l'année, nous sommes en mesure de porter notre choix, premièrement, sur un "biotope cultural" et deuxièmement, sur deux biotypes de *Solanum nigrum*, un résistant et l'autre sensible à l'atrazine. Ainsi, nous obtiendrons le matériel nécessaire à l'étude de l'interaction des herbicides avec les membranes thylacoïdales.

Notre choix est le suivant:

1<sup>a</sup> la culture en serre tempérée de mars à fin septembre (sept mois), offrant les avantages suivants:

- initiation rapide de la culture
- hauteur élevée des plantes et nombre de feuilles élevé
- croissance rapide

2<sup>a</sup> les biotypes R- et S/n/CH, car leur phénologie est bien différenciée l'une par rapport à l'autre (Tab.7). Ce comportement nous est utile à plusieurs titres. Nous commencerons toujours à travailler avec le biotype précoce (S/n/CH) pour continuer avec le résistant, plus tardif, qui entre-temps, aura atteint un stade phénologique proche de celui du sensible lorsque nous l'avons utilisé, bien que d'âge différent. D'autre part, leur morphologie très différente (Tab.VII) empêche toute confusion lors de la récolte des feuilles. Finalement, pour le renouvellement du stock grainier, nous diminuons le risque d'une fécondation inter-biotype puisque la floraison des deux biotypes est décalée dans le temps.

CARACTERES	BIOTYPES	
	S/n/CH	R/n/CH
croissance	rapide	lente
taille	petite	élevée
ramifications	nombreuses	peu nombreuses
pilosité	faible	élevée
feuilles	petites	grandes
découpe foliaire	-	+
floraison	précoce	tardive
nb de graines/fruit	élevée	faible
"fitness"	+	-

Tab. VII: Résumé des différents caractères des deux biotypes suisses comparés deux à deux.

**TROISIEME PARTIE:**

**COMPOSITION ET STRUCTURE**

**LIPIDIQUE DES MEMBRANES**

**THYLACOIDALES DE *SOLANUM***

***NIGRUM* L.**

"... et tout en sachant bien qu'on connaît un arbre que par l'étude minutieuse des racines et des branches, nous pensons qu'il est utile, quelquefois, de tracer des voies provisoires dans les confuses forêts."

Paul Hazard

TABLE DES MATIERES DE LA 3<sup>ème</sup> PARTIE

1	INTRODUCTION	99
2	BUT DE LA TROISIEME PARTIE	99
3	MATERIEL ET METHODES	100
3.1	<u>Matériel biologique</u>	100
3.2	<u>Isolement des membranes thylacoïdales</u>	100
3.3	<u>Dosage des différents pigments et protéines des membranes thylacoïdales</u>	101
3.3.1	Dosage des pigments	101
3.3.2	Dosage des protéines	101
3.4	<u>Analyse des lipides acylés des membranes thylacoïdales</u>	102
3.4.1	Extraction des lipides	102
3.4.2	Chromatographie en couche mince	102
3.4.3	Transestérification des lipides	103
3.4.4	Chromatographie en phase gazeuse	103
3.4.5	Dosage des phospholipides par le phosphate	104
3.4.6	Dosage des galactolipides par le galactose	104
3.5	<u>Détermination de la densité superficielle de charge et calculs des potentiels et des pH de surface des membranes thylacoïdales</u>	105
3.6	<u>Localisation transversale des lipides acylés des membranes thylacoïdales</u>	107
3.6.1	Localisation transversale du phosphatidylglycérol et de la phosphatidylcholine	107
3.6.2	Localisation transversale du monogalactosyl-diacylglycérol et du digalactosyldiacylglycérol	107
3.7	<u>Stimulation de la fluorescence par les cations</u>	108

3.8	<u>Fluidité relative des membranes thylacoïdales, déterminée par la mesure du "steady-state" de la polarization de fluorescence de la sonde DPH.</u> . . . . .	110
4	RESULTATS ET DISCUSSIONS . . . . .	110
4.1	<u>Composition en pigments des membranes thylacoïdales</u> . . . . .	111
4.2	<u>Composition en lipides acylés des membranes thylacoïdales</u> . . . . .	114
4.3	<u>Détermination de la densité superficielle de charge des membranes thylacoïdales</u> . . . . .	120
4.4	<u>Organisation transmembranaire des lipides des membranes thylacoïdales</u> . . . . .	121
	4.4.1 Asymétrie transversale des phospholipides . . . . .	126
	4.4.2 Asymétrie transversale des galactolipides . . . . .	128
4.5	<u>Estimation de la fluidité relative des membranes thylacoïdales</u> . . . . .	133
5	RESUME . . . . .	136
6	CONCLUSIONS DE LA TROISIEME PARTIE . . . . .	138

## 1 INTRODUCTION

Les protéines correspondent à 60% du poids sec des membranes thylacoïdales, les 40% restants consistent en lipides polaires et en pigments. La fraction protéinique est principalement constituée de trois types de complexes protéo-chlorophylliens. Outre les complexes chlorophylles *a* photochimiquement actifs qui constituent le photosystème I (PS I), et le photosystème II (PS II), on trouve le complexe protéine-chlorophylles *a/b* ou "light harvesting complex protein" (LHCP) photochimiquement non actif. La fraction lipidique consiste approximativement en 70% de lipides polaires et 30% de lipides neutres et pigments (Quinn & Williams, 1983). Les pigments comprennent les chlorophylles (*a* et *b*) et les caroténoïdes ( $\beta$ -carotène, lutéine, violaxanthine et néoxanthine). Les chlorophylles forment des antennes collectrices de photons au sein des PS I, PS II et LHCP. Les caroténoïdes, outre leur rôle de collecteur d'énergie lumineuse, forment un écran protecteur des chlorophylles contre une photooxydation par l'oxygène moléculaire et ceci, principalement au sein des LHCP (Thornber *et al.*, 1987). Les lipides polaires, quant à eux, maintiennent la conformation et l'orientation appropriée des protéines ou complexes protéiniques qui ne peuvent exprimer leur fonction optimale que dans un environnement lipidique étroitement défini du point de vue de sa composition et de sa distribution (Horvath *et al.*, 1986; Thomas *et al.*, 1986; Huner *et al.*, 1987; Caldwell, 1987; Caldwell & Whitman, 1987; Eckert *et al.*, 1987; Hoshina & Itoh, 1987; Siegenthaler *et al.*, 1987; Stefermann-Harns *et al.*, 1987; Rawlyer & Siegenthaler, 1989a et Siegenthaler *et al.*, 1989).

## 2 BUT DE LA TROISIEME PARTIE

L'environnement contraint les plantes à s'adapter en permanence aux conditions du biotope. Aussi le processus de la croissance est-il directement lié à celui de l'adaptation. Pour ce faire, les plantes ont développé plusieurs propriétés, dont celle de moduler la composition ainsi que la structure de leurs diverses membranes (Harwood, 1984). Outre les deux conditions extérieures déterminantes que sont la lumière (quantité et qualité) (Lichtenthaler, 1981; Davies *et al.*, 1986; Pearcy *et al.*, 1986 et Jansen *et al.*, 1989) et la température (Chapman *et al.*, 1982, Vigh *et al.*, 1985a; Lynch *et al.*, 1987; Norman & St. John, 1987; Mäenpää *et al.*, 1988 et Johnson & Williams, 1989), il y a d'autres conditions moins essentielles telles que le photopériodisme (Bervaes *et al.*, 1987) l'alternance des températures (Ketchie *et al.*, 1987), les caractères édaphiques et hydriques (Kulshreshtha *et al.*, 1987; Reuveni *et al.*, 1987 et Ort & Baker, 1988). Une mutation peut également conférer au mutant une adaptation qui lui est spécifique (Browse *et al.*, 1986; McCourt *et al.*, 1987 et Kunst *et al.*, 1989).

Dans cette troisième partie, nous considérerons certains aspects physico-chimiques des membranes des biotypes sensible et résistant à l'atrazine de *S. nigrum* des points de vue compositionnel et structural en les ayant délibérément séparés de l'aspect fonctionnel, que nous traiterons dans la quatrième partie. Cette troisième partie devrait nous informer sur la possible adaptation de la phase lipique du mutant résistant par rapport au biotype sensible.

### 3 MATERIEL ET METHODES

#### 3.1 Matériel biologique

Toutes les expériences décrites dans cette troisième partie ont été réalisées sur des fractions cellulaires isolées de *Solanum nigrum* L. sensible et résistante à l'atrazine (voir la deuxième partie du présent mémoire concernant les conditions de culture et l'âge du matériel biologique). Par souci de clarté nous ne mentionnerons plus ces deux biotypes par la nomenclature établie précédemment S/n/CH et R/n/CH mais plus simplement par S pour le biotype sensible et R pour le résistant puisque nous ne considérerons plus que ces 2 biotypes dans la suite de notre étude.

#### 3.2 Isolement des membranes thylacoïdales

Bien que l'objectif de cette troisième partie soit de caractériser de manière qualitative et quantitative la phase lipidique des membranes thylacoïdales des morelles S et R, nous nous sommes efforcés de ne travailler qu'avec des membranes dont les activités du flux électronique sont préservées. En effet, des membranes dépourvues de telles activités n'intéressent que peu le physiologiste. Nous isolerons donc les thylacoïdes par centrifugation différentielle, méthode qui combine les avantages de la rapidité, d'un rendement de l'activité photosynthétique élevé et moyennant au minimum deux lavages, d'un extrait de membranes thylacoïdales d'une bonne pureté.

La technique :

Les différentes étapes de la préparation des membranes thylacoïdales sont effectuées le plus rapidement possible et à basse température (4°C), afin d'éviter un vieillissement trop rapide du matériel biologique.

Les feuilles (120 à 150 g), rincées à l'eau déionisée, ont passé une nuit à l'obscurité à 4°C, afin d'épuiser leurs réserves d'amidon. Elles sont empliées les unes sur les autres, coupées aux ciseaux en fines lamelles et immergées immédiatement dans le milieu de broyage (300 ml). On prendra soin de ne pas découper la nervure principale des feuilles, qui sera éliminée plus tard. La composition du milieu de broyage est la suivante: Sorbitol 400 mM; MOPS 50 mM, pH 7.5; MgCl<sub>2</sub> 2 mM. Les tissus sont homogénéisés à l'aide d'un pilon dans un mortier. Ce broyage, relativement long (3 à 5 min) mais doux, semble être nécessaire pour l'obtention de structures thylacoïdales fonctionnelles. L'homogénat est ensuite rapidement filtré à travers 6 couches de gaze puis deux couches de tissu à bluter. Le filtrat est centrifugé à 1500 x g (rotor SS-34, Sorvall RC-5B) pendant 1 min, temps d'accélération et de décélération non compris (les centrifugations suivantes seront toujours effectuées avec le même rotor). Cette centrifugation permet d'obtenir un premier culot de chloroplastes bruts, le surnageant ayant été éliminé par aspiration. Le culot des différents tubes est resuspendu à l'aide d'une pipette en verre de 10 ml par aspiration et refoulement de quelques ml de milieu de broyage. Les culots sont rassemblés dans deux tubes, complétés chacun à 38 ml avec du milieu de broyage. La suspension de chloroplastes bruts est alors centrifugée (1500 x g, 2 min). Cette étape constitue un premier lavage des chloroplastes. Après aspiration des surnageants, les culots

sont resuspendus dans quelques ml de milieu d'éclatement: 1 vol de milieu de broyage pour 9 vol d'eau déionisée. Les tubes sont complétés à 38 ml avec le même milieu et centrifugés (1500 x g, 3 min). Cette étape permet d'obtenir un culot de membranes thylacoïdales, le choc osmotique ayant brisé l'enveloppe des chloroplastes. Après aspiration des surnageants, les culots sont resuspendus dans quelques ml de milieu de broyage et rassemblés dans un seul tube, complété à 38 ml avec le même milieu. Un dernier lavage par centrifugation (1500 x g, 2 min) permet d'obtenir des membranes thylacoïdales d'une bonne pureté. Après aspiration du surnageant, le culot est resuspendu à 1 mg Chl/ml dans du milieu de broyage.

### 3.3 Dosage des différents pigments et protéines des membranes thylacoïdales

#### 3.3.1 Dosage des pigments

Les chlorophylles (Chl) totales sont estimées par la méthode de Bruinsma (1961). 50  $\mu$ l de suspension de thylacoïdes sont ajoutés à 10 ml d'acétone 80%. La solution est vigoureusement agitée puis filtrée sur papier Whatman. L'absorbance à 652 nm est lue contre une référence contenant de l'acétone 80%. La valeur mesurée est multipliée par un facteur de 5.55 pour donner la concentration en chlorophyllés (mg/ml) dans la suspension.

Les concentrations en chlorophylles a, b et des caroténoïdes (carot) dans la suspension sont estimées par la méthode de MacKinney (1941) et exprimées en mg/ml :

1. [Chl a] =  $(2.543 \times A_{663}) - (0.517 \times A_{645})$
2. [Chl b] =  $(4.576 \times A_{645}) - (0.934 \times A_{663})$
3. [carot] =  $A_{480} - (2.973 \times A_{663}) + (0.568 \times A_{645})$
4. [Chl totales] =  $(1.609 \times A_{663}) + (4.059 \times A_{645})$

#### 3.3.2 Dosage des protéines

La quantité de protéines totales est estimée par la méthode de Lowry, modifiée par Markwell *et al.* (1981). La BSA est utilisée comme protéine de référence :

Un échantillon membranaire contenant moins de 100  $\mu$ g de protéines est ajusté à 1 ml. Trois ml d'un réactif composé de 2 solutions en proportions volumiques 100+1 sont ajoutés. La première solution contient 2% de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.4% de NaOH, 0.16% de tartrate de Na, 1% de SDS [p/v] et la seconde 4% de  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ . Après une agitation et une incubation de 10 min, 300  $\mu$ l de réactif de Folin dilué 2 fois avec  $\text{H}_2\text{O}$  sont ajoutés. L'absorbance à 750 nm est lue après 45 min contre un "blanc" composé de l'ensemble des réactifs à l'exception des protéines.

Il est à noter qu'il existe plusieurs méthodes de dosage des protéines. La méthode de Lowry est relativement longue mais procure une haute reproductibilité et une bonne stabilité, contrairement à d'autres techniques (Eze & Dumbroff, 1982).

### 3.4 Analyse des lipides acylés des membranes thylacoïdales

#### 3.4.1 Extraction des lipides

L'extraction des lipides fait appel à une modification de la méthode de Bligh & Dyer (1959). A une suspension aqueuse de fraction membranaire (1-2 ml), dont la teneur en Chl est connue (pas plus de 2 mg Chl/ml), est ajouté entre 1.8 et 3.6 ml du mélange  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (53:37, v/v). On prendra garde de respecter un rapport entre la phase chloroforme-méthanol et la phase aqueuse de 1.8. Cette méthode permet une séparation de phase optimale des deux liquides. Après une agitation énergique, une centrifugation (2000 x g, 5 min) permet de séparer l'hypophase chloroformique, contenant lipides acylés et pigments, de l'épiphase hydroalcoolique parfaitement limpide, cette dernière étant aspirée avec une trompe à vide. Dès l'obtention de la phase chloroformique verte foncée, il est nécessaire de la protéger contre la lumière directe et l'oxygène afin d'éviter la photodestruction des pigments et l'oxydation des lipides. On conservera donc l'extrait lipidique à l'obscurité et sous atmosphère de  $\text{N}_2$ .

L'analyse de routine des lipides thylacoïdaux est effectuée de la façon suivante :

Une partie aliquote (100  $\mu\text{l}$ ) de l'extrait lipidique total est destinée, après transméthylation des acyl-lipides, à l'étude des acides gras méthylés par chromatographie en phase gazeuse (GC). Une seconde partie aliquote (400  $\mu\text{l}$ ), prélevée avec une microsiringue Hamilton (type 700); est destinée à une analyse par chromatographie sur couche mince.

#### 3.4.2 Chromatographie en couche mince

Des aliquots de l'extrait lipidique total sont déposés sur des plaques de verre (20 x 5 cm) recouvertes d'une couche mince de gel de silice (silicagel type 60 sans indicateur fluorescent, MERCK). L'application de ces échantillons se fait sous forme d'une mince bande (30 x 2 mm) déposée par une microsiringue Hamilton grâce à un appareil conçu pour le dépôt automatique, le Linomat III (CAMAG, Mutenz, Suisse). Les volumes suivants seront déposés sur les plaques lors des analyses de routine:

- 100  $\mu\text{l}$  destinés à un "charring" (voir ci-dessous).
- 100  $\mu\text{l}$  destinés à l'analyse des acides gras des galactolipides.
- 200  $\mu\text{l}$  destinés à l'analyse des acides gras des phospholipides et du sulfolipide.

Lesdites plaques sont ensuite placées dans une cuve de chromatographie et développées dans le mélange acétone / benzène / eau (91:30:8), qui permet la séparation de tous les lipides polaires, bien que le SQDG reste très proche du DGDC et que le "spot" du PG soit étalé. Après le développement, les plaques sont séchées et les lipides sont identifiés après pulvérisation de réactifs, soit:

- une solution de primuline (0.1% dans acétone/eau, 80:20, v/v; Wright, 1971), qui permet d'identifier les lipides sous rayons UV (323 nm).
- une solution destructrice ( $H_2SO_4$ , 35% dans  $CH_3CH_2OH/H_2O$ , 1:1, v/v) est utilisée lorsque la récupération ultérieure des lipides n'est pas nécessaire. Tous les composés organiques sont mis en évidence après chauffage avec un séchoir jusqu'à carbonisation totale de la matière organique ("charring").

#### 3.4.3 Transestérification des lipides

Les zones de silice contenant les lipides sont grattées à l'aide d'une lame de rasoir sur du papier calque, et récupérées dans des tubes SVL (10 ml). Une quantité connue d'acide béhénique ( $C_{22:0}$ ), qui sert de standard interne, est ajoutée à chaque tube. La quantité de  $C_{22:0}$  à ajouter est approximativement de un tiers de la quantité de lipides à analyser (env. 15-60 nmoles par tube). Du méthanol déoxygené (1.1 ml) par barbotage d'azote et contenant 5% (v/v) d'acide sulfurique est ajouté. Le tube est fermé sous azote et placé dans un bloc chauffant à 85-95 °C, pendant 1 h. Après refroidissement, 2 ml de pentane et 2 ml d'eau sont ajoutés. Le tube est vigoureusement agité (émulsion) puis centrifugé pour séparer les 2 phases. L'épiphase contenant les méthylesters est prélevée puis séchée sous azote. Ceux-ci sont repris dans un minimum d'hexane (100-200  $\mu$ l).

#### 3.4.4 Chromatographie en phase gazeuse

- Appareil : Perkin Elmer (modèle 900) équipé de détecteurs à ionisation de flamme (FID).
- Colonne : 180 cm de longueur, 1,5 mm de diamètre, renfermant 3% de diéthylèneglycol-succinate sur Chromosorb G (AW-DMCS).
- Température :
  - 1) Isothermie à 160 °C
  - 2) Programme 3 min à 160 °C puis la température est portée, à raison de 24°C/min, jusqu'à 180°C, température qui est maintenue jusqu'à la sortie complète du  $C_{22:0}$ .

Les méthylesters sont élués par un flux d'azote (30 ml/min), mesuré à la sortie à 160 °C.

L'identité des méthylesters est obtenue par comparaison de leur temps de rétention avec ceux de substances de référence.

La quantification se fait par comparaison de la surface des pics avec celle du standard interne.

#### 3.4.5 Dosage des phospholipides par le phosphate

La méthode utilisée dérive de celle de Rouser *et al.* (1970). Les zones de silice contenant les phospholipides à doser sont grattées à la lame de rasoir dans des tubes à essai préalablement lavés à l'acide chromique. 200  $\mu$ l de HClO<sub>4</sub> 70% sont ajoutés et les tubes sont couverts par une bille de verre. Après chauffage à 200 °C pendant 1h et refroidissement, 670  $\mu$ l d'H<sub>2</sub>O sont ajoutés et les tubes sont agités. 270  $\mu$ l d'ammonium de molybdate 1.25% sont ajoutés, avant d'agiter une nouvelle fois les tubes. 270  $\mu$ l d'acide ascorbique 5%, préparé fraîchement, sont ajoutés et tous les tubes, après agitation, sont plongés simultanément dans un bain-marie à 100°C pendant 5 min. Après une centrifugation (200 x g, 5 min) permettant de sédimenter la silice, l'absorbance à 820 nm est déterminée contre un "blanc" (tous les réactifs et la silice, mais sans les lipides). La quantité en nmoles de phosphate, donc de phospholipides est donnée par la formule :

$$\text{nmoles de Pi} = 49.8 \times A_{820}$$

Cette formule est obtenue à l'aide d'une courbe de calibration qui donne l'absorbance à 820 nm en fonction de la quantité de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (nmoles).

#### 3.4.6 Dosage des galactolipides par le galactose

Cette méthode est essentiellement basée sur celle de Dubois *et al.* (1956): La silice contenant les glycolipides est déposée dans des tubes à essai. 600  $\mu$ l de phénol 1.67% aqueux, puis 2 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré (injectés brusquement pour produire une forte élévation de la température) sont ajoutés et l'ensemble est agité. Une fois la température dans les tubes redescendue, ceux-ci sont centrifugés (2000 x g, 5 min) et l'absorbance du surnageant est déterminée à 485 nm. La quantité en nmoles de galactose est donnée par la formule :

$$\text{nmoles de galactose} = 224 \times A_{485}$$

Cette valeur est ensuite divisée par 2 pour obtenir les nmoles de digalactolipide et multipliée par 0.74 pour obtenir les nmoles de sulfolipides tenant compte ainsi de la différence de réactivité du sulfoquinose. La courbe étalon est obtenue par régression linéaire de l'absorbance à 485 nm exprimée en fonction de la quantité de galactose (nmoles).

n.b. La silice donne un signal à 485 nm proportionnel à la surface grattée. Il est ainsi conseillé de retrancher à la valeur des échantillons celle correspondant à une surface équivalente de silice.

### 3.5 Détermination de la densité superficielle de charge et calculs des potentiels et des pH de surface des membranes thylacoïdales

La charge négative des membranes thylacoïdales, à pH physiologique, est essentiellement due aux protéines, les lipides anioniques ne jouant qu'un rôle mineur. L'analyse d'une surface portant des charges uniformément réparties est possible grâce à la théorie de Gouy-Chapman. L'existence d'une charge négative nette à la surface des thylacoïdes engendre un potentiel électrique dans la couche aqueuse immédiatement adjacente à cette surface.  $\phi_0$  est défini comme étant le potentiel électrique à la surface membranaire. La relation entre la densité superficielle de charge  $\sigma$  et le potentiel électrique  $\phi_0$  s'établit ainsi (Barber, 1980) :

$$\sigma = 2RT\epsilon_0\epsilon_r(Ci_\infty)^{1/2} \sinh(ZiF\phi_0/2RT) \quad (1)$$

avec	: $\sigma$ en C/m <sup>2</sup> et $\phi_0$ en mV
R	- constante des gaz parfaits
T	- température (°K)
$\epsilon_0$	- permittivité absolue du vide
$\epsilon_r$	- permittivité relative de l'eau
$Ci_\infty$	- concentration molaire de l'ion à l'infini
Zi	- charge de l'ion i
F	- constante de Faraday

#### Principe :

Expérimentalement, la détermination de la charge de surface est réalisée au moyen de la sonde métachromatique safranine (chlorure de 3,7-diamino-2,8-diméthyl-5-phénylphénazinium). Ses propriétés étant décrites ailleurs (Rawlyer & Siegenthaler, 1989b), nous ne ferons ici qu'un bref rappel de son mode d'action. Ce composé porte à pH neutre une charge nette positive et sera par conséquent attiré électrostatiquement par la charge nette négative des thylacoïdes. Lorsque la safranine est concentrée à l'interface membranaire, formant ainsi des di- ou multimères, son absorbance diminue (phénomène de "stacking"). Si des ions sont ajoutés dans le milieu où baignent les membranes, ceux-ci déplacent la safranine de la couche diffuse vers le milieu ambiant, provoquant une réaugmentation de l'absorbance à 520 nm. Il est à noter que d'autres sondes sont couramment employées, p.ex. la sonde fluorescente 9-aminoacridine (Chow et Barber, 1980) dont le comportement électrostatique est tout-à-fait comparable à celui de la safranine.

#### Pratique :

Des membranes thylacoïdales (50  $\mu$ g) sont suspendues dans un milieu (3 ml) pauvre en cations (0.3 M sorbitol, 5  $\mu$ M DCMU, 1 mM MOPS/KOH pH 7.6 et 25  $\mu$ M safranine). Les cations divalents du milieu sont chélatés par de l'EDTA et l'absorbance maximale  $A_{\text{max}}$  (520-552 nm) est obtenue en ajoutant une concentration saturante de cations divalents (65 mM de  $MgCl_2$ ) qui déplacent la totalité de la safranine dans le milieu ambiant.

La différence d'absorbance 520-552 nm est mesurée, 552 nm étant le point isosbestique de la safranine dans ces conditions, avec un spectrophotomètre de type Aminco DW-2a, réglé en mode "dual". Les membranes thylacoïdales sont titrées par des concentrations variables de cations mono- ou divalents ( $K^+$  ou  $MV^{2+}$ ). Les concentrations de cations monovalent et divalent qui donnent un même rapport d'absorbance  $A/A_{max}$  permettent d'estimer  $\sigma$  (Fig. 4). En effet, on peut considérer que pour des rapport  $A/A_{max}$  identiques, les potentiels  $\phi_0$  sont égaux. La relation (1) permet, en éliminant  $\phi_0$ , d'établir l'équation suivante (Chow & Barber, 1980):

$$\sigma = - [3.444 \times 10^6 (C'^2 - 4C'C'')/C'']^{1/2} \quad (2)$$

les concentrations réelles des cations mono- ( $C'$ ) et divalent ( $C''$ ) dans la solution sont exprimées en mM et  $\sigma$  est exprimée en  $C/m^2$

Selon ces mêmes auteurs, on peut également calculer  $\phi_0$  de la manière suivante:

$$\phi_0 = RT/F \operatorname{argcosh} \frac{-C' \pm \sqrt{C'^2 + 16C''^2 + 8C'C'' + (4C''\sigma^2/A^2)}}{4C''}$$

Par définition, pour  $u \geq 1$ , on a :  $\operatorname{argcosh} u = \ln(u + \sqrt{u^2 - 1})$

- pH de surface (Barber, 1982)

Si un potentiel de surface existe à la surface d'une membrane, alors le pH de surface est différent du pH du milieu ambiant. Le  $pH_0$  de surface est calculé à partir de  $\phi_0$  et  $pH_m$ .

$$pH_0 = pH_m + (F\phi_0 / 2.3RT)$$

$$\text{A } 20^\circ \text{C : } pH_0 = pH_m + 0.0168\phi_0$$

- Concentration des ions à la surface membranaire (Barber, 1982)

La probabilité de trouver un ion  $i$  en un point particulier, éloigné d'une distance  $x$  de la surface membranaire, est donnée par la formule suivante :

$$C_{i_x} = C_{i_m} e^{zF\phi_0/RT}$$

A  $20^\circ \text{C}$  et à la surface de la membrane, cette formule devient :

$$C_{i_0} = C_{i_m} e^{zF\phi_0/RT}$$

### 3.6 Localisation transversale des lipides acylés des membranes thylacoïdales

Afin d'obtenir des informations sur la localisation des lipides dans la membranes thylacoïdales, nous avons utilisé la méthode de la lipolyse enzymatique. Lorsque les thylacoïdes sont intacts, la dégradation des lipides sous l'action des lipases (LRA, PLA<sub>2</sub>) est limitée aux lipides localisés dans le feuillet externe de la membranes thylacoïdales, pour autant que la température soit maintenue relativement basse (2-4°C). Dans ce cas, aucune lyse des thylacoïdes et aucun mouvement transmembranaire des molécules lipidiques ne devrait apparaître (Siegenthaler, 1982). Ainsi, connaissant la quantité totale de lipides membranaires, il est possible par dégradation soit des phospho-, soit des galactolipides de la monocouche externe de la membrane thylacoïdale, de calculer la répartition transmembranaire des lipides.

#### 3.6.1 Localisation transversale du phosphatidylglycérol et de la phosphatidylcholine.

Nous utiliserons la phospholipase A<sub>2</sub> de pancréas de porc (PLA<sub>2</sub>), EC 3.1.1.4, (SIGMA) sans autre purification. Cette enzyme hydrolyse la liaison ester des phospholipides en position sn<sub>2</sub>, engendrant ainsi un 2-lysolipide et un acide gras. Cette étude a été inspirée directement des travaux de Siegenthaler et al. (1989).

L'incubation des membranes thylacoïdales (1 mg/Chl) avec la phospholipase A<sub>2</sub> est effectuée à l'obscurité à 20°C dans le milieu suivant : Sorbitol 300 mM; Tricine/KOH (pH 7.8) 50 mM; NaCl 35 mM; CaCl<sub>2</sub> 1 mM et PLA<sub>2</sub> 7 U/mg Chl. Après prélèvement d'un échantillon contrôle au temps zéro, la lipase est ajoutée à la suspension qui est agitée pendant toute la période d'incubation. Des aliquots (576 µl) de l'incubation sont prélevés aux intervalles de temps désirés et ajoutés à 1 ml CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH (53:37, v/v) et 10 µl EGTA 250 mM, pH 7.8, servant à garantir une inhibition total de la PLA<sub>2</sub>. La concentration en Chl est déterminée pour chaque extrait lipidique total et sert de standard interne. Un aliquot (90 µl) de chaque extrait lipidique est soumis à une chromatographie en couche mince. Les plaques sont développées dans le solvant acétone/toluène/méthanol/eau (90:25:7:12), séchées, puis révélées par "charring" (voir 3.4.2). Les différents spots des PG et PC de chaque extrait lipidique sont grattés dans des tubes à essai et leur contenu en phosphate déterminé (voir 3.4.5).

#### 3.6.2 Localisation transversale du monogalactosyldiacylglycérol et du digalactosyldiacylglycérol

Nous utiliserons la lipase de *Rhizopus arrhizus* (LRA), EC 3.1.1.3, (BOEHRINGER, Mannheim, FRG) sans autre purification. Cette lipase hydrolyse la liaison ester des galactolipides en position sn<sub>1</sub>, engendrant ainsi un 1-lysolipide et un acide gras. Cette étude a été inspirée directement des travaux de Rawlyer & Siegenthaler (1985). L'enzyme est diluée dans le milieu d'incubation désiré, de façon à obtenir une solution stock contenant 1.5 U/µl.

La solution de membranes thylacoïdales (0.5 mg/ml) est préincubée pendant 15 min à 20°C dans le milieu choisi afin que le degré d'accolement des thylacoïdes soit stabilisé avec la force ionique choisie (voir Tab. IX). La suspension est soit maintenue à 20°C, soit amenée à 2°C. Après prélèvement d'un échantillon contrôlé au temps zéro, la lipase est ajoutée (30 U/mg Chl) à la suspension qui est constamment agitée et maintenue à l'obscurité. Des aliquots (560 µl) de la suspension sont prélevés aux intervalles de temps désirés et les lipides extraits avec 1 ml de  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (53:37, v/v). La concentration en Chl est déterminée pour chaque extrait lipidique total et sert de standard interne. Un aliquot (90 µl) de chaque extrait lipidique est soumis à une chromatographie en couche mince. Les plaques sont développées dans le solvant chloroforme/méthanol/acide acétique/eau (85:15:10:3), séchées brièvement, puis révélées à l'iode. Les différents spots des MGDC et DGDC de chaque extrait lipidique sont grattés dans des tubes à essai et leur contenu en galactose est déterminé (voir 3.4.6).

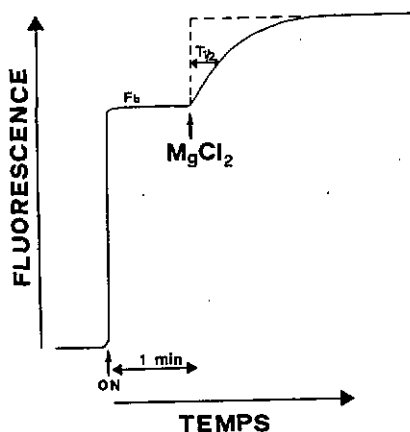
### 3.7 Stimulation de la fluorescence par les cations

#### Principe :

La forme sigmoïdale des courbes d'induction de la fluorescence par la lumière est associée à un certain degré de connexion entre les unités PS II, qui peuvent ainsi échanger leur énergie. En l'absence de cations, la fluorescence variable et par conséquent la fluorescence maximale, sont toutes deux fortement réduites. Murata (1969) a suggéré que cet effet est associé à une augmentation de la probabilité de transfert d'énergie du PS II vers le PS I. Plus précisément, ce transfert se ferait du complexe PS II/LHCP vers le PS I. Le  $\text{Mg}^{2+}$  contrôlerait l'étroitesse du couplage entre les unités PS II et les LHCP et la taille des domaines occupés par les unités PS II interconnectées. Ainsi, à faible concentration ionique, les unités PS II seraient faiblement connectées et groupées en larges domaines alors qu'en présence de  $\text{Mg}^{2+}$ , il se formerait des unités fortement connectées mais de taille restreinte (pour une revue, Krause & Weis, 1984).

#### Technique :

Nous avons isolé les membranes thylacoïdales à partir de feuilles de Morelles S et R (voir 3<sup>ème</sup> partie § 3.2). Les thylacoïdes sont ajustés à la concentration de 10 µg Chl/ml dans un milieu pauvre en cations (HS), composé de: Sorbitol 300 mM; MOPS 50 mM, pH 7.6; NaCl 5 mM; 2 µM DCMU et maintenues à l'obscurité. La température est fixée à 20°C. Après 1 min d'illumination, 10 mM  $\text{MgCl}_2$  sont ajoutés. La fluorescence augmente puis se stabilise après 0.5 à 1 min (voir la courbe ci-après). La présence de DCMU est indispensable afin de supprimer toute variation de la fluorescence associée à la photochimie du flux d'électrons. Cet herbicide bloque le flux électronique entre  $Q_A$  et  $Q_B$ . En présence de lumière, il maintient  $Q_A$  sous forme réduite. Il en résulte, dans une condition ionique donnée, une émission de fluorescence qui se maintient à un niveau élevé et que nous appellerons fluorescence de base ( $F_b$ ).



#### Stimulation de la fluorescence par les cations

La fluorescence est enregistrée à l'aide d'un spectrofluorimètre Baush & Lomb. Celui-ci est équipé d'un amplificateur "lock-in" traitant uniquement les signaux du photomultiplicateur arrivant en phase avec ceux de la fréquence de référence issue du "chopper".

Réglage standard de l'appareil:

lumière d'excitation	:	490 ± 10 nm
lumière d'émission	:	680 ± 5 nm
amplificateur	:	100 mV
enregistreur	:	200 mV
power supply	:	1100 V

Le demi temps de montée ( $T_{1/2}$ ) de la fluorescence induite par les cations est associé à la vitesse de réassociation des complexes PS II/LHCP en unités fortement connectées.  $T_{1/2}$  est donc dépendant de la fluidité membranaire (Yamamoto et al., 1981).  $T_{1/2}$  peut être modulé par l'adjonction d'agents chimiques au milieu de suspension des membranes thylacoïdales p.ex. du cholestérol ou de l'alcool benzylique (Yamamoto et al., 1981; Pederson & Cox, 1984). L'augmentation de fluorescence due aux ions divalents est réversible si de l'EDTA est ajouté pour chélater le  $Mg^{2+}$ .

### 3.8 Fluidité relative des membranes thylacoïdales, déterminée par la mesure du "steady-state" de la polarisation de fluorescence de la sonde DPH.

La fluidité relative des membranes thylacoïdales est déterminée par la technique de mesure du "steady-state" de la polarisation de la fluorescence de la sonde 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH), incorporée dans les thylacoïdes isolés de Morelles S et R. La méthode de polarisation de fluorescence du DPH a été adaptée aux membranes chloroplastiques par Ford & Barber (1980 et 1983) et Ford et al. (1982 et 1984).

Une solution stock de DPH (3 mM) dans du tétrahydrofurane est ajoutée directement à une suspension de membranes thylacoïdales (50 µg/ml) jusqu'à une concentration finale de 5 µM. Après une incubation à l'obscurité et à température ambiante pendant 40 min, les membranes marquées sont centrifugées. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans du milieu de broyage (voir 3.2) à une concentration finale de 10 µg Chl/ml. La polarisation de la fluorescence est mesurée par un spectrofluorimètre Hitachi MPF-2A équipé de polarisateurs pour la lumière d'excitation (360 ± 20 nm) et d'émission (430 ± 20 nm). Un filtre (430 nm "cut-off") est ajouté à la lumière d'émission afin de réduire la contribution de la lumière diffusée. La température dans la cuvette est maintenue constante par un thermostat muni d'un dispositif de Peltier et contrôlé par un programme informatique. Les intensités de bruit de fond de la fluorescence et de la diffusion de la lumière des échantillons non marqués ont été soustraites de l'intensité de la fluorescence totale des échantillons marqués par le DPH. Le degré de polarisation (P) a été calculé selon l'expression:

$$P = (I_W - G I_H) / (I_W + G I_H) \quad G = I_W / I_H$$

$I_W$  et  $I_H$  sont les intensités de fluorescence déterminées aux orientations verticale et horizontale, respectivement, du polarisateur de la lumière d'émission, lorsque le polarisateur de la lumière d'excitation est ajusté dans la position verticale.  $I_W$  et  $I_H$  sont les intensités de fluorescence déterminées aux positions verticale et horizontale, respectivement, du polarisateur de la lumière d'émission, lorsque le polarisateur de la lumière d'excitation est ajusté horizontalement. G est un facteur de correction en fonction des différentes réponses des monochromateurs de la lumière polarisée verticalement et horizontalement.

## 4 RESULTATS ET DISCUSSIONS

L'altération de la phase lipidique peut affecter les propriétés physiques des membranes ainsi que les caractéristiques biochimiques des protéines fonctionnelles liées aux systèmes membranaires des organites cellulaires. Nous avons donc cherché s'il apparaissait, à côté de la mutation sur le polypeptide 32 kDa des thylacoïdes R, des changements plus généraux des propriétés physico-chimiques de ces thylacoïdes (p.ex. composition en pigments, en glycolipides et/ou en acides gras, etc...) et ceci par comparaison avec des thylacoïdes S.

4.1 Composition en pigments des membranes thylacoïdales

Les tables I et II présentent la composition en pigments des deux biotypes. Peu de différences apparaissent dans la table I. Par contre, la table II met en évidence des rapports Chl a/b et Chl/caroténoïdes environ 10% plus élevés chez le biotype S que chez le R.

	serre		extérieur	
	S	R	S	R
Chl a	114 ± 4	108 ± 9	109	92
Chl b	45 ± 4	47 ± 5	50	50
caroténoïdes totaux	21 ± 3	22 ± 2	23	23
Chl totales	159 ± 5	154 ± 4	159	142
pigments totaux	180 ± 4	176 ± 5	182	165

Tab. I : Quantités des différents pigments des membranes thylacoïdales de *S. nigrum* sensible (S) et résistant (R) à l'atrazine exprimées par rapport aux protéines totales ( $\mu$ moles pigment / g protéine). Pour les plantes cultivées en serre (n = 5). Les plantes cultivées à l'extérieur ont fait l'objet d'une mesure (n = 1).

	serre		extérieur	
	S	R	S	R
Chl a/b	2.5 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.2	1.8
Chl tot / carot tot	7.5 ± 0.3	6.9 ± 0.3	6.9	6.2

Tab. II : Rapport pondéraux entre pigments. Le traitement statistique est le même que dans la table I.

Lors de la culture des plantes, l'irradiance affecte à la fois la structure du chloroplaste et la concentration en chlorophylles. Lichtenthaler (1981), Davies et al. (1984 et 1986) et Pearcy et al. (1986), quantifièrent de telles différences chez plusieurs espèces cultivées sous différentes irradiances. Les plantes croissant à faible intensité lumineuse développent une densité thylacoïdale par chloroplaste plus importante, des amas granaires de plus grande taille, une plus grande antenne pigmentaire, une plus forte proportion de LHCP et un rapport Chl a/b plus faible que les plantes poussant aux fortes irradiances. Lichtenthaler et al. (1982) observèrent que cette dernière propriété est corrélée à la quantité supérieure en LHCP, car ces complexes sont caractérisés par un faible rapport Chl a/b. En ce qui nous concerne, les biotypes S et R ont été cultivés aux mêmes irradiances (voir 2<sup>ème</sup> partie). Il est intéressant de noter que certains des phénomènes cités ci-dessus apparaissent également entre les biotypes S et R

et notamment, un rapport Chl *a/b* plus bas chez le mutant. Déjà en 1982, Burke *et al.* observèrent un rapport Chl *a/b* plus faible, un accroissement de l'accolement granaire, ainsi qu'une plus grande concentration de LHCP associés au PS II chez le biotype R de *Brassica campestris*. De même, Lemoine *et al.* (1983), observèrent les mêmes tendances, ainsi qu'un plus grand nombre de saccules par granum également chez *B. campestris* résistant à l'atrazine. Ceci les amena à rapprocher les biotypes R aux plantes d'ombre. En 1984, Vaughn & Duke, observèrent également ces différences chez 3 mauvaises herbes résistantes à l'atrazine (*B. campestris*, *A. hybridus* et *C. album*). Selon ces auteurs, ces altérations semblent être des effets secondaires dus au phénomène de la résistance chloroplastique, plutôt que la cause même de cette résistance. Les différences dans le contenu pigmentaire et dans la structure chloroplastique des feuilles du biotype R semblent plutôt être dues à une adaptation du développement de cette plante et ne peuvent être rapportées qu'indirectement à la modification du PS II (Holt & Goffner, 1985). Au sujet des différences du Tab. II, que Vaughn (1986) a également observées, il mentionne qu'elles sont le reflet du "facteur résistance", plutôt que des caractères qui confèrent la propriété de la résistance vis-à-vis de l'atrazine.

On constate dans les Tab. I et II que les écarts mentionnés ci-dessus entre les biotypes S et R cultivés sous serre, apparaissent également chez des plantes cultivées à l'extérieur. De plus, le rapport Chl *a/b* des plantes "d'extérieur" est plus bas que celui des plantes de serre. Selon Aro *et al.* (1987), la diminution du rapport Chl *a/b* est associée à une teneur élevée de LHCP et selon Bervae *et al.* (1987), cette diminution apparaît de manière inversement proportionnelle à l'intensité lumineuse. Le rapport Chl *tot*/carotène est également plus petit pour les plantes cultivées à l'extérieur, mettant en évidence, non seulement, une diminution du nombre des chlorophylles (biotype R) mais aussi une augmentation des caroténoïdes (biotypes S et R) dont le rôle principal est de protéger les pigments et les autres espèces telles que les lipides polyinsaturés de la photooxydation (Quinn & Williams, 1983). Ainsi, sous forte intensité lumineuse, la concentration des chlorophylles diminue et celle des caroténoïdes augmente (Lichtenthaler *et al.* 1982). Par ailleurs, la présence de doses sublétales d'atrazine dans le milieu de culture provoque une adaptation des membranes thylacoïdales semblable à celle que l'on rencontre chez les plantes d'ombre et/ou chez les biotypes R cultivés sans atrazine. (Beaumont *et al.*, 1980; Mattoo *et al.*, 1984; Grenier *et al.*, 1987 et Laroche *et al.*, 1989). Par contre, la présence de doses sublétales d'urées substituées (linuron, monolinuron), qui bloquent également le transport des électrons au niveau du PS II, ne modifie pas le rapport Chl *a/b* mais induit une déficience en  $\beta$ -carotène et diminue le nombre de saccules par granum (Milivojevic & Markovic, 1989).

En rapport avec la 2<sup>ème</sup> partie, il existe une relation entre la quantité de chlorophylles et la biomasse foliaire, c'est-à-dire qu'une quantité importante de Chl est corrélée à une importante biomasse foliaire (Gratani & Fiorentino, 1986). Ainsi, il se pourrait que la petite différence de concentration des chlorophylles totales entre S et R (Tab. II) soit le reflet du faible écart du rapport: poids sec des feuilles / surface foliaire (2<sup>ème</sup> partie, Fig. 14, biotypes S/n/CH et R/n/CH).

	S	R
GLYCÉROLIPIDES	nmol/mg Chl	nmol/mg Chl
MGDG	1418 ± 79	1437 ± 93
DGOG	635 ± 78	700 ± 74
PG	240 ± 87	291 ± 76
SQOG	288 ± 84	468 ± 36
PC	13 ± 8	18 ± 6
TOTAL	2584 ± 336	3104 ± 285

Tab. III: Composition en glycérolipides des membranes thylacoïdales des morelles sensible (S) et résistante (R) à l'atrazine. La quantité des différentes classes de lipides est exprimée par rapport aux chlorophylles totales des membranes. Les écarts-types ont été calculés sur la base de 4 expériences.

	S	R
GLYCÉROLIPIDES	mol %	mol %
MGDG	55 ± 3	51 ± 3
DGOG	24 ± 3	23 ± 3
PG	9 ± 3	15 ± 1
SQOG	11 ± 0,5	11 ± 0,5
PC		

Tab. IV: Composition en glycérolipides des membranes thylacoïdales des morelles sensible (S) et résistante (R) à l'atrazine. La proportion des différents lipides est exprimée en pourcentage des lipides totaux. Les écarts-types ont été calculés sur la base de 4 expériences.

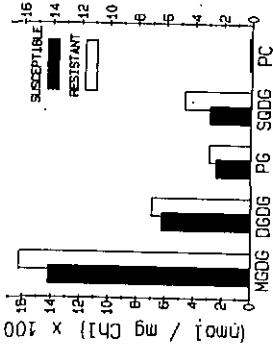


Fig. 1 : Représentation graphique des valeurs du Tab. III.

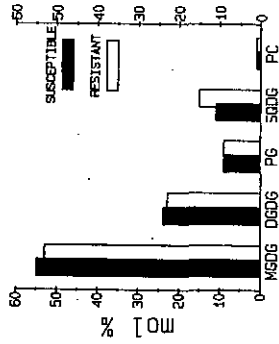


Fig. 2 : Représentation graphique des valeurs du Tab. IV.

#### 4.2 Composition en lipides acylés des membranes thylacoïdales

L'étude des lipides thylacoïdaux montre la présence de cinq classes de glycérolipides (Tab. III et IV et Figs 1 et 2). Deux classes sont, du point de vue quantitatif, majeures: il s'agit des monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) et digalactosyldiacylglycérol (DGDG), qui constituent ensemble env. 80% des lipides totaux des membranes. Les trois classes de lipides restantes constituent les lipides ioniques: le sulfolipide ou sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG), qui est également un glycolipide, et les phospholipides, phosphatidylglycérol (PG) et phosphatidylcholine (PC). Les SQDG et PG portent une charge négative et constituent env. 20% des lipides totaux des membranes. La PC, zwitterionique, n'est présente qu'en faible concentration (au max 2%), et sa présence intrinsèque dans les membranes thylacoïdales a du reste été mise en doute (Dorne et al., 1990). Le phosphatidylinositol peut également apparaître mais, dans ce cas, il semble que ce soit les conséquences réelles de contaminations dues aux enveloppes (Rawlyer, communications personnelles).

Sur la base des chlorophylles totales et pour tous les lipides (Tab. III et Fig. 1), les membranes thylacoïdales du biotype R contiennent davantage de lipides (entre 10 et 40% selon les classes de lipides) que celles du biotype S. Ainsi, la teneur en lipides totaux des membranes thylacoïdales du biotype R est de 17% supérieure à celle des membranes du biotype S. Burke et al. (1982) constatent également une différence de même ordre de grandeur chez la navette (*Brassica campestris*) résistante à l'atrazine. Cette observation renforce les études de Vaughn & Duke (1984) qui mirent en évidence un plus grand nombre de thylacoïdes par granum chez le biotype R de *Brassica campestris*, *Chenopodium album* et *Amaranthus hybridus*. Par contre, chez *Conyza canadensis* résistant à l'atrazine, Lehoczki et al. (1984) observèrent une réduction marquée du contenu en galactolipides et plus particulièrement en DGDG; ce qui permit à ces auteurs de conclure que les altérations du contenu lipidique peuvent contribuer au phénomène de la résistance chloroplastique chez *C. canadensis*.

Bien que plus de lipides soient nécessaires pour construire une plus grande masse de membranes thylacoïdales chez le biotype R, les proportions des différentes classes de lipides (en mol%) des 2 biotypes est similaire (Tab. IV et Fig. 2). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Pillai et al. (1981); Burke et al. (1982); de Lemoine et al. (1983) et Chapman et al. (1985), parmi eux, quelques auteurs (Pillai & St. John, 1981 et Chapman et al., 1985) mirent en évidence un rapport MGDG/DGDG supérieur chez les biotypes R. A l'instar de Burke et al. (1982), nous n'avons pas observé de différence dans les valeurs de ce rapport (2.3 chez S et R). Par contre, on observe un enrichissement des membranes R en SQDG, la différence de concentration du sulfolipide entre les biotypes S et R étant significativement plus marquée que dans les autres classes lipidiques. D'une manière plus globale, les membranes résistantes sont enrichies en lipides ioniques, les rapports (MGDG+DGDG) / (SQDG+PG+PC) étant de 3.8 et 3.0 pour S et R, respectivement. Cette observation est en accord avec Burke et al. (1982), Lemoine et al. (1983), Vaughn & Duke (1984) et Vaughn (1986) qui proposent un enrichissement membranaire des grana des chloroplastes R. Elle est aussi en accord avec Murphy (1986a), Li et al. (1989a) et Sigrist et al. (1988) qui proposent que les phospholipides et le sulfolipide sont

MORELLE SENSIBLE (mol%)									
	16:0	16:1	16:1(3t)	16:2	16:3	18:1	18:2	18:3	DBI
MGDG	3.2±0.1	0.7±0.1	----	1.6±0.1	21.9±0.5	2.2±0.3	6.3±0.6	62.1±0.9	2.77±0.01
DGDG	14.1±1.0	1.8±0.6	----	----	5.0±0.2	3.2±0.2	6.2±0.4	69.9±1.8	2.42±0.04
PG	14.3±0.6	2.5±1.0	35.4±2.5	T	4.1±1.9	9.3±1.0	20.1±0.5	14.4±0.9	1.08±0.05
SQDG	44.8±2.0	4.9±1.6	----	----	5.0±0.5	7.0±1.6	8.7±0.4	30.5±1.6	1.35±0.04
TOTAL	8.2±0.2	0.3±0.1	2.7±0.3	1.3±0.2	17.9±0.4	2.5±0.1	8.2±0.4	59.1±0.5	2.53±0.04
MORELLE RESISTANTE (mol%)									
	16:0	16:1	16:1(3t)	16:2	16:3	18:1	18:2	18:3	DBI
MGDG	2.1±0.2	0.5±0.1	----	1.0±0.1	31.2±0.9	1.5±0.2	3.5±0.2	60.2±0.9	2.85±0.01
DGDG	13.3±0.9	1.0±0.2	----	----	5.3±0.8	2.0±0.3	4.3±0.1	74.3±0.8	2.54±0.09
PG	10.9±0.6	1.3±0.2	40.2±0.3	T	2.6±0.2	6.7±0.1	21.2±0.3	17.1±0.2	1.10±0.01
SQDG	48.2±1.8	3.6±0.6	----	----	4.4±0.5	4.2±0.3	7.2±0.4	32.4±2.5	1.33±0.07
TOTAL	8.4±0.3	0.5±0.3	2.9±0.3	0.9±0.1	19.8±3.6	2.3±0.3	6.2±0.2	59.0±3.2	2.53±0.04

Tab. V : Composition en acides gras des différentes classes de lipides des membranes thylacoïdales des morelles sensible (S) et résistante (R) à l'atrazine. Les écarts-types expriment la variabilité calculée à partir de 4 expériences. T = trace; DBI = "Double Bond Index" somme des (ac. gras en mol% x nombre de doubles liaisons) x 0.01.

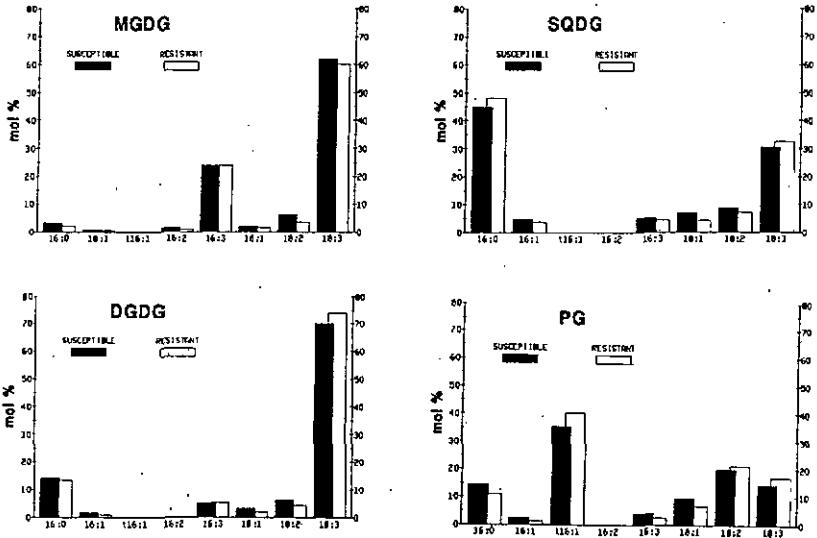


Fig. 3 : Représentation graphique des valeurs du Tab. V.

préférentiellement associés aux complexes protéiniques du photosystème II, localisés dans les grana.

La table V et la Fig. 3 présentent la composition en acides gras des différentes classes de lipides. Nous remarquons la présence de l'acide hexadécatriénoïque qui classe la morelle noire dans le groupe des plantes dites en "16:3". (Harwood, 1980; Whitaker, 1986).

Le Tab. V et la Fig. 3 mettent en évidence aucune différence notable dans la composition en acide gras des MGDG des biotypes S et R. Par contre, les teneurs en acide linoléique et en acide palmitique des DGDG et SQDG du R sont quelque 10% supérieures à celles du S. La teneur en acide hexadéca-(3 *trans*)-énoïque du PG du biotype R est quelque 10% supérieure et celle en acide palmitique, environ 10% inférieure à celles du biotype S. Nos observations quant aux teneurs en acides gras sont en accord avec d'autres auteurs (Lemoine *et al.*, 1983 et Chapman *et al.*, 1985), Pillai & St. John, (1981) et Burke *et al.* (1982) rapportent une augmentation de l'acide linoléique au détriment des acides linoléique et oléique dans le MGDG de plusieurs mauvaises herbes résistantes aux triazines. Ils observent également une insaturation supérieure des acides gras (*s.lato*) des thylacoïdes R qui leur suggère une plus grande fluidité des membranes thylacoïdales de ces biotypes. Ceci leur permet d'émettre l'hypothèse qu'une modification lipidique se produit avec l'apparition du phénomène de la résistance chloroplastique. Pour notre part, nous avons également observé de pareils écarts dans la composition des acides gras à 18 carbones et plus particulièrement dans le DGDG. Chez le biotype R, l'insaturation des acides gras (Tab. V) des MGDG, DGDG et PG est toujours supérieure mais légèrement inférieure chez le SQDG. Lorsque le DBI est calculé pour un extrait lipidique total, on ne note plus de différence entre les deux biotypes. Restall *et al.* (1979), par des expériences d'hydrogénation, en présence du catalyseur hydrophobe de Wilkinson ( $\text{Rh}(\text{PPh}_3)_3\text{Cl}$ ), réussirent à saturer 40% des doubles liaisons présentes dans les lipides membranaires du chloroplaste sans altérer le rendement du transport d'électrons de la chaîne photosynthétique. Ceci les amena à mettre en doute le rôle que certains auteurs prêtent aux doubles liaisons des acides gras. Cependant, Öquist (1982) démontra une corrélation entre l'activité du flux électronique  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NADP}^+$  et le niveau d'insaturation du MGDG dans les thylacoïdes de *Pinus sylvestris*. En effet, une réduction de la mobilité des plastoquinones dans les membranes thylacoïdales en hiver, alors que le degré d'insaturation du MGDG s'abaisse, inhiberait l'activité du transport des électrons. Également par des méthodes d'hydrogénation mais avec un catalyseur hydrosoluble ( $\text{Pd}(\text{QS})_2$  = palladium di (sodium alizarine monosulphonate)), Vigh *et al.*, (1985b) conclurent que la saturation progressive des acides gras des lipides des membranes thylacoïdales inhibe, premièrement le transport des électrons entre les deux photosystèmes et ensuite autour du PS II. L'activité du PS I, elle, n'est pas affectée même lorsque 50% des doubles liaisons sont hydrogénées. Gombos *et al.* (1988), par des expériences avec le même catalyseur, démontrèrent que la diffusion des plastoquinones réduites n'est pas ralentie bien que le catalyseur ait sensiblement diminué la fluidité membranaire.

	$\mu\text{mol lip/g Chl}$	$\text{g prot/g Chl}$	$\mu\text{mol lip/g prot}$
S	$2584 \pm 336$	$7.0 \pm 0.2$	$370 \pm 48$
R	$3104 \pm 285$	$7.2 \pm 0.2$	$431 \pm 40$

Tab. VI: Comparaison des rapports (lipides/chlorophylles; protéines/chlorophylles et lipides/protéines) pour des membranes thylacoïdales de morelles sensible (S) et résistante (R) à l'atrazine cultivées en serre.

GLYCEROLIPIDES	nmol/mg Chl		mol %		DBI	
	S	R	S	R	S	R
MGDG	1082	1291	53	55	2.95	2.92
DGDG	577	787	32	30	2.82	2.79
PG	92	144	6	5	1.23	1.18
SQDG	174	203	8	9	1.45	1.73
PC	17	25	1	1	1.57	1.40
TOTAL	1942	2450	100	100	2.54	2.57

Tab. VII: Composition lipidique des membranes thylacoïdales de *S. nigrum* sensible (S) et résistant (R) à l'atrazine. Les plantes ont été cultivées à l'extérieur.

	$\mu\text{mol lip/g Chl}$	$\text{g prot/g Chl}$	$\mu\text{mol lip/g prot}$
S	1942	7.0	277
R	2450	7.9	310

Tab. VIII: Comparaison des rapports (lipides/chlorophylles; protéines/chlorophylles et lipides/protéines) pour des membranes thylacoïdales de morelles sensible (S) et résistante (R) à l'atrazine cultivées en couche à l'extérieur.

Sur la base de l'étude des contenus en acides gras, peu de différences entre S et R existent. Pourtant, le DBI qui reflète l'augmentation de l'acide linoléique au détriment d'espèces d'acides gras moins insaturés pourrait contribuer à une légère augmentation de la fluidité des membranes résistantes (Burke et al., 1982). L'analyse de la composition en acides gras, comparée avec celle trouvée dans la littérature (voir p. précédentes), montre que les différences observées entre les biotypes S et R varient d'une espèce à l'autre et entre auteurs. Par conséquent, la composition en acides gras ne semble pas être nécessairement liée à l'acquisition de la résistance chloroplastique. Néanmoins, la seule différence de nature lipidique susceptible de modifier la fluidité des membranes R est la quantité plus élevée d'acide hexadéca-(3 trans)-énoïque dans le PG ainsi que la diminution du  $C_{18:1}$  des DGDG, SQDG et PC (pour ces deux derniers lipides, voir Murata et al., 1982). Cette liaison en position trans confère à la molécule de PG une rigidité accrue (Murata et al., 1982). Par ailleurs, ce lipide, que l'on trouve préférentiellement dans les parties accolées des membranes thylacoïdales (Li et al., 1989a), c'est-à-dire, proche ou en étroite relation avec le PS II porteur de la protéine 32 kDa fixatrice d'herbicides, pourrait jouer un rôle dans la fonction de capture de la lumière du LHCII associé au PS II (Rémy et al., 1982 et Dubacq & Trémolières, 1983).

Comme nous l'avons mentionné plus haut, plusieurs paramètres sont susceptibles de moduler la fluidité membranaire: le degré d'insaturation des acides gras (McMahon, 1979; Öquist, 1982; Gounaris et al., 1983d et Vigh et al., 1985b), le degré d'hydratation du système membranaire (Quinn & Williams, 1983), la température et la présence de stéroïdes (Yamamoto et al., 1981; Chapman et al., 1982 et Rawlyer & Siegenthaler, 1989b), le pH, le type et la concentration de cations (Gounaris et al., 1983a) et la présence de protéines dans la bicouche (Chapman et al., 1983 a et b; Millner et al., 1984a et b). Le Tab. VI présente quelques rapports entre les protéines thylacoïdales et les lipides de ces mêmes membranes: sur la base des chlorophylles, les membranes R ne sont que légèrement plus riches en protéines par rapport aux S. Par contre, sur la base du contenu protéinique, les membranes du biotype R sont sensiblement enrichies en lipides (14%) comparé aux S. Les études de Millner et al. (1984a) ont démontré que la quantité de protéines dans une membrane modifie la dynamique des chaînes acylées des lipides, c'est-à-dire qu'une valeur élevée du rapport lipide/protéine est associée à une fluidité accrue de la membrane. Or, la valeur de ce rapport, qui est plus grande chez les membranes R, suggère que ces membranes sont plus fluides que les membranes S. Selon Murphy & Woodrow (1983 a et b), la valeur du rapport lipide/protéine des membranes granaires est le double de celle mesurée pour des membranes thylacoïdales stromatiques et granaires ensemble. Cette répartition différenciée entre membranes accolées et non-accolées, suggère que le rapport lipide/protéine, qui est plus élevé dans les membranes thylacoïdales R (Tab. VI et VIII), peut refléter davantage une augmentation des saccules par grana (Burke et al., 1982; Lemoine et al., 1983; Mattoc et al., 1984; Vaughn & Duke, 1984 et Vaughn, 1986) plutôt qu'une fluidité accrue des thylacoïdes R par rapport aux S.

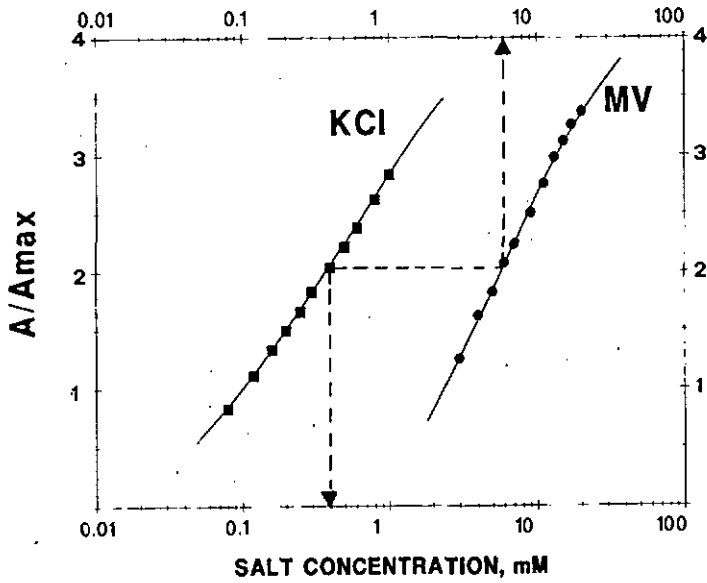


Fig.4 : Valeur du rapport des absorbances  $A/A_{max}$  de la safranine en fonction des concentrations de cations ajoutés. La densité superficielle de charge est déterminée à l'aide de 4 couples de concentrations en méthylviologène (MV) et KCl donnant un même rapport  $A/A_{max}$ .

Les différences observées entre les plantes sensibles et résistantes cultivées sous serre sont toujours visibles chez les plantes cultivées à l'extérieur. Lorsque l'on compare la composition lipidique des biotypes S et R cultivés en serre avec celle des biotypes cultivés en couche à l'extérieur (comparer les Tab. III et IV avec le Tab VII), on observe pour les plantes S et R cultivées en couche à l'extérieur: 1) des membranes appauvries en lipides; 2) un rapport lipide/protéine des thylacoïdes diminué de 25 à 30%, 3) des contenus en PG et SQDG diminués au profit de celui du DGDC et 4) des DBI des différentes classes de lipides toujours supérieures. On observe donc une adaptation des membranes aux conditions de culture et deux tendances semblent s'opposer: l'une cherchant à augmenter la fluidité des membranes (augmentation des valeurs du DBI) et l'autre, cherchant à la diminuer (diminution des valeurs du rapport lipide/protéine). Cette observation est probablement liée au fait que les plantes d'extérieur ont dû s'adapter aux fortes luminosités et aux importantes variations thermiques entre le jour et la nuit, alors que les cultures sous serre ont été protégées contre le soleil par un ombrage artificiel (peinture blanche et lattes de bois) et contre l'amplitude thermique entre le jour et la nuit par l'effet tampon de la serre.

#### 4.3 Détermination de la densité superficielle de charge des membranes thylacoïdales

La densité superficielle de charge des membranes thylacoïdales module, par l'intermédiaire du potentiel de surface, de nombreuses propriétés membranaires (Barber, 1980, 1982). Elle contrôle, en particulier, la concentration des ions à l'interface des membranes, la force d'attraction entre les protéines périphériques (p.ex. plastocyanine et ferédoxine), l'accessibilité des donneurs et accepteurs d'électrons à la surface membranaire, ainsi que les propriétés biophysiques de la membrane, notamment sa fluidité. La densité superficielle de charge agit également sur l'accrolement des thylacoïdes (Barber, 1980 et Davies *et al.*, 1986) et la formation des grana. La Fig. 4 présente les résultats d'une expérience typique réalisée dans le but de déterminer la densité superficielle de charge  $\sigma$ .

Lorsqu'une suspension de membranes thylacoïdales est ajoutée à une solution de safranine, l'absorbance, à 520 nm de cette dernière, diminue. Le niveau minimal de l'absorbance est atteint lorsque les thylacoïdes et la safranine sont seuls en présence et que toute trace d'ions divalents résiduels a été neutralisée par chélation avec de l'EDTA. Les thylacoïdes sont ensuite traités par des concentrations croissantes de KCl et/ou de méthylviologène (MV) qui induisent à chaque fois de nouvelles différences d'absorbance (520-552 nm). Quatre concentrations de KCl, respectivement de MV, donnant la même valeur du rapport  $A/A_{\max}$  permettent de calculer quatre valeurs de  $\sigma$  proches et de tirer un  $\sigma$  moyen. Les valeurs trouvées sont de  $-0.016 \pm 0.001$  et  $-0.017 \pm 0.003$  C/m<sup>2</sup> pour les membranes thylacoïdales S et R, respectivement (n=3 pour chacun des biotypes). Ces valeurs sont inférieures à celles trouvées pour les membranes thylacoïdales de l'Épinard ou du Pois qui ont un  $\sigma$  de  $-0.025$  C/m<sup>2</sup> (Barber, 1980; Chow & Barber, 1980). La charge de surface étant associée aux protéines membranaires plutôt qu'à la matrice lipidique (Berg *et al.*, 1974), la valeur du rapport lipide/protéine devient un paramètre important qui influence la valeur de  $\sigma$ . Pourtant, ces rapports

lipide/protéine chez les thylacoïdes des Morelles S et R (Tab. VI et VIII) sont assez proches de celui des membranes de l'Épinard (Rawlyer et al., 1987). Ainsi, il faut admettre que d'autres paramètres influent également sur la charge de surface, par exemple la composition en protéines, la séquence des acides aminés de ces protéines ou la valeur du rapport PS I/PS II (Davies et al., 1986). En considérant les charges de surface des membranes thylacoïdales au sein de l'espèce *Solanum nigrum*, la légère augmentation de  $\sigma$  des membranes thylacoïdales du biotype R pourrait refléter leur faible enrichissement protéinique relativement aux S (Tab. VI). D'autre part, nous avons vu précédemment que la diminution de la valeur Chl *a/b* est accompagnée d'une augmentation en LHCP du PS II (Leong & Anderson, 1983). Or, la présence du LHCP a été reconnue pour jouer un rôle important dans le phénomène de l'accolement des membranes thylacoïdales ou "stacking" (Anderson et al., 1984). En 1986, Davies et al. démontrèrent qu'un pourcentage d'accolement élevé était en relation directe avec une faible irradiance lors de la culture des plantes, une faible charge de surface et une proportion élevée de LHCP.

#### 4.4 Organisation transmembranaire des lipides des membranes thylacoïdales

Les trois complexes protéiniques responsables du flux d'électrons possèdent un arrangement interne fortement asymétrique lié à leur fonction vectorielle (voir Ort, 1986 pour une revue). Une hétérogénéité latérale des complexes protéiniques est aussi largement reconnue et par voie de conséquence, les pigments, associés spécifiquement à certains complexes polypeptidiques, le sont également (Murphy & Woodrow, 1983 a et b). En plus de l'arrangement hétérogène des protéines, plusieurs auteurs ont montré que les lipides sont distribués de manière hétérogène dans le plan de la membrane (Gounaris et al., 1983c; Murphy & Woodrow, 1983 a et b et Murphy, 1986 a et b) et entre les deux feuillettes membranaires du thylacoïde (Rawlyer & Siegenthaler, 1981a; Giroud & Siegenthaler, 1984; Unitt & Harwood, 1985; Sundby & Larsson, 1985; Rawlyer & Siegenthaler, 1985; Rawlyer et al. 1987; Siegenthaler et al., 1987; Giroud & Siegenthaler, 1988 et Siegenthaler et al., 1989). Par ailleurs, certains lipides peuvent aussi interagir spécifiquement avec certains complexes protéiniques (Dubacq & Trémoilières, 1983; Gounaris & Barber, 1985; Pick et al., 1985; Sigrist et al., 1988; Horvath et al., 1989 et Li et al., 1989a et b).

Au vu de ces résultats, il paraît légitime d'envisager qu'un changement de la distribution transversale des phospho- et/ou des galactolipides puisse influencer sur le caractère de la résistance chloroplastique. Nous procéderons de la manière suivante et nous discuterons de:

- la méthodologie enzymatique
- quelques propriétés des sondes et des membranes
- l'analyse de la distribution des phospholipides dans les thylacoïdes des biotypes S et R
- l'analyse de la distribution des galactolipides dans les thylacoïdes des biotypes S et R

et nous conclurons sur quelques implications de nos résultats.

### Méthodologie :

Celle-ci a déjà fait l'objet de nombreuses revues (Op den Kamp, 1979; van Deenen, 1980; Siegenthaler, 1982 et Siegenthaler & Rawlyer, 1986). Le principe est basé sur l'utilisation d'une enzyme lipolytique (\*) qui modifie uniquement les lipides acylés localisés dans le feuillet externe de la bicouche membranaire pour autant que l'on travaille à basse température. Pour estimer valablement la localisation des lipides, la méthode enzymatique ne peut être utilisée que dans certaines conditions:

- 1°/ Les membranes étudiées doivent former des structures fermées et de même orientation.
- 2°/ L'action de l'enzyme lipolytique ne doit pas modifier l'architecture de la membrane, ni son intégrité structurale (et si possible fonctionnelle).
- 3°/ La lipase ne doit pas induire des séparations ou des transitions de phase des lipides.
- 4°/ La modification des lipides situés uniquement dans le feuillet externe peut engendrer un déséquilibre transversal que la membrane tend à compenser par une redistribution des lipides entre les deux feuillets. Ce mouvement des lipides du feuillet interne vers le feuillet externe et vice versa, naturel ou provoqué par la lipase, doit être négligeable par rapport à la vitesse de travail de cette enzyme.
- 5°/ Tous les lipides doivent être accessibles à la lipase lorsqu'elle a accès aux deux feuillets membranaires. Pour rendre les deux faces de la membrane accessibles à la lipase, il faut provoquer l'ouverture des vésicules sans pour autant disloquer l'organisation moléculaire de la membrane.
- 6°/ L'enzyme lipolytique ne doit en aucun cas lyser les structures membranaires. Si les membranes sont lysées, la lipase pénétrera à l'intérieur des vésicules et hydrolysera les lipides du feuillet interne, disloquant ainsi complètement la structure membranaire.

(\*) Remarque: Dans notre étude de l'asymétrie lipidique par la méthode enzymatique, nous avons eu recours uniquement à des lipases, aussi nous parlerons de ces dernières également dans le sens large d'enzyme lipolytique, tout en sachant que la méthode enzymatique fait appel à plusieurs types différents d'enzymes (p.ex. acyl-hydrolase, galactose oxidase etc...).

Ces six points résument la problématique de la détermination de la distribution transversale des différentes classes de lipides par l'approche enzymatique (voir Siegenthaler, 1982 et Siegenthaler & Rawlyer, 1986 pour des revues). Dès 1988, Siegenthaler et al. démontrèrent que l'asymétrie, feuillet externe/feuillet interne, des galactolipides des membranes thylacoïdales inversées ("inside-out vesicles") d'Epinaré était d'env. 40/60 et de 20/80 pour les MGDC et DGDC, respectivement. Ces valeurs sont inverses de celles observées (soit env 60/40 et 80/20) dans des membranes thylacoïdales "natives" de la même plante. Cette réciprocité démontre la fiabilité de la méthode.

Notre intérêt s'est porté, dans cette deuxième partie, sur la distribution transmembranaire des lipides thylacoïdaux des deux biotypes. Nous nous sommes basés sur des techniques qui respectent, complètement ou partiellement, les six conditions citées ci-dessus et qui ont été développées dans ce laboratoire (voir également les thèses de Rawlyer, 1980 et Giroud, 1986).

#### Propriétés des deux lipases (LRA et PLA<sub>2</sub>) :

Les deux lipases utilisées dans cette étude de l'asymétrie transversale des lipides thylacoïdaux sont deux lipases, la phospholipase A<sub>2</sub> de pancréas de porc (PLA<sub>2</sub>) et la lipase A<sub>1</sub> de *Rhizopus arrhizus* (LRA) à spécificité plus large.

L'analyse des cinétiques d'hydrolyse enzymatique des phospholipides disposés en films monomoléculaires a été décrite par Dawson (1969). La réaction suit une cinétique de type:

$$-dc/dt = k \times c \times [H_2O]$$

où  $c$  est la concentration du substrat à la surface de la monocouche après un temps  $t$  et  $k$  est une constante de vitesse.

En intégrant, on trouve:

$$\log c = K \times t + \text{constante}$$

où  $K = k \times [H_2O]$

ainsi en exprimant le  $\log$  de  $c$  en fonction de  $t$ , on obtient une droite.

Les caractéristiques des deux enzymes sont les suivantes:

#### \* Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (E.C. 3.1.1.4)

Origine	:	pancréas de porc
Substrat	:	PG > PC
Poids moléculaire	:	14'000
Cofacteur	:	Ca <sup>2+</sup> (1-10 mM)
Inhibiteur	:	EDTA
pH optimum	:	7.9 - 8.4
pI	:	7.4
Produits d'hydrolyse	:	acides gras libres + 2-lyso-lipides

\* Lipase A<sub>1</sub> (Lra) (E.C. 3.1.1.3)

Origine	:	<i>Rhizopus arrhizus</i> (Mucorale)
Substrat	:	MGDG > DGDG ≈ SQDG > PG et PC
Poids moléculaire	:	40'000
Activateur	:	Na <sup>+</sup>
Cofacteur	:	(Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> )
Inhibiteur	:	(EDTA, Zn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> )
pH optimum	:	7.0
pI	:	6.3
Produits d'hydrolyse	:	acides gras + 1-lyso-lipides

Les enzymes PLA<sub>2</sub> et Lra sont dépendantes de plusieurs paramètres physico-chimiques (Rawlyer & Siegenthaler, 1985), dont :

- la pression latérale membranaire ou pression de "packing". Les enzymes peuvent travailler tant que cette pression n'excède pas une valeur limite (Roelofsen, 1982). Il est à noter que, dans notre cas (PLA<sub>2</sub> et Lra), l'hydrolyse des substrats (un lysolipide et un acide gras) s'accompagne d'une augmentation de la pression.
- le potentiel de surface  $\phi_s$ . Une modification de la valeur de ce paramètre s'accompagne d'un changement des propriétés biophysiques de la membrane, que ce soit la fluidité, le "packing", le pH de surface, ou la concentration des ions à l'interface membranaire (Barber, 1980 et 1982; Rawlyer & Siegenthaler, 1985). La charge de surface native des membranes peut être augmentée par les produits d'hydrolyse (acides gras libres).
- la température. Elle contrôle la vitesse d'hydrolyse des lipides, en accord avec la loi d'Arrhenius qui lie vitesse et température et par l'effet même que cette dernière exerce sur la fluidité et la pression latérale membranaire (Rawlyer & Siegenthaler, 1985; Roelofsen, 1982).
- les protéines qui peuvent masquer certains sites de reconnaissance et gêner ou même bloquer ainsi l'hydrolyse des substrats.
- les produits d'hydrolyse. En effet, les dérivés "lyso" et les acides gras libres, par leur pouvoir détersif, peuvent modifier la perméabilité membranaire (Shier, 1982). Des transitions de phase peuvent également apparaître suite à la présence de ces produits dans la bicouche (Thomas et al., 1985).

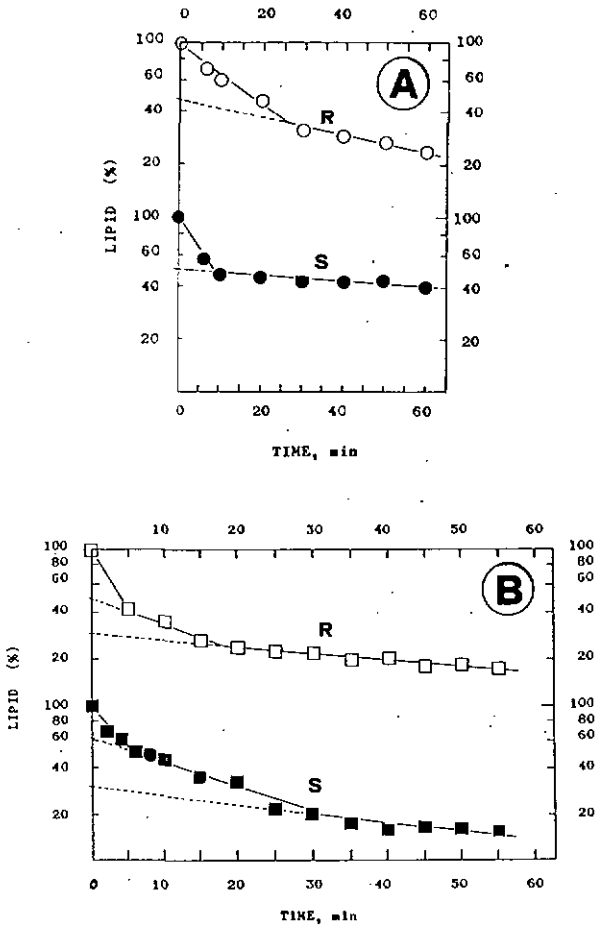


Fig. 5 : Pourcentage d'hydrolyse (A) de la PC des biotypes S (●) et R (○) et (B) du PG des biotypes S (■) et R (□) des membranes thylacoidales traitées avec la phospholipase  $A_2$  de pancréas de porc.

#### 4.4.1 Asymétrie transversale des phospholipides

Les Figures 5 A et B présentent les courbes semi-logarithmiques d'hydrolyse de la PC (A) et du PG (B), c'est-à-dire, le pourcentage de lipide hydrolysé versus le temps d'incubation en présence de la phospholipase A<sub>2</sub> de pancréas de porc. Ce sont les courbes d'une expérience typique d'hydrolyse dans les conditions mentionnées sous "Matériel et Méthodes".

Les cinétiques d'hydrolyse de la phosphatidylcholine sont biphasiques (Fig. 5A). L'extrapolation au temps zéro de la deuxième phase permet de définir une valeur qui indique la quantité de PC localisée dans le feuillet interne du thylacoïde. On constate: (i) que la deuxième phase, correspondant au "pool topologique" (Rawlyer & Siegenthaler, 1985), est atteinte plus rapidement chez le biotype S que chez le R; (ii) que l'hydrolyse des lipides du dernier pool est significativement plus rapide chez les membranes R que chez les S; (iii) que l'extrapolation au temps zéro de la dernière phase indique une distribution de  $45 \pm 10\%$  de la PC dans le feuillet externe et de  $55 \pm 10\%$  dans le feuillet interne des membranes thylacoïdales des biotypes S et R ( $n = 4$  et  $3$  pour S et R, respectivement). Ainsi, bien que la distribution transmembranaire de la PC soit similaire dans les deux biotypes, les cinétiques d'hydrolyse sont quelque peu différentes. Ces différences indiquent que le pool de PC du feuillet externe est plus rapidement accessible à la PLA<sub>2</sub> dans les thylacoïdes S que dans les R. Cela peut être dû à un état plus fluide du pool externe de PC.

La pente de la droite correspondant à l'hydrolyse du dernier pool est associée au mouvement des lipides du feuillet interne vers le feuillet externe (mouvement transmembranaire ou "transbilayer movement"). Or, la pente de cette droite est plus grande chez le biotype R que chez le S, ce qui suggère que le mouvement transmembranaire des molécules de PC est accru dans les membranes R par rapport aux S à la température de l'expérience (20°C). Ceci nous permet d'émettre l'hypothèse que la PC peut être plus fortement associée à certains complexes protéiniques situés dans la monocouche interne des thylacoïdes S, qu'à des complexes protéiniques situés dans la monocouche interne des R. La mutation peut avoir affaibli ce type d'association (protéines-PC) chez le R.

Les cinétiques d'hydrolyse du phosphatidylglycérol sont triphasiques (Fig. 5B). L'extrapolation au temps zéro de chacune des phases permet de déterminer l'existence et la taille de trois pools de lipides de réactivité décroissante (Oemant et al., 1979). Le deuxième pool ou pool intermédiaire, serait la conséquence d'une augmentation de la pression latérale membranaire induite par la libération des produits d'hydrolyse dans la membrane (Rawlyer & Siegenthaler, 1985). Comme dans le cas de l'hydrolyse de la PC, le dernier pool est le pool topologique. Il indique un contenu en PG du feuillet externe de  $63 \pm 5\%$  et  $65 \pm 5\%$  chez S et R respectivement et un contenu du feuillet interne de  $37 \pm 5\%$  et  $35 \pm 5\%$  chez S et R, respectivement ( $n = 4$  et  $3$  pour S et R, respectivement). Ainsi, on constate là aussi que la distribution du PG est similaire chez les deux biotypes. Pourtant, le pool topologique est atteint plus rapidement chez le biotype R. D'autre part, le mouvement transmembranaire du PG, est légèrement plus prononcé chez le biotype S à la température

de l'expérience (20°C). Ainsi, dans le cas du PG, il semble que ce soit les membranes R qui soient plus fluides que les S, puisque plus rapidement attaquées.

La vitesse d'hydrolyse ainsi que le mouvement transmembranaire des phospholipides peuvent également être associés, outre au phénomène de la fluidité, à celui de l'accessibilité de l'enzyme pour son substrat. Certaines molécules de PC chez le biotype S et certaines molécules de PG chez le biotype R étant plus difficilement hydrolysables que chez le biotype opposé. Suite à la mutation chez le biotype R, deux possibilités sont envisageables: 1) la membrane présente des irrégularités au sein des phospholipides; 2) certaines liaisons spécifiques phospholipides-protéines sont affaiblies. L'une ou l'autre, voir les deux possibilités peuvent contribuer à ralentir (cas de la PC) ou accélérer (cas du PG) la vitesse d'hydrolyse des phospholipides des thylacoïdes R. On peut également envisager que l'amplification du mouvement transmembranaire (cas de la PC) ou son atténuation (cas du PG), relève du même phénomène.

La distribution transmembranaire des phospholipides et principalement celle du PG, est en accord avec les travaux de Rawyler & Siegenthaler (1981a) et de Siegenthaler et al. (1987 et 1989) dans le cas de l'Épinard, de Unitt & Harwood (1985) dans le cas de l'Orge, de la Laitue et du Pois et de Siegenthaler & Giroud (1986) dans le cas de l'Avoine. Tous constatèrent un enrichissement du feuillet externe en PG (environ 70/30, feuillets ext/int). Unitt & Harwood (1985), démontrèrent même que l'espèce moléculaire de PG contenant l'acide hexadéca-(3 *trans*)-énoïque était exclusivement localisée dans le feuillet externe. Pour la PC, les résultats varient davantage selon ces auteurs. A ce propos, il faut rappeler que la PC constitue, chez la Morelle, environ 1% du contenu lipidique total des membranes thylacoïdales, contre environ 10% pour le PG. La PC est donc un lipide mineur dans le thylacoïde. Elle est principalement concentrée dans les enveloppes et dans les structures membranaires étrangères aux chloroplastes (Dorne et al., 1990). Si les membranes thylacoïdales ne sont qu'imparfaitement purifiées, la localisation de la PC s'en trouvera faussée. D'autre part, la faible quantité de PC rend la méthode de dosage difficile et parfois à la limite de résolution de cette technique dans nos conditions, ce qui explique, en tout cas partiellement, l'écart-type plus important lors de l'hydrolyse de ce lipide comparé à celui du PG. Néanmoins, on peut proposer une distribution transmembranaire de la PC proche de 50/50 (feuillets ext/int) (voir aussi Siegenthaler et al., 1989).

Les conditions choisies lors de l'hydrolyse des phospholipides nous ont permis de déterminer la distribution transmembranaire des phospholipides. Nous avons observé qu'elle était similaire autant pour la PC que pour le PG dans les membranes thylacoïdales des deux biotypes. Quelques légères différences apparaissent dans les cinétiques d'hydrolyse: le pool topologique de PC est plus rapidement atteint chez le biotype S que chez le R d'une part et d'autre part, le pool topologique de PG est, quant à lui, plus rapidement atteint chez le R que chez le S. Il est difficile d'interpréter ces deux observations, pourtant, vu la faible concentration des thylacoïdes en PG, il est pensable que cette dernière soit localisée de manière très spécifique, peut-être dans certaines régions du PS II

(Horvath *et al.*, 1989). Dans ce cas, la conformation de la protéine, probablement altérée chez le mutant, peut avoir, engendré un affaiblissement de cohésion entre les polypeptides et les molécules de PC d'une part, et d'autre part, avoir masqué ces dernières contre l'attaque de la lipase. La concentration plus importante de PG permet d'interpréter de manière plus fiable les courbes de la Fig. 5B: l'hydrolyse du PG, plus rapide dans les membranes thylacoïdales R, suggère une fluidité accrue de ces dernières. Cette interprétation est confirmée par un rapport lipide/protéine et des DBI supérieurs, comparés à ceux du biotype S (Tab. V, VI et VIII).

#### 4.4.2 Asymétrie transversale des galactolipides

La lipase de *Rhizopus arrhizus* a largement contribué à la détermination de la distribution transmembranaire des galactolipides. A l'heure actuelle, il est généralement accepté que le MGDG est localisé préférentiellement dans le feuillet externe et le DGDG dans le feuillet interne du thylacoïde et ceci dans plusieurs genres de plantes des régions tempérées (Rawlyer *et al.*, 1987)

La figure 6 montre les cinétiques d'hydrolyse des galactolipides par la lipase de *Rhizopus arrhizus*. Nous avons utilisé trois conditions d'hydrolyse (Tab. IX).

MILIEUX	COMPDSANTS	(mM)	T (°C)	$\phi_0$ (mV)
1	sorbitol	300	20	-111
	MOPS/NaOH	1		
2	sorbitol	300	20	- 22
	MOPS/KOH	5		
	NaCl	10		
	KCl	85		
3	sorbitol	300	2	- 20
	MOPS/KOH	5		
	NaCl	10		
	KCl	85		

Tab. IX : Composition chimique des milieux d'incubation, ajustés à pH 7.6 et le potentiel de surface qu'ils engendrent chez les membranes thylacoïdales des biotypes S et R.

La vitesse de dégradation va, pour chacune des phases successives, en décroissant (Figs 6 A, B et C), ce que nous observons dans les trois conditions qui furent les nôtres (Tab. IX). Une dislocation de la membrane pouvant être visualisée par une brusque accélération de la vitesse d'hydrolyse, nous constatons que les "pools topologiques" des MG DG et DG DG sont atteints sans que l'architecture membranaire soit fondamentalement modifiée, et ceci même après 50 à 60 minutes d'incubation des membranes thylacoïdales en présence d'une concentration élevée d'enzyme (30 U/mg Chl).

Dans les trois conditions étudiées, l'hydrolyse du DG DG est biphasique. L'amplitude des deux pools de DG DG est constante et sans rapport, ni avec les conditions ioniques, ni avec la température. Ce comportement, dans des conditions où la lipase et le Na<sup>+</sup> sont en excès, est propre au pool topologique. Par conséquent, ce premier pool de DG DG (12% ± 2 pour S et 16% ± 3 pour R) peut être attribué à la monocouche extérieure alors que la seconde (88% ± 2 pour S et 84% ± 3 pour R) à la monocouche intérieure.

L'augmentation de la concentration ionique dans le milieu d'incubation a pour effet de masquer la charge de surface, donc de diminuer la valeur absolue du potentiel de surface. L'augmentation de la température, quant à elle, tend à fluidifier la structure membranaire. On assiste, dans les conditions où la concentration ionique est forte, à une augmentation de la vitesse et de l'amplitude de l'hydrolyse du MG DG, d'une part (comparer les Figs 6A et B) et d'autre part, lors de l'abaissement de la température pendant l'incubation, à une légère diminution à la fois de la vitesse et de l'amplitude d'hydrolyse du MG DG (comparer les Figs 6B et C). Ainsi, la pression latérale membranaire des thylacoïdes peut être modulée par la concentration ionique du milieu de suspension (si la concentration ionique augmente, la pression de packing diminue) et/ou par la température (si la température augmente, la pression de packing diminue également).

Les cinétiques d'hydrolyse du MG DG sont difficiles à interpréter. Trois pools de réactivité décroissante peuvent être discernés, chacun caractérisé par sa propre vitesse d'hydrolyse. Les valeurs extrapolées au temps zéro pour la phase intermédiaire et la phase finale sont respectivement 75 et 47% pour les deux biotypes. Si nous appliquons à ces cinétiques la même interprétation que celle que nous avons utilisée lors du traitement par la PLA<sub>2</sub>, le pool de plus faible réactivité représente la quantité de lipides localisés dans le feuillet interne et l'existence d'un pool intermédiaire serait la conséquence d'une augmentation de la pression latérale membranaire induite par la libération des produits d'hydrolyse dans la membrane (Rawlyer & Siegenthaler, 1985).

La concentration ionique dans le milieu influence le potentiel de surface, mécanisme-clé qui agit sur la fluidité et la pression latérale membranaire et par-là même sur l'activité enzymatique. On note que lorsque la valeur négative de  $\phi_0$  est faible et que le fonctionnement de l'enzyme est favorisé, les thylacoïdes sont accolés. Or, l'accolement des membranes thylacoïdales ne semble pas restreindre l'accessibilité de la lipase pour son substrat (Rawlyer & Siegenthaler, 1985).

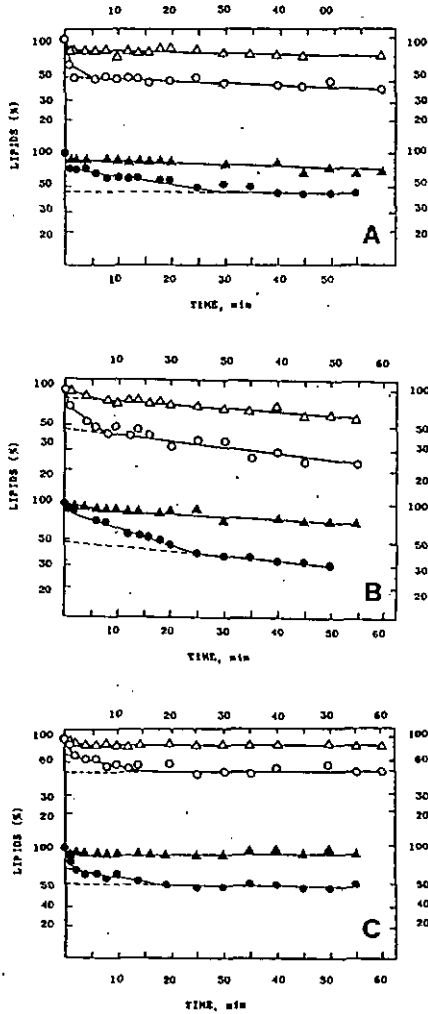


Fig. 6: Pourcentage d'hydrolyse du MGDG (0, ●) des biotypes S et R et du DGDG (Δ, ▲) des biotypes S et R des membranes thylacoidales traitées avec la lipase de *Rhizopus arrhizus* dans divers milieux (voir matériel et méthodes): A) T = 20°C et  $\phi_0 = -111\text{mV}$ ; B) T = 20°C et  $\phi_0 = -22\text{mV}$ ; C) T = 2°C et  $\phi_0 = -20\text{mV}$ .

Nous n'avons noté aucune hydrolyse significative du SQDG. Ceci peut être attribué: 1) à la spécificité de la LRA, la pression de packing étant supérieure entre les molécules de SQDG qu'entre les molécules de DGDG ou de MGDG, la LRA hydrolysera d'abord ces derniers; 2) au SQDG qui pourrait être entièrement localisé dans le feuillet interne, puisque nous avons démontré que, dans nos conditions, l'hydrolyse des galactolipides se limitait à la monocouche externe; 3) au sulfolipide qui pourrait être inaccessible à l'activité de la LRA parce que protégé de l'hydrolyse par une forte interaction avec des protéines, cette interaction étant associée à une pression de packing supérieure à la pression de packing limite pour laquelle la lipase pourrait hydrolyser les molécules de SQDG.

Au terme de cette partie, nos résultats (Tab. X) nous permettent de conclure que la distribution du MGDG dans le feuillet externe et dans le feuillet interne est de 53 et 47 (mol%) pour S comme pour R. Par contre, la distribution du DGDG, feuillets ext/int est de 12/88 pour S et de 16/84 pour R. En d'autres termes et au vu des valeurs du Tab. X, les galactolipides ne sont pas répartis également de part et d'autre de la membrane, avec des rapports ext/int de 0.73 pour R et 0.68 pour S. Cette dernière observation est associée à un enrichissement des galactolipides dans la couche intérieure des membranes thylacoïdales de S par rapport à celles de R. Plus particulièrement, c'est le DGDG qui contribue à cet enrichissement lipidique. Ce lipide, à l'état natif, est reconnu pour former des doubles couches lamellaires en milieu aqueux, contrairement au MGDG, qui dans les mêmes conditions, forme des structures non-bicouches ou hexagonales inverses (Quinn & Williams, 1983).

Le rapport molaire MGDG/DGDG (Tab. X) est élevé dans le feuillet externe (>7.0) et beaucoup plus petit dans le feuillet interne (<1.5). Etant donné que le MGDG est un lipide non-bicouche, on peut se demander quelle est la signification d'un rapport si élevé dans le feuillet externe d'une membrane, qui pourtant, adopte la structure bicouche. Si on considère un rapport MGDG/DGDG de 2.5 comme étant critique dans la formation de phases non-lamellaires (Sprague & Staehelin, 1984), alors, un mélange de galactolipides dont la composition serait similaire à celle du feuillet externe devrait contenir exclusivement des structures non-lamellaires, alors qu'un mélange de galactolipides dont la composition serait similaire à celle du feuillet interne devrait contenir seulement des structures lamellaires. Ainsi, une configuration lamellaire du feuillet interne serait due aux galactolipides seulement, en faisant abstraction de la contribution des autres lipides bicouches (SQDG et PG). Ceci n'est vraisemblablement pas le cas pour le feuillet externe. Cependant, il est bien connu que la membrane thylacoïdale est une structure bicouche en conditions physiologiques (Arntzen & Briantais, 1975). Il est donc évident que d'autres composants contribuent à la stabilisation de la configuration lamellaire du feuillet externe et les premiers candidats capables de stabiliser la membrane sont les protéines (Cullis & de Kruijff, 1979). La présence des autres lipides peut également être importante.

	S	R
MGDG (mol% des lipides acylés totaux)	55	53
DGDG (mol% des lipides acylés totaux)	24	23
MGDG (mol%) extérieur : intérieur	53:47	53:47
DGDG (mol%) extérieur : intérieur	12:88	16:84
Rapport molaire des galactolipides monocouche ext / monocouche int	0.68	0.73
MGDG / DGDG		
- monocouche extérieure	9.67	7.00
- monocouche intérieure	1.24	1.32
Quantité des lipides non-bicouches *		
- monocouche extérieure	14.1/29 (0.49)	16.7/28 (0.60)
- monocouche intérieure	30.9/26 (1.19)	30.3/25 (1.21)

Tab. X : Asymétrie des galactolipides des membranes thylacoïdales de Morelles sensible (S) et résistante (R) à l'atrazine. Les valeurs sont la moyenne de 5 expériences.

\* Quantité de lipides non-bicouches dans les deux feuilletts thylacoïdaux. Les quantités sont calculées en supposant que tout le MGDG est un lipide potentiellement non-bicouche et que tous les autres lipides (DGDG, SQDG, PG, etc.) sont des lipides bicouches. La distribution transversale du PG est de 70/30 (mol%) dans les monocouches extérieure et intérieure du thylacoïde (voir point 4.4.1) et celle du SQDG, supposée, de 40/60 (mol%).

Bien que la configuration la plus probable du feuillet externe soit une configuration lamellaire, il n'est pas impossible que les deux structures, hexagonale et lamellaire, puissent coexister, ceci ayant été démontré dans des conditions particulières, c'est-à-dire, soit à pH bas ( $\approx 4$ ), soit en présence de cations métalliques ( $< 10$  mM) (Gounaris *et al.*, 1983a). La signification des grandes quantités de lipides non-bicouches dans la membrane thylacoïdale n'est pas connue. Pourtant, la proportion de MGDG dans le feuillet externe est si importante que l'on peut envisager que des structures non-lamellaires soient induites par des changements subtils de: i) température (Giroud & Siegenthaler, 1984); ii) cations particuliers (Unitt & Harwood, 1985); iii) protéines membranaires (Cullis & de Kruijff, 1979; Millner *et al.*, 1984 et Pick *et al.*, 1984). Par ailleurs la présence de structures hexagonales peut jouer un rôle dans les phénomènes de fusion lors de la biogenèse du chloroplaste (Cullis & de Kruijff, 1979), dans l'adaptation morphologique lors de la croissance à la lumière et à l'ombre (Boardman, 1977) ou dans une adaptation rapide lors des transitions "state 1 / state 2". (Staehelin & Arntzen, 1983). Quoi qu'il en soit, Giroud et Siegenthaler (1988) démontrèrent que le passage du prothylacoïde au thylacoïde lors du verdissement ne modifie pas l'asymétrie transmembranaire des galactolipides mais que c'est l'incorporation des complexes chlorophylles-protéines dans la membrane thylacoïdale naissante qui semble préserver la configuration bicouche à la membrane verdissante, sans quoi elle adopterait des structures non lamellaires.

Finalement, nous devons mentionner que les asymétries décrites sous les points 4.4.1 et 2, n'excluent pas la possibilité que les phospholipides et/ou les galactolipides puissent adopter une distribution transmembranaire différente dans les grana et dans les thylacoïdes stromatiques.

#### 4.5 Fluidité relative des membranes thylacoïdales

Le masquage des charges négatives de surface des complexes protéiques du thylacoïde par les cations provoque leur diffusion dans le plan de la membrane et décroît les échanges d'énergie entre les deux photosystèmes (spillover). La fluorescence du PS II augmente au détriment de celle du PS-I. Les complexes PS II se regroupent en unités fortement connectées dans des régions à basse densité de charge de surface permettant ainsi l'accrolement des thylacoïdes et la formation de grana (Barber et al., 1980). Les unités PS I restent localisées dans des domaines à densité de charge élevée (Barber, 1980). La vitesse à laquelle se produit l'augmentation de fluorescence du PS II est directement liée à la fluidité membranaire. La Fig. 7 présente les effets d'une addition de  $Mg^{2+}$  sur la fluorescence émises par les PS II des membranes thylacoïdales suspendues en présence de DCMU à 20°C. En mesurant le demi-temps de montée de la fluorescence ( $T_{1/2}$ ) pour les deux types de membranes thylacoïdales, il apparaît que ce dernier est plus élevé chez le biotype R que chez le S (12 et 8 sec, respectivement). De plus, le fait que l'amplitude du maximum de la fluorescence soit réduite chez le biotype S montre qu'à un effet sur la fluidité membranaire s'ajoute un effet sur les complexes eux-mêmes (Yamamoto et al., 1981), comme si la connection entre les unités PS II du biotype R était plus forte que celle du S, ou encore, qu'un plus grand nombre de grana se formait, ce que nous avons déjà suggéré précédemment (§ 4.1).

Quand les thylacoïdes sont traités avec du cholestérol, un agent rigidifiant qui augmente la viscosité de la partie lipidique, le  $T_{1/2}$  s'accroît significativement (Pederson & Cox, 1984). La Fig. 8A présente effectivement une augmentation de la valeur  $T_{1/2}$  lorsque 33  $\mu M$  de cholestérol sont ajoutés à la suspension thylacoïdales. De plus, aux concentrations supérieures à 33  $\mu M$  de cholestérol, on assiste non seulement à un ralentissement de l'induction de la fluorescence mais également à une diminution de l'amplitude de cette dernière. Par contre, une addition d'atrazine (0.4 mM) sur des membranes thylacoïdales traitées au cholestérol (83  $\mu M$ ), rétablit partiellement la baisse de fluorescence induite par le stérol (Fig. 8B), comme si l'atrazine avait un effet inverse à ce dernier et qu'il fluidifiait la membrane dans ces conditions (voir 1<sup>re</sup> Partie). Il est à noter que la modulation de l'induction de la fluorescence ( $T_{1/2}$  et amplitude) n'est observable que sur des membranes thylacoïdales S. Sur des membranes thylacoïdales R, une adjonction de stérol ou d'herbicide n'a pas modifié le signal d'induction de la fluorescence par le  $Mg^{2+}$  (résultats non montrés). Deux causes peuvent être invoquées, l'une d'elle est un endommagement des complexes chlorophylle-protéine suite à la mutation survenue chez le biotype R, d'une manière telle que la formation de grana soit ralentie par l'augmentation de viscosité dans l'environnement immédiat des PS II du mutant comparées à celles du sauvage. L'autre possibilité est que la migration des complexes

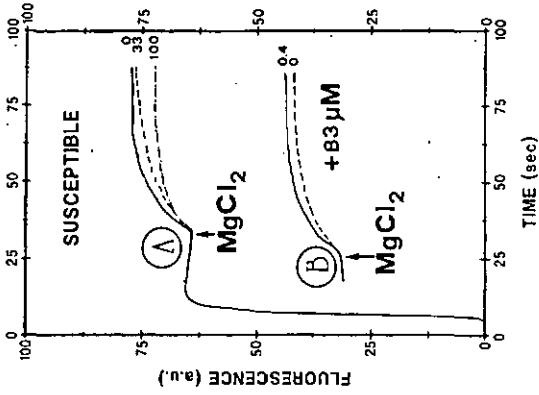


Fig. 6: Courbes d'induction de la fluorescence par le  $MgCl_2$  de souches chlorellaïdes de morilles sensibles.

- (A) sans cholestérol (—), + 33  $\mu M$  cholestérol (---).  
 (B) Les souches chlorellaïdes ont été traitées avec 83  $\mu M$  de cholestérol puis 0,4  $\mu M$  d'erythrine un jour après. Légende: sans herbicide (—), herbicide (---).

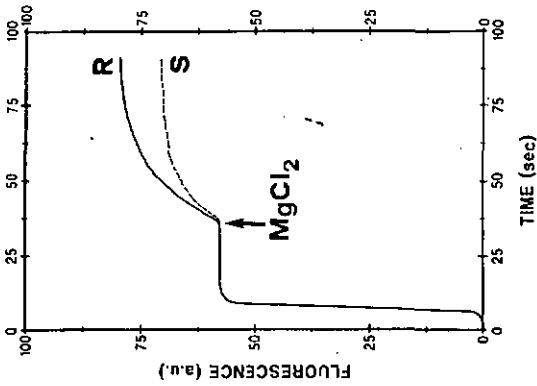


Fig. 7: Courbes d'induction de la fluorescence par le  $MgCl_2$  de souches chlorellaïdes de morilles sensibles (S) et résistantes (R).

nécessite un rapport lipides non-bicouche/lipides bicouche élevé. Or, la valeur de ce rapport est significativement plus bas dans la monocouche extérieure des membranes thylacoïdales S que dans celles du R.

Une autre manière de rendre compte de la fluidité relative des membranes thylacoïdales consiste à mesurer le "steady-state" de la polarisation de la fluorescence de la DPH incorporée dans les thylacoïdes (Fig. 9. Ces données ont été obtenues par l'équipe du Dr. Vigh à Szeged (Hongrie) lors d'une de nos collaborations. On constate qu'aucune différence de fluidité entre les deux types de membrane ne semble apparaître entre 5 et 50°C.

Ainsi, nous avons d'abord suggéré une fluidité accrue des membranes thylacoïdales R par rapport aux S, par la technique hydrolytique des lipides de la monocouche externe des thylacoïdes. Nous avons, par la méthode de l'induction de la fluorescence par le  $Mg^{++}$ , suggéré le contraire et par la méthode de la mesure du "steady-state" de la polarisation de la DPH, il semble que nous ayons atteint un "statu-quo" entre les deux biotypes. Cependant, il se peut, comme nous l'avons déjà évoqué dans la première partie, que les différentes techniques reflètent des niveaux de fluidité à différents endroits de la membrane. En effet, la technique hydrolytique dans nos conditions expérimentales ne touche que le feuillet externe; la technique d'induction de la fluorescence par les cations est le reflet de modifications localisées principalement dans le voisinage des unités PS II et la technique faisant appel au DPH, réparti ce dernier dans toute la membrane sans distinction d'asymétrie transversale ou latérale des lipides thylacoïdaux (Barber et al., 1984).

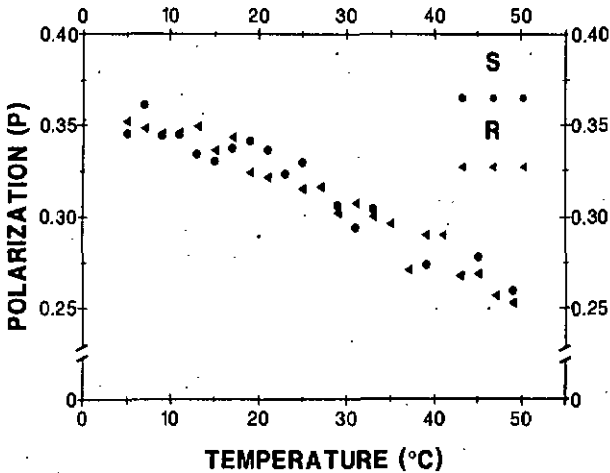


Fig. 9: Degré de polarisation de la sonde 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène incorporée dans des membranes thylacoïdales des biotypes de la morelle noire sensible (S,•) et résistante (R,▲) à l'atrazine entre 5 et 50°C. Résultats obtenus dans le laboratoire du Dr. L. Vigh (Szeged, Hongrie).

## 5 RESUME

Nous avons, dans cette troisième partie, caractérisé les phases lipidiques de *Solanum nigrum* L. sensible et résistante à l'atrazine dans le but de chercher si des différences de nature structurale et compositionnelle étaient apparues suite à la mutation. Nous résumons ces principales différences dans le Tab. XI.

	S	R
<u>Pigments</u>		
Chl a/b	2.5	2.2
<u>Glycérolipides</u>		
Totaux (nmol/mg Chl)	2584	3104
SQDG (mol%)	11	15
<u>Acides gras</u>		
18:3 du DGDG (mol%)	69.9	74.1
16:1 du PG (mol%)	35.4	40.2
DBI du MGDG	2.77	2.85
<u>Lipides/protéines</u>	370	431
<u>Asymétrie lipidique</u>		
ext/int du DGDG (mol%)	12:88	16:84
rapport molaire ext/int des galactolipides	0.68	0.73

Tab. XI: Résumé des différents paramètres étudiés dans cette troisième partie pour les biotypes sensible (S) et résistant (R) à l'atrazine de *Solanum nigrum*. Seuls les caractères dont les écarts-types ne se chevauchent pas ont été pris en considération.

Nous présenterons les résultats sans mentionner de références, que vous trouverez dans le texte ci-dessus, puis nous formulerons quelques considérations générales. On constate que :

- la valeur du rapport Chl a/b est plus grande chez le biotype S que chez le R, ce qui permet à certains auteurs de rapprocher le biotype R des plantes d'ombre. Ce caractère est associé à une augmentation des LHCP du PS II.
- la quantité de lipides totaux, exprimée en fonction des chlorophylles, est supérieure chez le biotype R. Ce caractère est corrélé avec une plus grande masse membranaire par grana.

- Le biotype R contient une plus grande proportion de SQDG que le S, ce paramètre peut être en rapport avec l'augmentation des LHCP du PS II.
- Le biotype S contient un DGDG relativement plus pauvre en acide linoléique, un PC appauvri en acide hexadéca-(3 *trans*)-énoïque et un MGDG moins insaturé que le biotype R. Le phénomène de la résistance chloroplastique ne semble pas dépendre de ces trois différences mais elles reflètent, probablement, davantage une adaptation du biotype R suite à la mutation.
- Le rapport lipide/protéine des membranes thylacoïdales du biotype S est inférieur à celui des membranes thylacoïdales du biotype R. Cette différence pourrait contribuer à rendre la phase membranaire de ce dernier plus fluide.
- Les galactolipides (MGDG et DGDG) ne sont pas répartis également de part et d'autre des membranes des biotypes S et R. On assiste à une augmentation des galactolipides dans la monocouche intérieure des membranes thylacoïdales du biotype S. Cet enrichissement est principalement dû au DGDG.

#### Considérations générales

Nous avons noté quelques différences entre la phase lipidique du biotype S et celle du biotype R. Les changements observés touchent à la fois la composition et la structure des membranes thylacoïdales. Ainsi, plusieurs caractéristiques que l'on rencontre chez les plantes résistantes à l'atrazine se retrouvent également chez des plantés cultivées dans des conditions particulières de lumière, de température, ou en présence de pesticides etc... On a, par exemple, souvent rapproché les plantes R aux plantes d'ombre, suite à une basse valeur du rapport Chl *a/b*, à un plus grand nombre de membranes thylacoïdales par grana, à l'absence de substances de réserve dans le chloroplaste etc... (Burke et al., 1982; Lemoine et al., 1983; Vaughn & Stephen, 1984; Holt & Goffner, 1985 et Vaughn, 1986). On a également rapproché les plantes R des plantes cultivées à basse température, suite à l'augmentation de la quantité des lipides (rapport lipide/Chl) ou à la diminution de la valeur du rapport lipide/protéine (Chapman et al., 1982 et Chapman et al., 1983 a et b), et à une augmentation de l'insaturation des acides gras des lipides thylacoïdaux (Oquist, 1982; Raison et al., 1982; Chapman et al., 1983 a; Aro et al., 1987; Orr & Raison, 1987 et Kunst et al., 1989). S'il est vrai que les mutants résistants à l'atrazine présentent des modifications membranaires, il n'est toutefois pas aisé de saisir la finesse de chacune d'elles. Turner et al. (1987), par exemple, démontrèrent qu'il n'y a pas de différence de capacité photosynthétique entre le type sauvage et un mutant d'*Hordeum vulgare*, déficient en chlorophylle *b*. Il n'apparaît pas non plus clairement qu'une différence de DBI soit à l'origine d'une augmentation de fluidité (McCourt et al., 1987; Miller et al., 1988 et Kunst et al., 1989). Quant à l'origine

de ces modifications, certains auteurs ont observé qu'en conditions de croissance ralentie des plantes, par exemple à des faibles irradiances (Bjorkman, 1981) ou lors de la présence d'herbicide dans le milieu de culture (Mattoo et al., 1984), le turnover du polypeptide 32 kDa était significativement diminué. Il est donc pensable que ce polypeptide agisse comme un détecteur des changements de l'environnement et qu'il force la membrane à modifier son organisation autour des photosystèmes II afin de maintenir une efficacité optimale de ces derniers. Dans le cas de la résistance chloroplastique, la mutation a échangé un acide aminé (sérine --> glycine) du polypeptide 32 kDa fixateur d'herbicide, et empêche ainsi toute molécule d'atrazine de s'y fixer (Hirschberg et al., 1983). Or, c'est précisément sur ce polypeptide que s'effectue la réoxydation du premier accepteur réduit du photosystème II (Q) par une plastoquinone (8) située entre Q et le pool des plastoquinones (PQ) (pour une revue, voir Fedtke, 1982). Pour que cette réduction ait lieu, on peut envisager qu'un rapprochement de Q et de 8 doive s'opérer. Chez le mutant, ce rapprochement pourrait être empêché par la perte du site de liaison de l'atrazine. Il est donc envisageable que les modifications ou que des effets allostériques de ces modifications lipidiques soient à même de compenser la "défectuosité" du polypeptide résistant et de faciliter ainsi la réaction de transfert des électrons entre Q et 8. Il est aussi envisageable que des changements subtils, soit dans les proportions relatives entre certains groupements protéiniques liés plus ou moins fortement aux lipides, soit dans la distribution transversale des lipides, conduisent à des modifications de la conformation des complexes polypeptidiques du thylacoïde.

## 6 CONCLUSIONS DE LA TROISIEME PARTIE

Nous avons comparé quelques paramètres physico-chimiques des membranes thylacoïdales des Morelles S et R. Il apparaît que la phase lipidique des thylacoïdes du biotype R a subi, outre la mutation sur la protéine 32 kDa, un certain nombre de modifications ou d'adaptations. Il est également pensable que les espèces moléculaires des classes de lipides soient différentes selon leur emplacement (en interaction avec des protéines ou en interaction avec d'autres lipides seulement). La convergence de nos résultats, résumés dans le Tab. XI, suggère que les membranes thylacoïdales du biotype R sont plus fluides que celles du biotype S. Mais, la fluidité est-elle impliquée dans le phénomène de la résistance chloroplastique ?... Après avoir tenté d'estimer la portée et les conséquences des diverses modifications de la phase lipidique des thylacoïdes du biotype R par rapport au S, il nous semble du plus grand intérêt de mieux connaître la nature des interactions entre les herbicides de type-DCMU et la phase lipidique des membranes thylacoïdales. Pour ce faire, nous nous proposons, dans la quatrième partie de ce travail, de traiter quelques aspects des interactions possibles de deux herbicides photosynthétiques (atrazine et DCMU) avec des membranes thylacoïdales de Morelle S et R, placées en conditions de stress.

## **QUATRIEME PARTIE:**

**QUELQUES ASPECTS DE L'ACTION DE  
L'ATRAZINE ET DU DCMU SUR DES  
MEMBRANES BIOLOGIQUES.  
(IMPORTANCE DE LA PHASE LIPIDIQUE)**

Je n'écris plus une phrase affirmative  
sans être tenté d'y ajouter "peut-  
être"

Gide, "Les Faux-Monnayeurs"

TABLE DES MATIERES DE LA 4<sup>ème</sup> PARTIE

1	INTRODUCTION . . . . .	141
2	BUT DE LA QUATRIEME PARTIE . . . . .	141
3	MATERIEL ET METHODES . . . . .	142
3.1	<u>Matériel biologique et isolement des membranes thylacoïdales</u> . . . . .	142
3.2	<u>Préparation de particules du PS II</u> . . . . .	143
3.3	<u>Dégraissage de l'albumine sérique de boeuf</u> . . . . .	144
3.4	<u>Dosage du cholestérol</u> . . . . .	144
3.5	<u>Mesure des activités de transport d'électrons</u> . . . . .	145
3.5.1	Activités du PS II . . . . .	145
3.5.2	Activités du flux d'électrons non-cyclique . . . . .	146
3.5.3	Mesure de la demi-inhibition . . . . .	148
3.6	<u>Mesure des paramètres de liaison ("binding") entre l'atrazine ou le DCMU et les membranes thylacoïdales</u> . . . . .	149
3.6.1	Aspect théorique . . . . .	149
3.6.2	Méthode expérimentale . . . . .	151
3.7	<u>Déplétions lipidiques de la monocouche externe des membranes thylacoïdales</u> . . . . .	151
3.8	<u>Hydrogénation catalytique des membranes thylacoïdales</u> . . . . .	153

4	RESULTATS ET DISCUSSIONS . . . . .	153
4.1	<u>Mode d'action de l'atrazine et du DCMU</u> . . . . .	154
4.1.1	Le pouvoir inhibiteur . . . . .	155
4.1.2	La liaison herbicide-membrane ("binding") . . . . .	163
4.2	<u>Inhibition du flux non-cyclique et liaison de l'atrazine et du DCMU sur des membranes thylacoïdales soumises à divers stress</u> . . . . .	173
4.2.1	Stress osmotique . . . . .	173
4.2.2	Stress thermique . . . . .	180
4.2.3	Stress chimique . . . . .	197
4.2.4	Stress par hydrogénation catalytique . . . . .	203
4.2.5	Stress lipolytique . . . . .	219
5	RESUME . . . . .	226
6	CONCLUSIONS DE LA QUATRIEME PARTIE . . . . .	227

## 1 INTRODUCTION

La plupart des herbicides qui inhibent les activités photosynthétiques interagissent avec le polypeptide 32 kD appartenant au photosystème II (Pfister & Urbach, 1983). Les 5 chaînes  $\alpha$  constituant ce polypeptide traversent la membrane (Trebst, 1987). Ce polypeptide expose son groupement carboxyle et peut-être également son groupement amino-terminal à la surface externe de la membrane thylacoïdale. Les parties lipophiles du polypeptide sont, selon toute vraisemblance, imbriquées dans les deux monocouches du thylacoïde. Récemment, Trebst (1987) a proposé un modèle dans lequel la niche fixatrice des herbicides,  $Q_A - Q_B$ , est localisée proche et/ou à l'intérieur de la monocouche externe de la membrane thylacoïdale. La région de cette membrane est donc d'un intérêt particulier, puisque la conformation du polypeptide 32 kD, altérée par la mutation (dans le cas de *S. nigrum* R une sérine est substituée par une glycine [Hirschberg et al., 1984]) prend place préférentiellement dans cette partie de la membrane. Il est intéressant de mentionner, d'autre part, que la niche fixatrice des herbicides est entourée d'une partie lipidique, dont la nature précise est encore inconnue. En effet, plusieurs études, bien qu'indirectes, ont montré l'importance possible de cette dernière dans un maintien adéquat de la conformation du polypeptide 32 kD ce qui lui confère une fonction physiologique optimale (Rivera & Penner, 1979; Jursinic & Stemler, 1983; Lehoczki et al., 1985; Wettern, 1986; Adir & Ohad, 1986; Horvath et al., 1987; Giardi et al., 1988).

## 2 BUT DE LA QUATRIEME PARTIE

Afin de mieux comprendre le rôle que peut jouer la partie lipidique des membranes thylacoïdales dans les phénomènes de liaison et d'inhibition des herbicides photosynthétiques de type urées/triazines, nous avons recherché, dans un premier temps, les différents paramètres susceptibles de modifier les interactions herbicides-membranes, comme par exemple: la qualité des membranes, le type de flux d'électrons étudié, le fait de travailler en conditions couplée, basale ou découplée, en présence ou absence de lumière, etc... Dans un deuxième temps, nous avons soumis des membranes thylacoïdales à divers "stress" qui affectent de plus en plus spécifiquement les lipides déjà existants des thylacoïdes, comme les "stress": osmotique, thermique, chimique (cholestérol, alcool benzylique), induit par une hydrogénation des acides gras des lipides *in situ* ou encore par dégradation de certains lipides localisés dans le feuillet externe uniquement des membranes thylacoïdales.

Cette approche diffère quelque peu de celle qui consiste à moduler les voies métaboliques associées à la synthèse des lipides: i) en ajoutant des inhibiteurs ou des herbicides dans le milieu de culture des plantes (voir Lichtenthaler, 1989, pour une revue récente); ii) en cultivant les plantes à différentes températures et/ou intensités lumineuses (Bervae et al., 1987; Huner et al., 1987; Ketchie et al., 1987; Miller et al., 1988), iii) en sélectionnant des mutants déficients en certains constituants (Norman & St. John, 1986; Browse et al., 1986; McCourt et al., 1987; Kunst et al., 1989).

## 3 MATERIEL ET METHODES

3.1 Matériel biologique et isolement des membranes thylacoïdales

## Matériel biologique

Toutes les expériences décrites dans cette quatrième partie ont été réalisées sur des fractions subcellulaires isolées, soit de Morelle noire (*Solanum nigrum* L.) sensible (S) ou résistante (R) à l'atrazine (voir la deuxième partie du présent mémoire concernant les conditions de culture et l'âge du matériel biologique), soit d'Épinard (*Spinacia oleracea*) provenant du marché local.

Bien que le principal matériel biologique dans ce travail soit la Morelle noire, nous avons eu recours à l'Épinard pour plusieurs raisons pratiques: (i) Les Morelles (plantes de jour court) fleurissent précocement entre septembre et mai (bien que cultivées en serre et sous éclairage artificiel) et produisent donc peu de phanes. A pareille époque, on trouve sur le marché local des feuilles d'Épinard (plante de jour long) de belle qualité. (ii) L'Épinard est une plante bien connue dans notre laboratoire et la plupart des techniques adaptées aux Morelles sont originellement issues des techniques développées pour l'Épinard.

Il est intéressant de noter que la Morelle et l'Épinard sont toutes deux des plantes en "16:3". Par contre, la Morelle est sensible au froid ("chilling sensitive"), alors que l'Épinard y est résistant ("chilling resistant") (voir Murata et al., 1982).

L'Épinard nous a servi de référence dans la mise au point des techniques, surtout pendant la mauvaise saison. En outre, il a répondu différemment de la Morelle face à certains stress, notamment face aux stress thermiques.

## Isolement des membranes thylacoïdales

## \* MORELLES

Les membranes thylacoïdales de Morelles ont été isolées selon la méthode déjà décrite (voir 3<sup>ème</sup> partie § 3.2). La dernière étape de la technique consiste alors à resuspendre les membranes dans le milieu adéquat et variable selon les expériences.

\* EPINARD

Les différentes étapes de la préparation des membranes thylacoïdales d'Épinard sont effectuées le plus rapidement possible et à basse température (4°C), afin d'éviter une dégradation trop rapide du matériel biologique.

Les feuilles (120 à 150 g) sont rincées à l'eau déionisée et sont entreposées une nuit à l'obscurité à 4°C, afin d'épuiser leurs réserves d'amidon. Les feuilles, dénervées et déchirées de façon grossière, sont broyées dans un Waring Blender 2 x 2 sec, directement dans 300 ml de milieu de broyage (Sorbitol 330 mM; Tricine 20 mM, pH 8.0; MgCl<sub>2</sub> 20 mM). L'homogénat est ensuite rapidement filtré à travers 6 couches de gaze puis deux couches de tissu à bluter. Le filtrat est centrifugé à 2200 x g (rotor SS-34, Sorvall RC-5B) pendant 30 sec, temps d'accélération et de décélération non compris (les centrifugations suivantes seront toujours effectuées avec le même rotor). Cette centrifugation permet d'obtenir un premier culot de chloroplastes bruts, le surnageant ayant été éliminé par aspiration. Le culot des différents tubes est resuspendu à l'aide d'une pipette en verre de 10 ml par aspiration et refoulement de quelques ml de milieu de lavage (Sorbitol 330 mM; Tricine 10 mM, pH 8.0). Les culots sont rassemblés dans deux tubes, complétés chacun à 38 ml avec du milieu de lavage. La suspension de chloroplastes bruts est alors centrifugée (1500 x g, 1 min). Cette étape constitue un premier lavage des chloroplastes. Après aspiration des surnageants, les culots sont resuspendus dans quelques ml de milieu d'éclatement: 1 vol de milieu de suspension (MS) de composition variable selon les expériences pour 9 vol d'eau déionisée. Les tubes sont complétés à 38 ml avec le même milieu puis centrifugés (4300 x g, 3 min). Cette étape permet d'obtenir un culot de membranes thylacoïdales, le choc osmotique ayant brisé l'enveloppe des chloroplastes. Après aspiration des surnageants, les culots sont resuspendus dans quelques ml de MS et rassemblés dans un seul tube, complété à 38 ml avec le même milieu. Un dernier lavage par centrifugation (1500 x g, 2 min) permet d'obtenir des membranes thylacoïdales fonctionnelles pendant plusieurs heures. Après aspiration du surnageant, le culot est resuspendu à 1 mg Chl/ml dans du milieu de suspension.

### 3.2 Préparation de particules du PS II

Nous avons préparé, à partir de feuilles d'Épinard, des particules enrichies en photosystème II (PS II) et dégageant de l'oxygène. Nous avons utilisé la méthode de Berthold et al. (1981) que nous avons légèrement modifiée. Ces particules sont communément abrégées "particules BBY".

Les membranes thylacoïdales sont préparées comme décrit ci-dessus (voir 3.1) et resuspendues à 4 mg Chl/ml dans le milieu de suspension MS1: MgCl<sub>2</sub> 5 mM; NaCl 15 mM; MOPS 20 mM, pH 7.8. Un aliquot de cette suspension est dilué à 1 mg Chl/ml dans le milieu de suspension MS2:

Sorbitol 100 mM; Tricine 25 mM, pH 7.8; KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, il sera conservé dans la glace et à l'obscurité et nous servira de contrôle. On ajoute lentement au reste de la suspension, placée à l'obscurité et dans la glace, un volume égal d'une solution de Triton X-100 (50 mg/ml dans MS1). Le tout est incubé 30 min à l'obscurité et dans la glace. Nous transférons ensuite la suspension dans des tubes plastique avec capsule et nous les centrifugeons 30 min, à 30 000 x g, avec le rotor Ti-50, dans une centrifugeuse Beckman, type "L8-55 ultracentrifuge". Les surnageants sont éliminés par aspiration et le culot (enrichi en particules BBY) est resuspendu, soit dans un petit volume de milieu MS2, soit dans un milieu composé de Sorbitol 400 mM; MES 25 mM, pH 6.5; KCl 100 mM; MgCl<sub>2</sub> 2 mM; glycérine 50% final (v/v), permettant la conservation des particules BBY dans l'azote liquide.

### 3.3 Dégraissage de l'albumine sérique de boeuf

L'albumine sérique de boeuf (BSA) est dégraissée par la méthode décrite par Siegenthaler et al. (1987). La BSA provient de FLUKA A.G. et 10g sont lavés comme suit: (a) dans 100 ml d'acétone sous agitation pour 15min, suivie d'une filtration sur Büchner; (b) l'étape (a) est répétée; (c) dans 100 ml d'éthanol suivie d'une filtration et d'un rinçage avec de l'acétone. Le cycle complet est répété trois fois puis la BSA est séchée sous vide. Ce n'est que dans ces conditions de lavage qu'un extrait de la BSA dans le mélange hexane/acétone (3:2, v/v) est exempt de tout lysolipide.

### 3.4 Dosage du cholestérol

Ce dosage s'inspire en grande partie de la méthode décrite par Smith & Stein (1982). Nous rappelons brièvement les quatre étapes de cette technique:

1. Saponification : On ajoute aux échantillons, contenant au maximum 10 µg de cholestérol, 300 µl KOH 33% et 300 µl d'éthanol. Le mélange est agité et chauffé 15 min à 60°C
2. Extraction et concentration : Après refroidissement, on ajoute 2 ml H<sub>2</sub>O et 2 ml de pentane, on agite et centrifuge. La phase supérieure pentanique est récupérée dans un grand tube conique SVL. L'opération est répétée et on rassemble les phases pentaniques. Ces dernières sont évaporées à sec sous courant d'azote.

3. Réaction colorimétrique : Après avoir ajouté 500  $\mu$ l de  $\text{FeCl}_3$  (840 mg/l), on agite et laisse le mélange reposer 10 min. On ajoute ensuite 300  $\mu$ l  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Cette dernière addition est suivie d'une agitation puis de 45 min de repos à l'obscurité.
4. Mesure : L'absorbance des échantillons est lue à 560 nm et reportée sur une droite étalon, qui permet de déterminer la quantité de cholestérol dans l'aliquot.

### 3.5 Mesure des activités de transport d'électrons

#### 3.5.1 Activités du PS II

##### Pratique :

L'activité PS II des membranes thylacoïdales est déterminée dans un mélange réactionnel préalablement dégazé. Nous avons utilisé les accepteurs d'électrons suivants en présence de dibromothymoquinone (DBMIB):

##### potentiel redox

le 2,5 diméthyl-p-benzoquinone (DMQ)	+ 180 mV
le 2,6-dichlorophénolindophénol (DCPIP)	+ 217 mV
le p-phénylène-diàmine (PD)	+ 360 mV

Le dégagement d' $\text{O}_2$  associé aux activités  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow$  Accepteur  $\rightarrow$   $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  est mesuré (électrode à oxygène, type Clark) dans un volume de 4 ml (20  $\mu$ g Chl/ml) avec les mélanges réactionnels suivants:

Sorbitol 100 mM; Tricine 25 mM, pH 7.8; KCl 100 mM;  $\text{MgCl}_2$  2 mM;  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  1 mM; DBMIB 1  $\mu$ M;  $\pm$  FCCP 2  $\mu$ M; DMQ 0.5 mM

Sorbitol 100 mM; Tricine 25 mM, pH 7.8; KCl 100 mM;  $\text{MgCl}_2$  2 mM;  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  1 mM; DBMIB 1  $\mu$ M;  $\text{PD}_{ox}$  0.4 mM

La photoréduction du DCPIP par les membranes thylacoïdales (10  $\mu$ g Chl/ml) est mesurée, de préférence, par spectrophotométrie à 590 nm (filtre interférentiel 589 nm, Balzers). La réaction a lieu dans une cuvette de 2 mm de trajet optique contenant dans un volume final de 0.5 ml:

Sorbitol 100 mM; MOPS 50 mM, pH 7.6; KCl 100 mM;  $\text{MgCl}_2$  2 mM; DBMIB 1  $\mu$ M;  $\pm$  FCCP 2  $\mu$ M; DCPIP 50  $\mu$ M

## 3.5.2 Activités du flux d'électrons non-cyclique

L'activité PS II + PS I des membranes thylacoïdales est déterminée dans un mélange réactionnel préalablement dégazé. Nous avons utilisé trois accepteurs d'électrons:

potentiel redox

le ferricyanure ( $K_3Fe(CN)_6$ )	+ 430 mV
le méthylviologène (MV)	- 440 mV
le nicotinamide adénine dinucléotide-phosphate (NADP <sup>+</sup> )	- 320 mV

La photoréduction du  $K_3Fe(CN)_6$  par les membranes thylacoïdales (10  $\mu$ g Chl/ml) est mesurée par spectrophotométrie (Aminco DW-2a) à  $421 \pm 3$  nm (filtre interférentiel 421 nm, Galzers). La réaction a lieu dans une cuvette de 1 cm de trajet optique contenant dans un volume final de 3 ml:

Sorbitol 300 mM; MOPS 50 mM, pH 7.2;  $MgCl_2$  5 mM;  $K_3Fe(CN)_6$  0.5 mM  $\pm$   $NH_4Cl$  5 mM; et/ou  $\pm$  FCCP 2  $\mu$ M;

L'autooxydation du MV photoréduit est mesurée dans un volume de 4 ml par la mesure de consommation d'oxygène (électrode à oxygène, type Clark) des thylacoïdes (25  $\mu$ g Chl/ml) dans le mélange réactionnel suivant :

Sorbitol 100 mM; Tricine 25 mM, pH 7.8; KCl 100 mM;  $MgCl_2$  1 mM;  $NaN_3$  2 mM; MV 0.3 mM;  $\pm$   $NH_4Cl$  2 mM

La photoréduction du NADP<sup>+</sup> par les membranes thylacoïdales (100  $\mu$ g Chl/ml) est mesurée par spectrophotométrie (Zeiss PMQ II) à 340 nm (filtre interférentiel 339 nm, Galzers) dans une cuvette de verre de 2 mm de trajet optique (Siegenthaler & Morakova, 1974) et qui contient, dans un volume final de 0.5 ml :

Sorbitol 100 mM; Tricine 50 mM, pH 8.4; NaCl 35 mM;  $MgCl_2$  2 mM; Fd 72  $\mu$ g/ml;  $NH_4Cl$  2 mM; NADP<sup>+</sup> 2 mM

NB - L'irradiance est fixée à  $2.5 \times 10^9$  ergs  $\times$   $cm^2$   $\times$   $sec^{-1}$  (250 mW/ $cm^2$ ) dans les expériences qui nécessitent l'emploi soit de l'électrode à oxygène (type Clark), soit du spectrophotomètre Zeiss PMQ II. Lors de la mesure de la photoréduction du ferricyanure, l'irradiance à la sortie du filtre Klett n° 6 (610-700 nm) est de  $0.6 \times 10^9$  ergs  $\times$   $cm^2$   $\times$   $sec^{-1}$  (60 mW/ $cm^2$ ). Ces valeurs sont saturantes pour les différents transports d'électrons. La température est fixée à 20°C.

Lorsque nous avons mesuré la photoréduction du ferricyanure par les membranes thylacoïdales en fonction de la température, nous avons usé de quelques artifices pratiques afin d'éviter la formation de buée sur les parois de la cuvette, ce qui aurait faussé les mesures d'absorbance:

- \* antibuée incolore sur les parois de la cuvette
- \* bloc réfrigérant dans le compartiment de la cuvette
- \* jet d'air comprimé sur les parois de la cuvette

Calculs :

$$* \mu\text{moles O}_2 \text{ dégagé ou consommé} \times \text{mg Chl}^{-1} \times \text{h}^{-1} = \frac{N_0 \times V \times \text{KO}_2 \times 60 \text{ min} \times 1000}{P \times t \times Q}$$

- $N_0$  : nombre de carreaux parcourus pendant un temps  $t$  (min)
- $V$  : volume du milieu réactionnel (ml)
- $\text{KO}_2$  : concentration  $\text{O}_2$  dans l'eau, p.ex. à  $20^\circ\text{C}$  à Neuchâtel (720 mm Hg) =  $250 \mu\text{M}$
- $P$  : nombre de carreaux correspondant à 100%  $\text{O}_2$  (calibration  $\text{KO}_2$ )
- $t$  : temps (min)
- $Q$  : quantité de Chl dans la cuvette ( $\mu\text{g}$ )

$$* \mu\text{mol DCPIP ou K}_3\text{Fe(CN)}_6 \text{ ou NADP}^+ \text{ réduit} \times \text{mg Chl}^{-1} \times \text{h}^{-1} =$$

$$\frac{N_0 \times V \times 60 \text{ min} \times 1000 \mu\text{g Chl}}{\epsilon \times 100 \text{ carreaux} \times t \times Q}$$

pour une calibration sur 100 carreaux (de 0 à 1 Abs.)

- $N_0$  : nombre de carreaux parcourus pendant un temps  $t$
- $V$  : volume du milieu réactionnel (ml)
- $\epsilon$  : coefficient d'extinction de la molécule pour un trajet optique de 1 cm ( $\text{mM}^{-1}$ )
- $t$  : temps (min)
- $Q$  : quantité de Chl dans la cuvette ( $\mu\text{g}$ )

-	$\epsilon_{\text{DCPIP}}$	- 21	$\text{mM}^{-1}$ à 590 nm
-	$\epsilon_{\text{FeCn}}$	- 1	$\text{mM}^{-1}$ à 421 nm
-	$\epsilon_{\text{NADP}^+}$	- 6.22	$\text{mM}^{-1}$ à 340 nm

## 3.5.3 Mesure de la demi-inhibition

Nous avons déterminé la concentration d'atrazine et de DCMU nécessaire pour inhiber de 50% ( $I_{50}$ ) l'une ou l'autre des activités du flux électronique (voir 3.5.1 et 2). Des quantités croissantes d'herbicides dans l'éthanol sont ajoutées dans le milieu réactionnel après avoir illuminé les membranes thylacoïdales. Nous avons veillé à ce que la concentration finale d'éthanol ne dépasse en aucun cas 1%.

L'inhibition de l'activité du flux d'électrons par l'herbicide (par rapport au contrôle) est exprimée en fonction de la concentration finale d'herbicide dans le mélange réactionnel, ce qui nous permet de déterminer graphiquement la valeur  $I_{50}$ . Pour faciliter la détermination de  $I_{50}$ , la concentration en herbicide est reportée sur une échelle logarithmique (Fig.1).

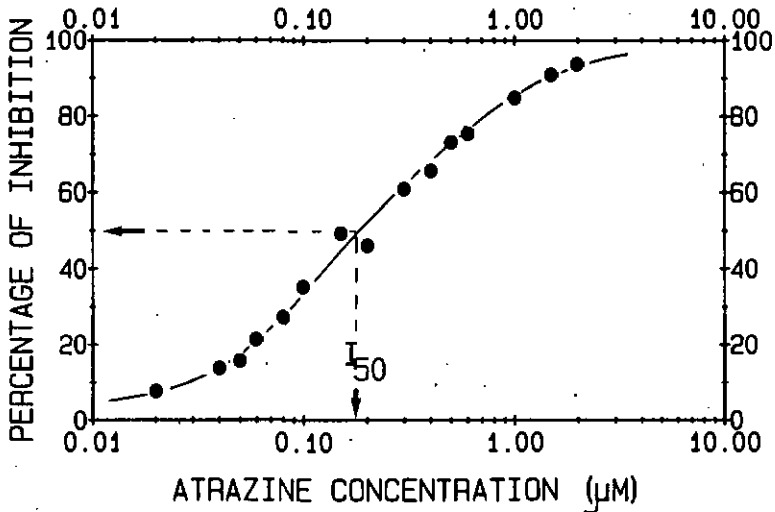


Fig. 1: Courbe d'inhibition d'une activité par un inhibiteur. Ce type de courbe sigmoïde permet de déterminer la valeur  $I_{50}$ . Cette Figure particulière représente l'inhibition du flux non-cyclique d'électrons ( $H_2O \longrightarrow K_3Fe(CN)_6$ ) découplé par  $NH_4Cl$  de thylacoïdes d'Épinard traités par l'atrazine à 21°C. L'activité avant l'inhibition est de 190  $\mu\text{mol FeCn red.} \times \text{mg Chl}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ .

### 3.6 Mesure des paramètres de liaison ("binding") entre l'atrazine ou le DCMU et les membranes thylacoïdales

#### 3.6.1 Aspect théorique

Il est possible de symboliser la liaison d'une petite molécule -par exemple un herbicide (H)- avec une membrane (M) par l'équilibre:



Une telle association est généralement caractérisée par deux paramètres qui sont:

- la constante intrinsèque d'association ( $K_a$ ) de l'herbicide
- le nombre  $n$  de sites de fixation de l'herbicide par unité de "support" (dans notre cas, la membrane)

Ces deux paramètres sont liés entre eux selon l'expression (Scatchard et al., 1950):

$$MH / H = -K_a \times MH + K_a \times n$$

qui n'est autre que l'équation d'une droite (Fig. 2):

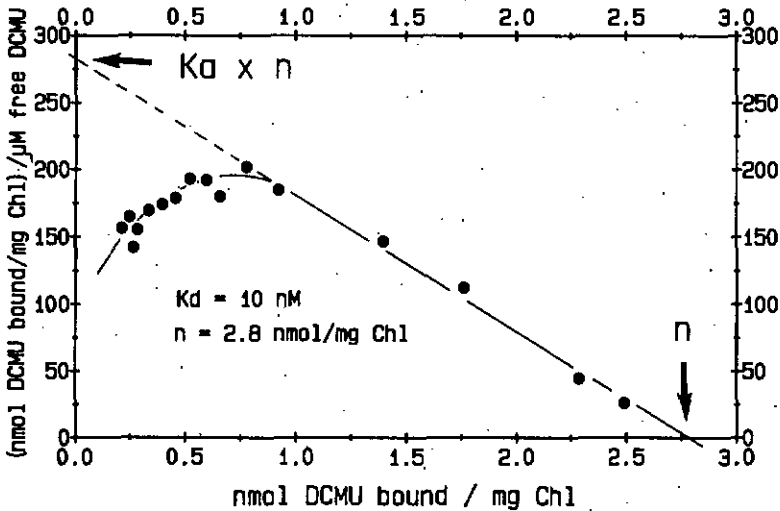


Fig. 2: Représentation graphique de la liaison d'un herbicide sur des membranes thylacoïdales selon Scatchard.

$K_a$  - constante d'association  
 $n$  - nombre de sites de liaison

où: MH	-	la quantité d'herbicide lié par unité de membranes (nmol herbicide lié / mg Chl)
H	-	la concentration d'herbicide libre ( $\mu\text{M}$ )
$K_a$	-	la constante d'association ( $\mu\text{M}^{-1}$ )
$n$	-	nombre de sites de liaison par unité de membranes (nmol herbicide / mg Chl)

Une représentation courante du "binding" est celle de Lineweaver et Burk ou représentation en double-inverse ("double reciprocal plot"), voir Fig. 3. A partir de cette représentation, la constante d'association ( $K_a$ ) et le nombre de sites de liaison ( $n$ ) peuvent être déterminés. Le processus de liaison est décrit par l'équation:

$$MH = (n \times H) / (K_a + H)$$

Cette représentation a le désavantage de comprimer les valeurs correspondant aux fortes concentrations d'herbicide sur une plage graphique restreinte. En revanche, les valeurs correspondant aux faibles concentrations d'herbicide sont amplifiées. Le traitement mathématique de Scatchard (Fig. 2), quant à lui, ne présente pas ces désavantages, mais la lecture de  $K_a$  et  $n$  est moins aisée.

**NB** Nous exprimerons le phénomène de la liaison par la constante de dissociation ( $K_d$ , unité molaire), plutôt que par la constante d'association ( $K_a$ ) car cette dernière est exprimée en unité molaire<sup>-1</sup> mais attention! lorsque  $K_d$  augmente, l'affinité diminue !...

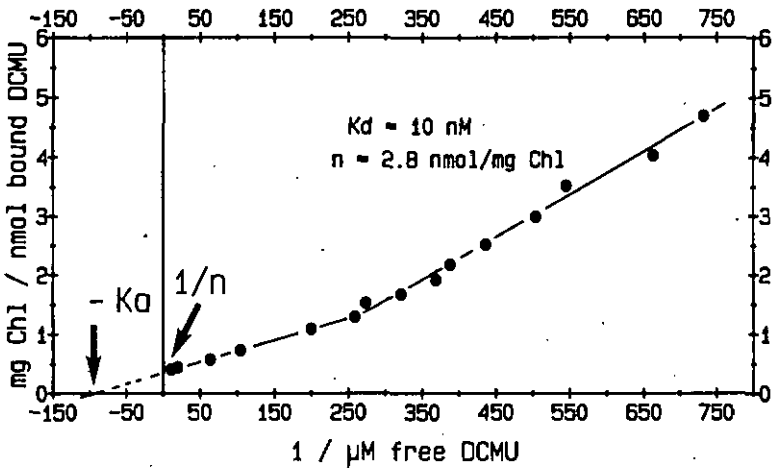


Fig. 3: Liaison d'un herbicide sur des membranes thylacoïdales selon la représentation graphique des doubles inverses.

$K_a$  = constante d'association  
 $n$  = nombre de sites de liaison

## 3.6.2 Méthode expérimentale

## Partie pratique

Les membranes thylacoïdales (50  $\mu\text{g}$  Chl/ml) de Morelle (S et R) ou d'Épinard sont incubées dans le milieu de suspension composé de: Sorbitol 400 mM; Tricine-NaOH 25 mM, pH 7.8;  $\text{MgCl}_2$  10 mM et des concentrations croissantes d'herbicide radioactif (soit du [ $^{14}\text{C}$ ]-atrazine (16 Ci/mol), soit du [ $^{14}\text{C}$ ]-diuron (57 Ci/mol); Amersham International). La concentration finale en herbicide n'a jamais dépassé 0.5  $\mu\text{M}$ . Dans les expériences où ni les effets de la lumière ni ceux de la température sont étudiés, les incubations sont conduites à l'obscurité, dans la glace (env. 4 °C). Elles sont effectuées pendant 10-15 min. Ce temps est largement suffisant pour que l'herbicide puisse atteindre son équilibre de partition entre la phase membranaire et la phase aqueuse (Laasch *et al.*, 1981). Les échantillons sont ensuite centrifugés (Beckman, Microfuge B) à 8700 x g pendant 5 min. Des aliquots (250  $\mu\text{l}$ ) des surnageants sont mélangés à 1.5 ml de scintillant (OptiPhase "HiSafe" II, LKB wallac) et comptés dans un compteur à scintillation liquide (Kontron-Betamatic). Les mesures de radioactivité permettent de déterminer la concentration d'herbicide libre.

## Traitement mathématique

La quantité d'herbicide lié aux membranes est obtenue en soustrayant la quantité d'herbicide libre à la quantité d'herbicide totale. Cette dernière a été préalablement déterminée à partir d'une calibration effectuée comme ci-dessus mais en l'absence de membranes.

Nous avons développé un programme en Turbo Pascal (voir annexe 1) qui nous a permis de gagner un temps précieux dans le calcul des différents paramètres des représentations graphiques (Figs 2 et 3).

3.7 Déplétions lipidiques de la monocouche externe des membranes thylacoïdales

## Phospholipides

Nous utiliserons la phospholipase  $A_2$  ( $\text{PLA}_2$ ) de *Vipera russelli*, (SIGMA) sans autre purification. Tout comme la  $\text{PLA}_2$  de pancréas de porc (voir 3<sup>ème</sup> partie § 4.4), la  $\text{PLA}_2$  de *V. russelli* hydrolyse la liaison ester des phospholipides en position  $\text{sn}_2$ , engendrant ainsi un 2-lyso-phospholipide et un acide gras. Par contre, elle hydrolyse préférentiellement la PC, contrairement à l'enzyme pancréatique qui dégrade préférentiellement le PG. La  $\text{PLA}_2$  de serpent présente en outre l'avantage d'hydrolyser les phospholipides en présence d'une forte concentration de BSA. La technique utilisée dans cette 4<sup>ème</sup> partie est basée sur les récents travaux de Siegenthaler *et al.* (1989a).

\* Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (E.C. 3.1.1.4)

Origine	:	venin de <i>Vipera russelli</i>
Substrat	:	PC > PG
Poids moléculaire	:	30'000
Cofacteur	:	Ca <sup>2+</sup> (1-10 mM)
Inhibiteur	:	EDTA
pH optimum	:	7 - 8
pI	:	4.0
Produits d'hydrolyse	:	acides gras libres + 2-lysophospholipides

L'incubation des membranes thylacoïdales (1 mg/Chl) avec la phospholipase A<sub>2</sub> est effectuée à l'obscurité et à 4°C dans le milieu suivant : Sorbitol 300 mM; Tricine/KOH (pH 8.0) 20 mM; HgCl<sub>2</sub> 2.5 mM; CaCl<sub>2</sub> 1 mM, BSA 40 mg/ml et PLA<sub>2</sub> 0.1 U/mg Chl. Après prélèvement d'un échantillon contrôle au temps zéro, la lipase est ajoutée à la suspension qui est agitée pendant toute la période d'incubation. Après 1h, 10 µl EGTA 250 mM, pH 7.8, sont ajoutés. L'EGTA chélate le Ca<sup>2+</sup> et garantit ainsi une inhibition de l'activité de la PLA<sub>2</sub>. Les membranes sont ensuite lavées une première fois dans le milieu suivant: Sorbitol 300 mM; Tricine 15 mM, pH 8.0; BSA 5 mg/ml et une deuxième fois dans le même milieu exempt de BSA (centrifugation 2 min à 1000 x g, rotor SS-34, Sorvall RC-58). Les pourcentages d'hydrolyse des PC et PG sont déterminés (voir 3<sup>ème</sup> partie § 3.6.1).

## Galactolipides

La procédure d'hydrolyse des galactolipides reprend exactement celle des phospholipides et les milieux sont les mêmes. La lipase utilisée est celle de *Rhizopus arrhizus* (3<sup>ème</sup> partie § 4.4) à raison de 30 U/mg Chl. Les pourcentages d'hydrolyse des MGDG et DGDG sont déterminés (voir 3<sup>ème</sup> partie § 3.6.2).

**NB** Il n'est pas possible d'inhiber l'activité de la lipase de *Rhizopus arrhizus* par l'addition d'EGTA car son activité est peu dépendante du Ca<sup>2+</sup>. Par contre, les deux lavages successifs des membranes thylacoïdales et les basses températures (≤4 °C) auxquelles les différentes expériences sont conduites, permettent d'éviter une dégradation ultérieure des galactolipides (Rawlyer & Siegenthaler, 1985; Siegenthaler *et al.*, 1989).

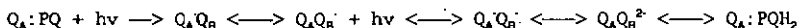
### 3.8 Hydrogénation catalytique des membranes thylacoïdales

Cette technique est basée sur les travaux de Vigh *et al.* (1985a). Le catalyseur employé dans ces expériences est le Pd(QS)<sub>2</sub> ou palladium di(sodium alizarine monosulphonate), que le Dr Vigh L. nous a aimablement offert. Ce catalyseur présente le grand avantage d'être hydrosoluble et peut donc être facilement séparé de la phase membranaire par lavage. Les membranes restent fonctionnelles (Vigh *et al.*, 1985a, b; Horváth, G. *et al.*, 1986; Vigh, 1987)

Les thylacoïdes de *S. nigrum* S et/ou R sont resuspendus à 0.06 mg Chl/ml dans le milieu suivant: Sorbitol 400 mM; MDPS-KOH 50 mM, pH 7.5; MgCl<sub>2</sub> 2 mM (-MS). Ce mélange est contenu dans des "réacteurs" en verre capables de supporter de fortes pressions. L'atmosphère d'air des réacteurs est progressivement remplacée par de l'hydrogène (1 atm). Le catalyseur est injecté à l'aide d'une seringue dans chaque réacteur (0.1 mg Pd(QS)<sub>2</sub> / ml) à travers un septum en caoutchouc. Le catalyseur est préactivé avant son emploi par une conversion en sa forme-8 hydride, qui lui permet d'hydrogéner les doubles liaisons sans période d'induction (Pak *et al.*, 1990). Les réacteurs sont immédiatement agités par rotation (45 tours/min) à l'obscurité à 2 °C pendant le temps désiré. A la fin de l'incubation, la pression dans les réacteurs est lentement relâchée et la suspension est agitée sous atmosphère d'air, ce qui a pour effet de stopper la réaction d'hydrogénation. Les membranes sont lavées dans le même milieu (voir ci-dessus) contenant en plus 0.1% 8SA (v/w), 2 min à 1500 x g (rotor HB-4, Sorvall RC-5B). L'appareillage (développé par Vigh & Joó, 1983) permet de prélever des aliquots (5 ml) des réacteurs et de déterminer le pourcentage d'hydrogénation des acides gras en fonction du temps d'hydrogénation. Dans cette série d'expériences, le degré d'hydrogénation des différents acides gras a été déterminé après séparation des méthylesters par GC (voir 3<sup>ème</sup> partie § 3.4) et quantifié par un intégrateur.

#### 4 RESULTATS ET DISCUSSIONS

L'atrazine et le DCMU sont reconnus (avec d'autres herbicides photosynthétiques, *cf* revue de Pfister & Urbach, 1983) pour inhiber le transfert des électrons de la chaîne photosynthétique dans les chloroplastes en se liant au polypeptide 32 kD (= Q<sub>B</sub>, B, R, A<sub>2</sub>, pour la terminologie, voir Haehnel, 1984 et Kyle, 1985). Ces herbicides bloquent le transfert des électrons au-delà de Q<sub>A</sub> qui se trouve maintenu à l'état réduit Q<sub>A</sub><sup>-</sup>. Dans la réaction de réduction qui met en jeu cette quinone Q<sub>A</sub>, fixée au polypeptide 32 kD (Q<sub>A</sub>) et la quinone Q<sub>B</sub>:



il semble que seule la semiquinone Q<sub>B</sub><sup>-</sup> soit fermement liée à l'apoptéine, alors que les formes quinone et quinol ne soient beaucoup moins (Velthuys, 1982; Farineau, 1986).

Trois différents modes d'action des herbicides du PS II ont été envisagés pour expliquer le blocage du transport des électrons de  $Q_A$  vers  $Q_B$ : 1) Le changement du potentiel redox de  $Q_A$  vers des valeurs plus négatives, le rendant thermodynamiquement inaccessible à PQ (Velthuys & Amesz, 1974; Pfister & Arntzen, 1979; Trebst, 1980). 2) Le déplacement de PQ de son site de liaison  $Q_A$ , soit directement par le remplacement d'une molécule d'herbicide (Velthuys, 1981), soit 3) via des modifications allostériques qui induisent un changement conformationnel du complexe protéinique et qui limitent la liaison des PQ ou d'autres molécules herbicides (Vermaas *et al.*, 1984; Renger, 1986).

Sur la base des expériences de Jursinic & Stemler (1983) pour l'atrazine et de Laasch *et al.* (1983) pour le DCMU, le mécanisme de remplacement des PQ liées au polypeptide 32 kD par ces herbicides est assez largement accepté. Pourtant, sur une base expérimentale, on ne peut pas exclure les deux autres mécanismes, il est même envisageable que deux, voir les trois mécanismes agissent de concert.

#### 4.1 Mode d'action de l'atrazine et du DCMU

##### Remarque préliminaire :

Nous avons observé que la valeur  $I_{50}$  ainsi que la qualité de la courbe d'inhibition obtenue, dépendaient du nombre de lavages des membranes thylacoïdales (Tab. I). En effet, lorsque le nombre de lavages augmente, il apparaît que a) l'activité du flux électronique  $H_2O \rightarrow FeCn(NH_4Cl)$  à 20 °C diminue; b) la valeur  $I_{50}$  augmente; c) la détermination de la valeur  $I_{50}$  est facilitée, c'est-à-dire que la qualité de la courbe du pourcentage d'inhibition *versus* la concentration en atrazine est bonne (faible dispersion des points, voir Fig. 3); d) le troisième lavage ne semble pas être nécessaire. Ainsi, on constate que la valeur  $I_{50}$  dépend grandement de la qualité des membranes: une fraction thylacoïdale contenant certains contaminants extra-thylacoïdaux (alcaloïdes, phénols, lipases, protéases, etc...) vieillit rapidement suite à l'action des enzymes lytiques libérés dans le milieu de suspension lors de la rupture des structures subcellulaires. Cette altération membranaire permet aux herbicides d'augmenter leur pouvoir d'inhibition (diminution de la valeur  $I_{50}$ ) mais les résultats, dans ces conditions, sont peu reproductibles. La détermination de la valeur  $I_{50}$  permet donc, de tester la qualité (fonction et structure) des membranes thylacoïdales. Schreiber & Pfister (1982) constatèrent également que l'intégrité des structures chloroplastiques pouvait être estimée via l'action du DCMU.

membranes thylacoïdales de <i>S. nigrum</i> (S)			
NOMBRE DE LAVAGES	ACTIVITY (n=5)	$I_{50}$ (µM)	QUALITE DE LA COURBE
0	118 ± 23	0.08	médiocre
1	100 ± 14	0.16	suffisante
2	83 ± 10	0.20	bonne
3	80 ± 11	0.20	bonne

Tab. I: Détermination de la valeur  $I_{50}$  (concentration d'atrazine nécessaire pour inhiber l'activité  $H_2O \rightarrow ferricyanure(NH_4Cl)$  de 50%) en fonction du nombre de lavages des membranes thylacoïdales de la Morelle noire sensible à l'atrazine. L'activité est exprimée en  $\mu\text{mol de FeCn réduit}/\mu\text{g Chl/h}$ .

## 4.1.1 Le pouvoir inhibiteur

Tout au long de cette quatrième partie, nous parlerons de la valeur  $I_{50}$  pour les différents herbicides. En fait cette valeur exprime le pouvoir inhibiteur d'une molécule (inhibitory potency) sur une activité. Ainsi, une valeur  $I_{50}$  élevée est associée à un pouvoir inhibiteur faible<sup>(\*)</sup>.

(\*) Certains auteurs ont également exprimé ce paramètre par le veleur inverse du  $I_{50}$  ou par le  $pl_{50}$ .  $pl_{50} = -\log I_{50}$ ;  $I_{50}$  [M] (Fedtke, 1982). Pour notre part, nous ne ferons pas usage de ces expressions car, elles expriment moins directement le notion de concentration pratique d'herbicide nécessaire pour inhiber de 50% une quelconque activité.

Le Tab. II présente quelques valeurs  $I_{50}$  que nous avons déterminées pour des membranes thylacoïdales d'Épinard et de Morelles S et R: on observe dans ce tableau que les valeurs  $I_{50}$  sont plus élevées 1) pour l'atrazine que pour le DCMU; 2) pour un flux d'électrons en condition basale qu'en condition découplée (comparer également les Figs 4A et B).

		$I_{50}$ ( $\mu$ M)				
FLUX D'ELECTRONS PHOTOSYNTHETIQUE	ESPECE	ATRAZINE	DCMU	100% ACTIVITE		
PS II (+ DBMIB)	H <sub>2</sub> O ---> DNQ (basal) E	0.15	0.040	60 <sup>a)</sup>		
	H <sub>2</sub> O ---> DNQ (FCCP) E	0.06	0.010	100 <sup>a)</sup>		
	H <sub>2</sub> O ---> PD <sub>m</sub> (NH <sub>4</sub> Cl) E	0.12	----	190 <sup>a)</sup>		
	H <sub>2</sub> O ---> DCP1P (basal) E	0.95	0.042	50 <sup>b)</sup>		
	H <sub>2</sub> O ---> DCP1P (FCCP) E	0.40	----	70 <sup>b)</sup>		
	PS II + PS I	H <sub>2</sub> O ---> FeCn (basal) E	0.63	0.160	70 <sup>c)</sup>	
H <sub>2</sub> O ---> FeCn (FCCP) E		0.13	0.040	170 <sup>c)</sup>		
H <sub>2</sub> O ---> FeCn (NH <sub>4</sub> Cl) E		0.17	0.045	190 <sup>c)</sup>		
H <sub>2</sub> O ---> FeCn (NH <sub>4</sub> Cl) S		0.12	0.035	120 <sup>c)</sup>		
H <sub>2</sub> O ---> FeCn (NH <sub>4</sub> Cl) R		85.0	0.100	100 <sup>c)</sup>		
H <sub>2</sub> O ---> MV (NH <sub>4</sub> Cl) E		0.13	----	140 <sup>d)</sup>		
H <sub>2</sub> O ---> NADP <sup>+</sup> (NH <sub>4</sub> Cl) S		0.30	----	70 <sup>e)</sup>		
H <sub>2</sub> O ---> NADP <sup>+</sup> (NH <sub>4</sub> Cl) R		75.0	----	50 <sup>e)</sup>		

Tab. II: Valeurs  $I_{50}$  ( $\mu$ M) de l'atrazine et du DCMU sur des membranes thylacoïdales soit d'Épinard (E) soit de Morelles sensible (S) et/ou résistante (R). Le 100% des activités est exprimé en a)  $\mu$ moles O<sub>2</sub> dégagé/mg Chl/h; b)  $\mu$ moles de dichlorophénol-indophénol réduit/mg Chl/h; c)  $\mu$ moles de ferricyanure réduit/mg Chl/h; d)  $\mu$ moles O<sub>2</sub> consommé/mg Chl/h et e)  $\mu$ moles de NADP<sup>+</sup> réduit/mg Chl/h.

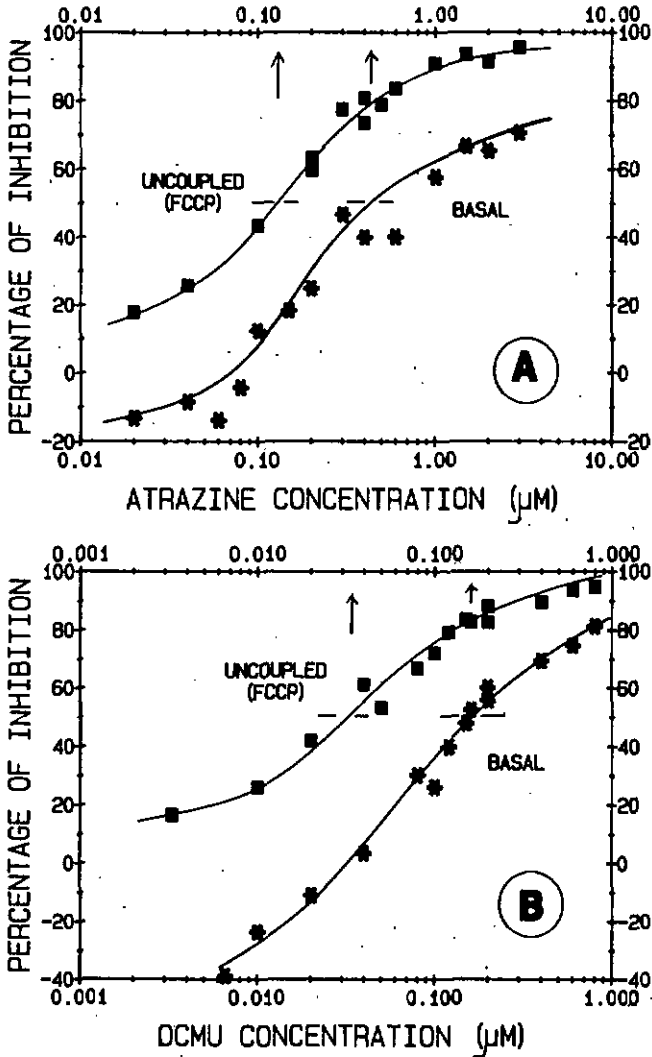


Fig. 4: Courbes d'inhibition du flux d'électrons  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  dans des membranes thylacoïdales d'Épinard traitées par l'atrazine (A) et le DCMU (B). Les  $I_{50}$  sont déterminés soit en condition basale, soit en condition découplée par le FCCP. Les flèches indiquent les valeurs  $I_{50}$  respectives. Le 100% d'activité est de 70  $\mu\text{moles FeCn réduit} \times \text{mg Chl}^{-1} \times \text{h}^{-1}$  en condition basale et de 170 en condition découplée. Noter qu'en condition basale, de faibles concentrations d'herbicide stimulent l'activité du flux d'électrons photosynthétique.

## Atrazine - DCMU

- 1) En effet, le pouvoir inhibiteur de l'atrazine est moins puissant que celui du DCMU. Cette différence peut être attribuée à: i) une lipophilicité différente, celle du DCMU étant supérieure à celle de l'atrazine (voir 1<sup>ère</sup> partie de ce travail et Neumann *et al.*, 1987); ii) une stéréochimie différente, le DCMU mimant une molécule de PQ plus fidèlement que ne le fait l'atrazine (Gardner, 1989); iii) des changements conformationnels allostériques du polypeptide 32 kD différents, le DCMU induisant un changement plus important que ne le fait l'atrazine, ce qui limiterait davantage la liaison des PQ dans la réaction d'oxydoréduction (Vermaas *et al.*, 1984; Renger *et al.*, 1984).

## Basal - découplé

- 2) Le pouvoir inhibiteur d'un herbicide sur une activité du flux d'électrons en conditions basale est environ 2 à 4 fois plus faible qu'en condition découplée. Ceci peut être associé au gradient protonique à travers la membrane thylacoïdale (Barber, 1985). En effet, la concentration de protons dans le lumen contrôle le taux de transfert des électrons, celui-ci étant plus élevé dans les centres PS II encore actifs, permet que l'inhibition due aux herbicides soit contrebalancée par le ralentissement des électrons (Siggel *et al.*, 1972). Par contre, en conditions découplées ceci n'apparaît pas car la concentration en protons dans le lumen du thylacoïde reste basse suite à leur sortie facilitée. Whitmarsh (1986) propose qu'un fort gradient protonique (condition basale) à travers la membrane thylacoïdale, favorise un équilibre de dissociation des PQ vers la forme anionique ( $Q_B^-$ ), fermement liée au polypeptide 32 kD, qui entraverait ainsi la liaison des herbicides sur leur site d'action.

Le Tab. II présente également une variation des valeurs  $I_{50}$  suivant: 3) l'accepteur final d'électrons et 4) le matériel biologique.

## Accepteurs d'électrons (PS II)

- 3) Nous considérerons d'abord les accepteurs finals d'électrons situés "en aval" du PS II (Fig. 5), donc en présence de DBMIB (le DBMIB est reconnu pour ne pas découpler, ni interférer avec le site diuron, pour une revue, voir Trebst, 1980). Le  $I_{50}$  de l'atrazine augmente de plus de six fois lorsque le DCPIP est utilisé plutôt que le DMQ et ceci aussi bien en conditions basale que découplée par le FCCP. Ort *et al.* (1983) proposent que le DCPIP interagit directement avec le site  $Q_B$  et influence significativement le mode d'action des herbicides. De plus, l'utilisation de cette molécule comme accepteur final d'électrons a été remise en question lors d'expériences de stress des membranes thylacoïdales (Thomas *et al.*, 1986a). De telles différences ne s'observent pas pour le DCMU. Lorsque le  $PD_{ox}$  est l'accepteur final des électrons en condition découplée par le  $NH_4Cl$ , on observe une valeur  $I_{50}$  de  $0.12 \mu M$ , proche des valeurs rencontrées lorsque le FeCn est photoréduit en condition découplée.

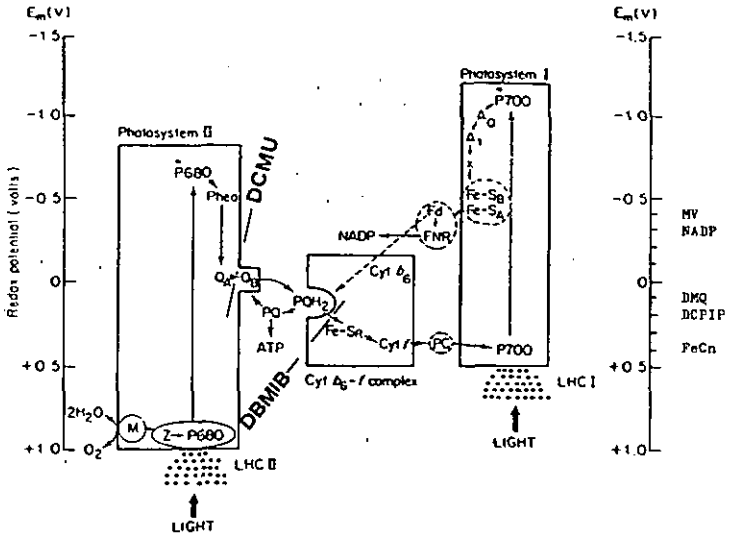


Fig. 5: Schéma en "Z" de la photosynthèse adapté de Hall & Rao (1989). Chaque composant de la chaîne de transport d'électrons est placé à la valeur de son potentiel normal à pH 7.0.

M, système de dégagement de l'oxygène; Z, donneur du PS II;  $P_{680}$ , centre réactionnel du PS II; Pheo, phéophytine, 1<sup>er</sup> accepteur du PS II;  $Q_A$ , quinone fixée;  $Q_B$ , quinone semi-libre; PQ, plastoquinone;  $PQH_2$ , plastoquinol; Fe-S<sub>r</sub>, protéine FeS de Rieske; Cyt f et Cyt  $b_6$ , cytochromes; PC, plastocyanine;  $P_{700}$ , centre réactionnel du PS I;  $A_0$  et  $A_1$ , premiers accepteurs du PS I; x, FeS<sub>0</sub> et FeS<sub>A</sub>, protéines FeS, acceptrices du PS I; Fd, ferrédoxine; FNR, ferrédoxine-NADP réductase.

Trait continu, flux non cyclique; trait discontinu, flux cyclique des électrons; LHC II et LHC I, complexes polypeptidiques collecteurs de lumière des PS II et PS I, respectivement.

### Accepteurs d'électrons (PS II + PS I)

En considérant les accepteurs finals d'électrons situés en "aval" du PS I. (flux d'électrons non-cyclique), on constate que la plage des valeurs  $I_{50}$  est beaucoup plus restreinte que dans le cas précédent. Pour l'atrazine comme pour le DCMU, on n'observe que peu ou pas de différences en conditions découplées soit par le  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , soit par le FCCP lorsque le FeCn est l'accepteur final d'électrons. Le pouvoir inhibiteur de l'atrazine est légèrement augmenté (25%) lorsque le MV remplace le FeCn. Ceci peut être attribué à la propriété du FeCn d'oxyder chimiquement soit le Cyt  $b_{559}$  (Drechsler & Neumann, 1982), soit  $Q_B$ , fixant la sémi-quinone à la membrane et rendant ainsi plus difficile la liaison des herbicides (Farineau, 1986), ou encore à la propriété du FeCn d'affaiblir la liaison des herbicides dans des membranes thylacoïdales légèrement endommagées (Renger et al., 1988).

On constate également que l'atrazine et le DCMU, en faible concentration, stimulent le flux total d'électrons non-cyclique en conditions basales (Figs 4A et B), ce qui n'a jamais été observé pour les réactions partielles du PS II. Ceci peut être attribué soit à un effet découplant des herbicides qui élimine toute compétition entre les flux d'électrons cyclique et non-cyclique (Nishimura et al., 1975), soit à des modifications de certains composants de la membrane thylacoïdale situés après le PS II.

### Matériel biologique

- 4) Le pouvoir inhibiteur des herbicides dépend aussi du matériel biologique (espèces ou biotypes). En effet, on observe dans le Tab II, que l'atrazine et le DCMU ont un pouvoir inhibiteur plus fort sur la Morelle S que sur l'Epinard. Par contre l'atrazine n'a d'effet qu'en concentration élevée sur le flux d'électrons du biotype R (rapport  $I_{50}$  de R/ $I_{50}$  de S = 250 lorsque le FeCn est l'accepteur final d'électrons et 700 lorsque c'est le NADP'). Le DCMU également est moins efficace sur le biotype R que sur le S (rapport  $I_{50}$  de R/ $I_{50}$  de S = 2.9), mais on ne peut pas parler dans ce cas de résistance au DCMU (Oettmeier et al., 1982; Pfister et al., 1979; Thiel & Böger, 1984) mais plutôt d'une "pseudotolérance".

Le Tab. II montre enfin que les thylacoïdes R ont une activité de transport d'électrons non-cyclique d'environ 20% plus petite que celle des S (pour une explication, voir le § suivant). Entre les espèces également on observe une différence du taux d'activité photosynthétique, l'Epinard montrant un flux  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{FeCn} (\text{NH}_4\text{Cl})$  plus élevé que celui de la Morelle S. Cette dernière observation est probablement associée à l'intégrité des membranes thylacoïdales, celles de Morelles étant plus fragiles, donc plus facilement endommagées que celles de l'Epinard.

## Lumière

Nous avons constaté que l'origine et la qualité des thylacoïdes, le type d'accepteur final d'électrons et la présence d'un agent découplant influencent le pouvoir inhibiteur des herbicides. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à mesurer une activité photosynthétique en conditions d'éclairement limitant. Nous avons mesuré l'activité  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NADP}' (\text{NH}_4\text{Cl})$  en fonction de l'irradiance chez des membranes thylacoïdales de Morelles S et R (Fig. 6). Ces courbes de saturation suggèrent que l'efficacité photosynthétique du biotype R est plus faible que celle du biotype S, ce qui peut être associé, selon Ireland *et al.* (1988), au fait qu'un "pool" de  $\text{Q}_\text{A}$  n'est plus oxydé rapidement par l'activité du PS I chez le mutant. Ce résultat confirme ceux de Holt *et al.* (1981), Burke *et al.* (1982), Ort *et al.*, (1983), Ahrens & Stoller (1983) et Ireland *et al.* (1988), qui observent que le rendement quantique relatif des biotypes R de plusieurs espèces (*S. vulgaris*, *B. campestris* ou *A. hybridus*) est environ 20% inférieur à celui des biotypes S respectifs. Le comportement des mutants vis-à-vis des conditions d'éclairement les rapproche donc des espèces d'ombre, ce que corrobore les résultats relatifs à l'étude structurale des thylacoïdes R par rapport aux S (voir 3<sup>ème</sup> Partie).

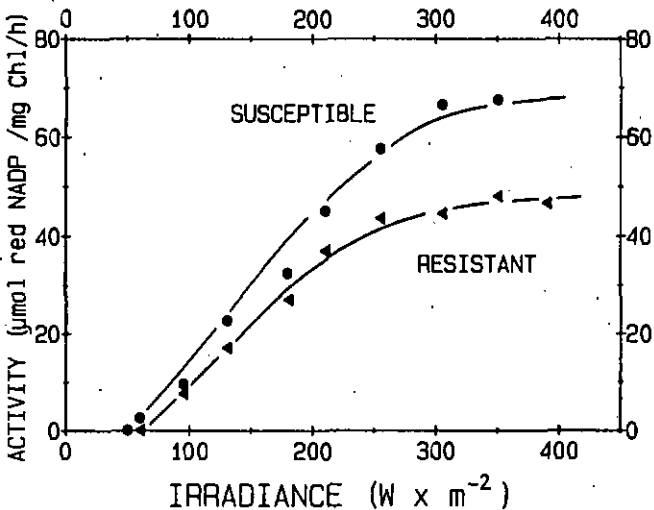


Fig. 6: Courbes de saturation des biotypes sensible (•) et résistant (◄) exprimées en  $\mu\text{moles NADP}' \text{ réduit} \times \text{mg Chl}' \times \text{h}$  en fonction de l'intensité lumineuse.

NB: les courbes ne partent pas de l'origine pour des raisons d'appareillage.

Le pouvoir inhibiteur des herbicides diminue proportionnellement à l'intensité lumineuse, tant que celle-ci est limitante (Fig. 7). En conditions de lumière saturante, les valeurs  $I_{50}$  de l'atrazine tendent vers un plateau, tant qu'aucune photoinhibition n'apparaît (Chow et al., 1989), (résultats non montrés). Après extrapolation des droites de la Fig. 6 pour une irradiance nulle, nous constatons un  $I_{50}$  égal à 0  $\mu\text{M}$  pour S et -20  $\mu\text{M}$  d'atrazine pour R. Ceci nous suggère que l'atrazine affecte le flux d'électrons des membranes thylacoidales S déjà aux faibles irradiances, ce qui peut être associé à l'action très spécifique de cet herbicide sur le polypeptide 32 kD (Tischer & Strotmann, 1977). Par contre, chez R, il semble qu'il existe une sorte de "réservoir" dans lequel l'herbicide n'aurait qu'un effet latent sur l'activité du flux électronique. Il pourrait donc s'agir d'une inhibition des activités photosynthétiques via une action aspécifique de l'atrazine qui n'exercerait son action inhibitrice que lorsqu'elle se trouve en grande quantité dans toutes les structures chloroplastiques (=inhibition par un effet de concentration).

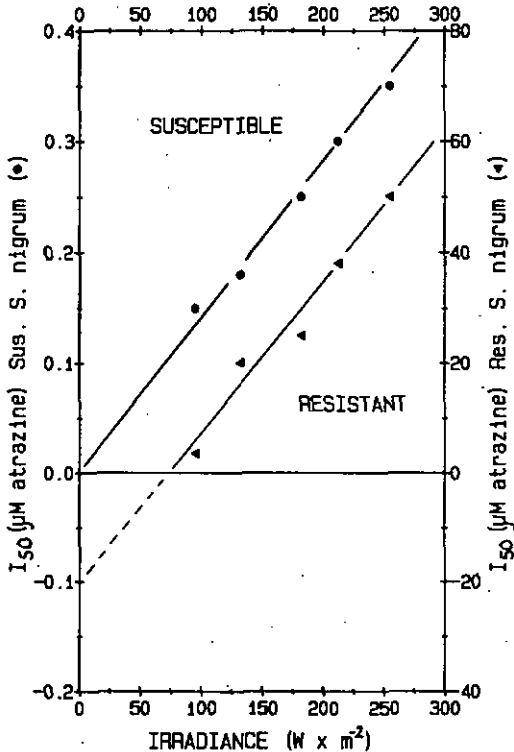


Fig. 7: Relation entre la valeur  $I_{50}$  pour l'atrazine et l'irradiance et la chez les biotypes sensible (●) et résistant (▲) de *S. nigrum*.



## 4.1.2 La liaison herbicide-membrane ("binding")

La constante de dissociation ( $K_d$ ) et le nombre de sites de liaison ( $n$ ) de l'atrazine et du DCMU appliqués à des membranes thylacoïdales ont été calculés à partir de la représentation de Scatchard (Fig. 2). Dans tous les cas étudiés, la quantité d'atrazine liée aux membranes thylacoïdales du biotype S (Fig. 9A) ou la quantité de DCMU liée aux thylacoïdes des deux biotypes (Fig. 9B) augmente progressivement avec la concentration d'herbicide. Des résultats similaires (non montrés) sont obtenus avec des thylacoïdes d'Épinard. Par contre, les membranes thylacoïdales de Morelles R n'ont, aux concentrations d'atrazine testées, jamais incorporé cet herbicide (Fig. 9A), phénomène également observé chez *Senecio vulgaris* R par Pfister et al. (1979).

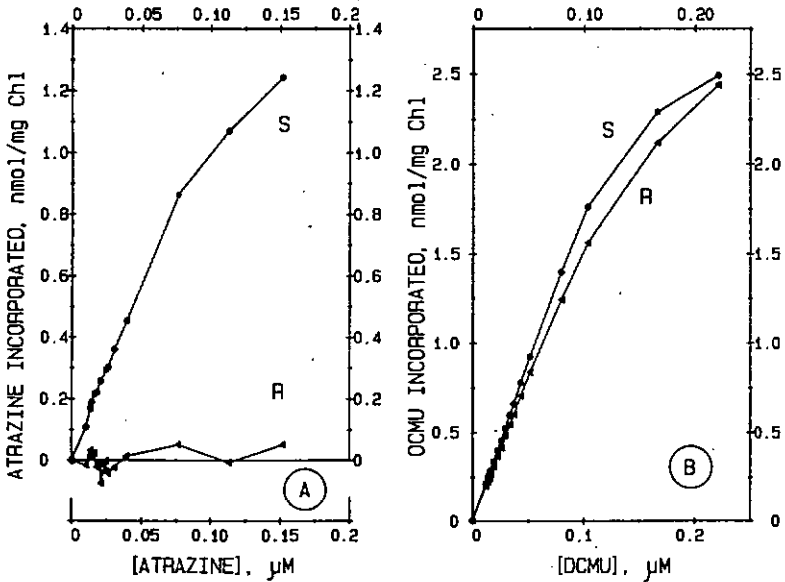


Fig. 9: Incorporation des herbicides (A) [ $^{14}$ C]-atrazine et (B) [ $^{14}$ C]-DCMU (nmol/mg Chl) dans des membranes thylacoïdales de *S. nigrum* sensible (S) et résistante (R) à l'atrazine en fonction de la concentration d'herbicide ( $\mu$ M).

## Coopérativité

Les représentations de Scatchard concernant l'atrazine (résultats non montrés) et le DCMU (Fig. 10) présentent deux parties distinctes: une partie linéaire (lorsque la concentration d'herbicide dans le milieu d'incubation est supérieure à  $0.04 \mu\text{M}$ , ce qui correspond à env.  $0.7 \text{ nmol}$  d'herbicide lié/mg Chl) et une partie non-linéaire (aux concentrations inférieures). La forme de cette dernière phase suggère qu'aux concentrations d'herbicide inférieures à  $0.04 \mu\text{M}$ , les deux herbicides se lient aux membranes de manière coopérative. A notre connaissance, cette phase de coopérativité positive n'a jamais été mise en évidence auparavant. Pourtant un tel comportement de liaison aurait dû être observé par la représentation graphique de Hill (Pfister et al., 1979; van Rensen, 1984) mais, cette dernière méthode considère une plage de concentrations d'herbicide trop étendue, qui masque le phénomène de coopérativité. Or, ce phénomène n'est observable qu'aux faibles concentrations d'herbicide ( $0-0.04 \mu\text{M}$ ).

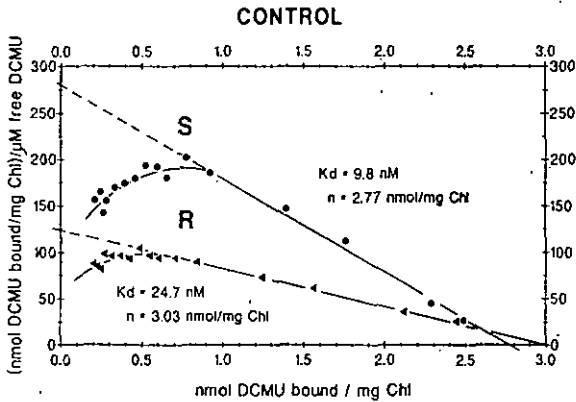


Fig. 10: Constantes de dissociation ( $K_d$ ) et nombres de sites de liaison ( $n$ ) du DCMU pour des membranes thylacoïdales de biotypes sensible (S) et résistant (R) de *S. nigrum*.  $K_d$  et  $n$  sont déterminés à partir de la représentation de Scatchard. Les coefficients de corrélation sont de 0.997 et 0.999 pour les biotypes S et R, respectivement.

## Spécificité de la liaison des herbicides

L'amplitude de la phase de coopérativité positive a toujours été plus marquée (env. 2X) chez le biotype S de la Morelle que chez le R (Fig. 10). Cette dernière observation pourrait indiquer que la substitution d'une sérine par une glycine du polypeptide 32 kD du biotype R (Hischberg et al., 1984), a eu pour effet, non seulement d'empêcher toute fixation de l'atrazine, mais encore d'altérer le phénomène de coopérativité positive dans la liaison du OCMU, probablement suite à un changement conformationnel du polypeptide (voir plus loin). La phase linéaire (Fig. 10) observée aux concentrations d'herbicide  $> 0.04 \mu\text{M}$ , correspond vraisemblablement à la liaison spécifique de l'herbicide sur le polypeptide 32 kD (Pfister et al., 1981). La Fig. 10 montre également que le OCMU a une moins forte affinité pour des membranes thylacoïdales du biotype R que pour celles du biotype S (voir aussi Tab. III, Kd du OCMU est 2 à 3 fois plus élevée chez R que chez S). Cette dernière observation suggère que non seulement le site atrazine est modifié chez le biotype R suite à la mutation mais aussi le site OCMU, quoique dans des proportions nettement plus faible. Ainsi, apparaît le concept de deux sites de liaison différents sur le polypeptide 32 kD, l'un pour les urées substituées et l'autre pour les triazines symétriques. Plusieurs modèles, faisant tous intervenir des subrécepteurs soit communs soit spécifiques pour les différents herbicides, ont été proposés (Pfister & Arntzen, 1979; Pfister et al., 1979; Trebst, 1980; Thiel & Böger, 1984). Ces subrécepteurs impliquent l'existence d'un domaine au sein du polypeptide 32 kD où les sites de liaison des herbicides se chevauchent. Nos résultats corroborent ces modèles, plus particulièrement le modèle de Trebst (1980) (Fig. 11).

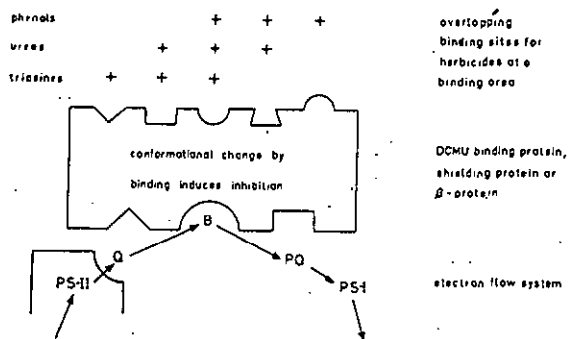


Fig. 11: D'après Trebst (1980): Représentation schématique d'un site de liaison du DCMU sur la membrane thylacoïdale, situé du côté accepteur du photosystème II (PS-II). L'image que nous avons du PS II a quelque peu évolué ces dix dernières années, mais celle d'un domaine où les sites de liaison des différents types d'herbicides se chevauchent, est encore actuelle.

### Compétition

Il a été observé que tous les herbicides du PS II se déplacent mutuellement (Pfister & Urbach, 1983). Ceci indique que tous ces herbicides:

- 1) entrent en compétition pour un site commun de la membrane thylacoïdale (Tischer & Strotmann, 1977; Pfister & Arntzen, 1979; Laasch *et al.*, 1982; Allen *et al.*, 1983; Tellenbach *et al.*, 1984; Thiel & Böger, 1984)
- 2) interfèrent avec le site de réduction des PQ (Velthuys, 1981, 1982; Vermaas *et al.*, 1983; Trebst, 1985; Soll & Oettmeier, 1984; Farineau & Mathis, 1985; Satoh *et al.*, 1986; Farineau, 1986; Wydrzynski & Inoue, 1987; Trebst *et al.*, 1988; Drechsler & Neumann, 1989; Gardner, 1989)
- 3) interfèrent avec le site de fixation du  $\text{CO}_2$  (van Rensen & Vermaas, 1981; Khanna *et al.*, 1981; Vermaas *et al.*, 1982, 1984; van Rensen, 1984; Nugent *et al.*, 1988; Eaton-Rye & Govindjee, 1988).

L'analyse du mécanisme de compétition entre herbicides pour un même site de liaison est possible par la représentation en double-inverse des valeurs de la liaison d'un herbicide "chaud" en présence d'un herbicide compétiteur différent "froid". Sous cette forme de représentation (Fig. 12), la compétition entre deux molécules est indiquée par une intersection commune des droites sur l'ordonnée (nombre de sites de liaison constant), alors que l'intersection sur l'abscisse tend vers zéro (diminution de l'affinité) lorsque la concentration de l'herbicide "compétiteur" augmente.

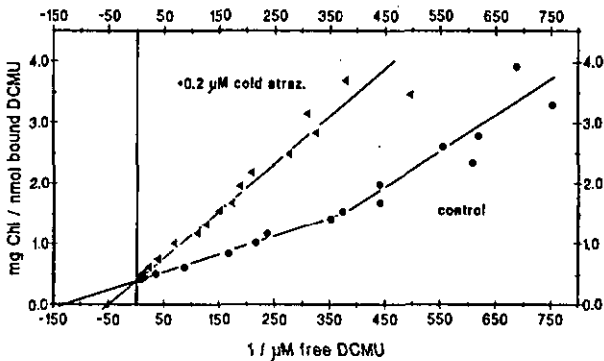


Fig. 12: Liaison du DCMU sur des membranes thylacoïdales d'Epineard contrôle (•) et en présence de 0.2  $\mu\text{M}$  d'atrazine (•). Ce type de représentation en double-inverse, permet de déterminer aisément le type d'interaction entre les deux herbicides ("compétitive", "uncompétitive", "noncompétitive"), voir Fersht (1977). Dans ce cas, il s'agit d'une interaction de type exclusivement compétitif.

En effet, lorsque des thylacoïdes sont incubés avec  $0.04 \mu\text{M}$  de DCMU "froid" en présence d'atrazine radioactive (Fig. 13A), on constate que la valeur  $K_d$  de l'atrazine passe de 21 à 46 nM, l'affinité étant alors diminuée de plus de moitié.

Si les membranes sont incubées avec  $0.04 \mu\text{M}$  d'atrazine "froid" en présence de DCMU radioactif (Fig. 13B), on constate que la  $K_d$  du DCMU passe de 4.5 à 8 nM, l'affinité étant alors diminuée de moins de 1.5 fois. Ainsi, l'affinité du DCMU est quelque 6 fois plus forte que celle de l'atrazine dans ces conditions.

Le nombre de sites de liaison, quant à lui, se situe toujours entre 2 et 3 nmol/mg Chl pour les deux herbicides.

En présence de  $0.2 \mu\text{M}$  d'atrazine "froid" la valeur  $K_d$  du DCMU augmente à 22 nM (Figs 12 et 13B) et la phase de coopérativité positive est complètement éliminée (Fig. 12). Par contre, lorsque les membranes sont incubées en présence de  $0.2 \mu\text{M}$  de DCMU "froid", l'atrazine perd toute son affinité spécifique (sur le polypeptide 32 kD) et il n'est plus possible d'estimer l'affinité de cet herbicide.

La diminution d'affinité des herbicides en conditions compétitives par rapport à des conditions non compétitives est associée à la présence d'un (des) site(s) commun(s). On constate que lors de ces déplacements mutuels, le DCMU est plus compétitif que l'atrazine.

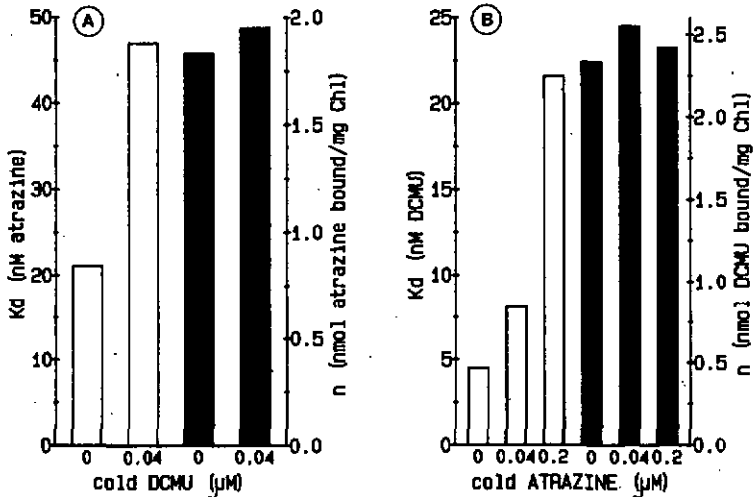


Fig. 13: Constante de dissociation ( $K_d$ , blanc) et nombre de sites de liaison ( $n$ , noir) de l'atrazine (A) et du DCMU (B) en conditions de compétition mutuelle.  $n$ : l'atrazine n'est plus à même de se lier lorsque les membranes thylacoïdales d'Epinephedra sont incubées en présence de  $0.2 \mu\text{M}$  de DCMU (Fig. 13A).

Valeurs Kd et  $\eta$ 

On constatera que les valeurs Kd et  $\eta$  trouvées tout au long de cette quatrième partie (pour un résumé, voir le Tab. III) sont 1.5 à 4 fois plus faibles que celles reportées pour *S. vulgaris* (Pfister *et al.*, 1979), *S. oleracea* (Tischer & Strotmann, 1977; Laasch *et al.*, 1982), *A. retroflexus* (Oettmeier *et al.*, 1982) et *P. sativum* (Jursinic & Stenler, 1983; Vermaas *et al.*, 1983). Ces différences pourraient être attribuées, outre la variation triviale entre les espèces, aux conditions particulières que nous avons choisies et qui sont: 1) l'adaptation des feuilles à l'obscurité avant l'isolement des membranes thylacoïdales, 2) l'incubation des thylacoïdes en présence d'herbicide radioactif effectuée à basse température (4 °C) et 3) les herbicides radioactifs dont l'activité spécifique dépasse 15 Ci/mol. Ces conditions expérimentales semblent influencer significativement les valeurs Kd et  $\eta$  (Paterson & Arntzen, 1982; Jursinic & Stenler, 1983; Laasch *et al.*, 1984; Neumann *et al.*, 1987; Jursinic & Dennenberg, 1989).

Les thylacoïdes sont saturés en herbicide lorsque la concentration du pesticide est comprise entre 2 et 3 nmol/mg Chl (Fig. 10 et Tab III). Cette valeur correspond à une molécule d'herbicide liée pour 350-550 molécules de Chl. Cette stoechiométrie entre chlorophylles et herbicides suggère qu'une molécule d'herbicide est liée par unité photosynthétique (Tischer & Strotmann, 1977; Pfister *et al.*, 1979; Laasch *et al.*, 1982; Oettmeier & Masson, 1980; Chow *et al.*, 1989). Dans certains cas, de faibles affinités (Kd élevés) ont été observées pour des concentrations d'herbicide bien supérieures à celles qui inhibent totalement un flux d'électrons photosynthétique (Tischer & Strotmann, 1977; Laasch *et al.*, 1981, 1982; Oettmeier *et al.*, 1982). Ils sont associés à des liaisons aspécifiques et représentent la liaison des herbicides sur différents sites pas toujours clairement identifiés (lipides, pigments, diverses protéines, etc...).

	$I_{50}$ (nM)		Kd (nM)		$\eta$ (nmol/mg Chl)	
	Atrazine	DCMU	Atrazine	DCMU	Atrazine	DCMU
K	0.17 ± 0.03 <sup>a)</sup>	0.045 ± 0.005 <sup>b)</sup>	10 ± 7 <sup>b)</sup>	5.7 ± 1.6 <sup>a)</sup>	2.45 ± 0.45 <sup>b)</sup>	2.45 ± 0.45 <sup>b)</sup>
S	0.16 ± 0.05 <sup>a)</sup>	0.035 ± 0.005 <sup>b)</sup>	35 ± 3 <sup>a)</sup>	7.5 ± 1.5 <sup>b)</sup>	2.05 ± 0.35 <sup>b)</sup>	2.85 ± 0.35 <sup>b)</sup>
R	75 ± 20 <sup>a)</sup>	0.060 ± 0.030 <sup>b)</sup>	-----	22.0 ± 3.0 <sup>a)</sup>	-----	2.55 ± 0.45 <sup>b)</sup>

Tab. III: Moyennes des valeurs  $I_{50}$ , Kd et  $\eta$  pour l'atrazine et le DCMU chez des membranes thylacoïdales d'Épinard (K) et de Morelles sensible (S) et résistante (R) à l'atrazine. Les Kd et  $\eta$  ont été déterminés sur des membranes thylacoïdales incubées à 4 °C. Les écarts-types sont calculés à partir de a) 5, b) 4, c) 3 et d) 2 séries d'expériences, une série d'expériences correspond, en général, à 4 mesures indépendantes. Pour plus d'information, voir le texte.

## Corrélation entre "inhibition et affinité"

Le Tab. III montre les valeurs moyennes de  $I_{50}$ , Kd et  $\eta$  de l'atrazine et du DCMU, pour l'Epinard et les Morelles S et R. Ce tableau est une moyenne de tous les contrôles lors de l'étude des différents stress que nous avons analysés (voir plus loin). Bien que ces valeurs aient été obtenues à différents moments de l'année et avec un matériel d'âge chronologique et/ou physiologique différent, elles présentent une fourchette réaliste de la variabilité a) de la valeur  $I_{50}$  pour un flux non cyclique découplé à 20 °C ( $H_2O \longrightarrow FeCl_3, NH_4Cl$ ), b) des valeurs Kd et  $\eta$  obtenues à l'obscurité et à basse température (4 °C). Nous constatons que le pouvoir inhibiteur de l'atrazine est 3 à 7 fois plus faible que celui du DCMU et que son affinité est réduite de 3 à 9 fois par rapport à la phénylurée (voir aussi 4.1.1). Par contre, le nombre de sites de liaison est semblable pour les deux herbicides, et se situe entre 2 et 3 sites/mg Chl. Ainsi, on observe une bonne corrélation relative entre le pouvoir inhibiteur et l'affinité des deux herbicides.

## Lumière et obscurité

Nous avons vu précédemment que le pouvoir inhibiteur de l'atrazine est plus fort sous éclairage limitant que sous éclairage saturant (Fig. 7). Pour cette raison, nous avons recherché si les propriétés de liaison des herbicides étaient également modifiées lorsque les membranes thylacoïdales étaient éclairées par rapport à des thylacoïdes restés à l'obscurité (Fig. 14).

Dans ce type d'expérience, nous avons utilisé des thylacoïdes d'Epinard et les incubations ont été conduites à 20 °C en conditions couplées (sorbitol 300mM, NaCl 10 mM, Tricine 20 mM pH 8.0,  $MgCl_2$  5mM,  $KH_2PO_4$  1mM, méthylviologène 0.15 mM, ADP 1 mM) et découplées (même milieu d'incubation +  $NH_4Cl$ ). Les thylacoïdes, en absence de tout herbicide, ont été préalablement illuminés pendant 10 sec par une lumière blanche saturante afin d'initialiser le flux d'électrons photosynthétique, après lesquelles, les thylacoïdes ont été incubés (6 min) dans un agitateur thermostaté "home made" permettant un éclairage saturant des membranes et une agitation continue à température constante. Lorsqu'en conditions couplées ou découplées (voir les milieux ci-dessus) les membranes ont été incubées à l'obscurité, nous avons pris garde à ce qu'elles soient à l'abri de toute lumière directe.

**NB:** Par rapport aux valeurs des Kd déterminées précédemment à basse température, les Kd mesurés en conditions obscures à 20 °C sont significativement plus élevées (voir plus loin pour le stress thermique, § 4.2.2).

La Fig. 14A montre que l'affinité des herbicides pour des thylacoïdes éclairés est plus faible que pour ceux restés à l'obscurité, aussi bien en condition couplée que découplée. Cette observation est à mettre en relation avec les résultats de Renger (1979), Jursinic & Stemler (1983), Laasch *et al.* (1983, 1984), Millner & Barber (1984), Farineau & Hathis (1985), Farineau (1986) et Graan & Ort (1986), qui indiquent, que

les herbicides ne peuvent se lier que lorsque le site de liaison est vacant, c'est-à-dire exempt de quinones fortement liées au polypeptide 32 kD. Cet état est maximal à l'obscurité, puisqu'environ 25% seulement des centres PS II contiennent  $Q_B$  (Mathis & Haveman, 1987; Rutherford *et al.*, 1982). De plus, il apparaît que l'affinité du DCMU diminue de plus de 2 fois à la lumière par rapport à l'obscurité, alors que celle de l'atrazine ne baisse que de 1.3 fois, ceci en condition découplée et de 1.5 et 1.3 fois, respectivement, en condition couplée (Fig. 14).

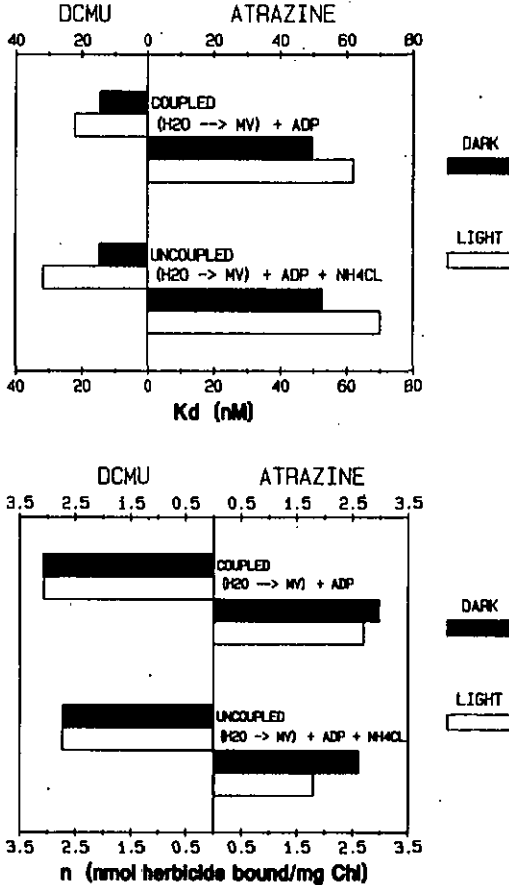


Fig. 14: (A) constante de dissociation ( $K_d$ ) et (B) nombre de sites de liaison ( $n$ ) de l'atrazine et du DCMU pour des membranes thylacoidales d'Epinard. Les paramètres de liaison ont été déterminés en conditions couplée et découplée, à la lumière et/ou à l'obscurité à 20 °C.

La lumière, l'affinité des herbicides diminue lorsque le flux d'électrons est découplé par rapport à un flux couplé (12% pour l'atrazine et 30% pour le DCMU). La Fig. 14B montre que le nombre de sites de liaison est plus élevé en condition couplée qu'en condition découplée, ce qui suggère qu'en condition découplée, une plus faible quantité d'herbicide suffit pour atteindre la demi-inhibition puisque le nombre de sites est plus faible qu'en condition couplée.

Nous avons vu que le pouvoir inhibiteur de l'atrazine est diminué en condition de lumière saturante par rapport à des conditions de lumière limitante (4.1.1). Cette observation est corroborée par une diminution du nombre de sites de liaison de cet herbicide à la lumière par rapport à l'obscurité (Fig.14B). Le nombre de sites de liaison de l'atrazine est plus faible à la lumière qu'à l'obscurité, alors que celui du DCMU ne varie pas (Fig. 14B). Cette dernière observation peut être associée au fait que la membrane change d'état (packing, fluidité, etc...) à la lumière par rapport à l'obscurité (voir Rawyler & Siegenthaler, 1989 et publications citées dans cet article) et que les sites de liaison spécifiques à l'atrazine et au DCMU peuvent être modifiés différemment.

Ainsi, les propriétés de liaison des deux herbicides sont altérées différemment par la lumière: i) l'affinité du DCMU est diminuée plus fortement que celle de l'atrazine; ii) le nombre de sites de liaison de l'atrazine est diminué alors que celui du DCMU reste constant.

#### Résumé et considérations générales

Nous avons résumé sous la forme d'un tableau (Tab. IV), les différents paramètres observés dans les § 4.1.1 et 2. On constate dans la Table IV, qu'une bonne corrélation existe entre le pouvoir inhibiteur des herbicides et leurs propriétés de liaison; une augmentation du pouvoir inhibiteur d'un herbicide est généralement associée à une augmentation de l'affinité de cet herbicide pour son site de liaison, quant à  $n$ , il peut augmenter mais pas nécessairement.

CONDITIONS	POUVOIR INHIBITEUR	AFFINITE	NB DE SITES DE LIASON
Herbicides (S)	DCMU > atrazine	DCMU > atrazine	DCMU > atrazine
DCMU (S & R)	S > R	S > R	S = R
Lumière (S & R)	limitante > saturante	obscurité > lumière	AIR : obsc > lumière DCMU: obsc = lumière
flux d'électrons (S & R)	découplé > basal	découplé < couplé	découplé < couplé

Tab. IV: Résumé des différentes observations reportées dans les § 4.1.1 et 2. Pour plus d'information, voir le texte.

Il est plus difficile d'établir une correspondance stricte entre l'affinité, le nombre de sites et le  $I_{50}$  pour les différents types de flux d'électrons, ainsi que l'ont déjà constaté Jursinic & Stemler (1983) et Thiel & Böger (1984). Ceci peut être associé aux conditions expérimentales légèrement différentes selon que l'on mesure des  $K_d$ , des  $n$  ou des  $I_{50}$ . Cela peut encore être dû à la façon de formuler les phénomènes de liaison et d'inhibition. Le pouvoir inhibiteur d'un herbicide est souvent exprimé par une valeur  $I_{50}$  mais il est également possible d'exprimer ce paramètre par la constante d'inhibition ( $K_i$ ). Cette valeur présente l'avantage d'être indépendante de la concentration en chlorophylle dans l'échantillon (Tischer & Strotman, 1977).

La relation entre le  $I_{50}$  d'un herbicide et la concentration en chlorophylle est linéaire (Fig. 15; voir aussi Tischer & Strotman, 1977). La Fig. 15 présente une valeur de  $K_i$  égale à  $0.15 \mu\text{M}$  pour l'atrazine et  $0.03 \mu\text{M}$  pour le DCMU, pour un flux d'électron  $\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{FeCn}(\text{NH}_2\text{Cl})$  à  $20^\circ\text{C}$ . Ces valeurs sont à mettre en relation avec celles présentées dans la Fig. 14: En effet, les constantes de dissociation de  $0.07$  et  $0.03 \mu\text{M}$  pour l'atrazine et le DCMU, respectivement, pour le flux d'électrons  $\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{FeCn}(\text{NH}_2\text{Cl})$  à  $20^\circ\text{C}$  sont très proches des précédentes. Ainsi, pour des conditions comparables, les valeurs des constantes d'inhibition se situent dans un même ordre de grandeur que celles des constantes de dissociation.

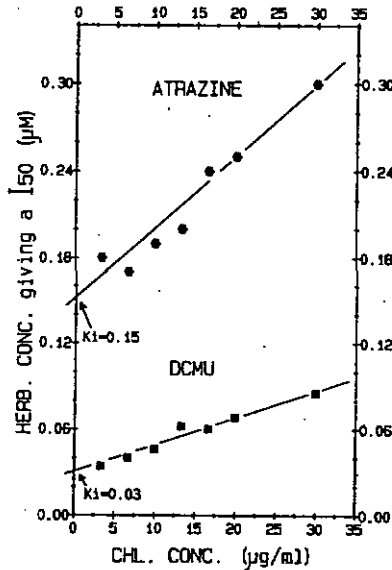


Fig. 15: Valeurs de demi-inhibition ( $I_{50}$ ) du flux d'électrons  $\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{FeCn}(\text{NH}_2\text{Cl})$  à  $20^\circ\text{C}$  chez l'Epinard, par l'atrazine (\*) et le DCMU (■), en fonction de la concentration en chlorophylle.  $K_i$  = constante d'inhibition ( $\mu\text{M}$ ).

#### 4.2 Inhibition du flux non-cyclique et liaison de l'atrazine et du DCMU sur des membranes thylacoïdales soumises à divers stress

La stratégie de recherche dans cette partie 4.2, consiste à évaluer les propriétés d'inhibition et de liaison de l'atrazine et du DCMU sur des membranes thylacoïdales d'Epinard et de Morelles S et R, soumises à différents stress. Nous tenterons donc de modifier la structure de la membrane en cherchant à altérer le plus spécifiquement possible sa partie lipidique. Dans un premier temps, les stress agiront sur l'ensemble de la membrane (stress osmotique, thermique et chimique). Dans un deuxième temps la partie lipidique sera visée plus directement (stress par hydrogénation catalytique) et dans un troisième temps, seule la partie lipidique de la monocouche externe, sera altérée (stress lipolytique).

##### 4.2.1 Stress osmotique

###### Principe

La méthode consiste à incuber des membranes thylacoïdales d'Epinard et de Morelles S et R dans des milieux dont la concentration en sorbitol augmente. Composition du milieu: Sorbitol, variable de 25 à 600 mM, MOPS 10 mM, pH 7.5 (KOH);  $MgCl_2$ , 5 mM;  $NH_4Cl$ , 5 mM. Lors de la détermination des  $I_{50}$  dans ces différentes conditions, le milieu réactionnel contient en plus 0.5 mM  $FeCl_3$ .

Les vésicules sont d'abord turgescentes aux basses osmolarités (Lockau, 1979), passent par un stade d'isoosmolarité (env 300-400 mOsm), puis se contractent aux fortes osmolarités (Tolberg & Macey, 1965; Mongladarom & Honda, 1966). Par ailleurs, il a été observé, que des thylacoïdes éclairés gonflent (Packer et al., 1965; Dilley & Rothstein, 1967; Siegenthaler, 1968), ce qui induit un "rétrécissement" de l'épaisseur de la membrane (Oillel et al., 1967).

###### Inhibition et liaison

La Fig. 16 présente pour des membranes thylacoïdales d'Epinard et pour l'atrazine, (A) les valeurs des  $K_d$  et  $n$  et (B) les valeurs  $I_{50}$  versus les mOsm du milieu de suspension. On constate qu'aux basses osmolarités, l'affinité et le pouvoir inhibiteur de l'atrazine sont plus élevés qu'en conditions isoosmolaires. Par contre, le nombre de sites de liaison de cet herbicide ne semble pas être modifié significativement ( $2.8 \pm 0.2$ ). Pour les Morelles S et R, nous avons trouvé les mêmes tendances (résultats non montrés) mais le pouvoir inhibiteur de l'atrazine est minimal à une osmolarité voisine de 400 mOsm. Cette dernière valeur semble correspondre aux conditions d'isotonie pour les membranes thylacoïdales des Solanacées (Blumenthal-Coldschmidt & Poljakoff-Mayber, 1966), voir également le § 3.2 de la 3<sup>ème</sup> Partie.

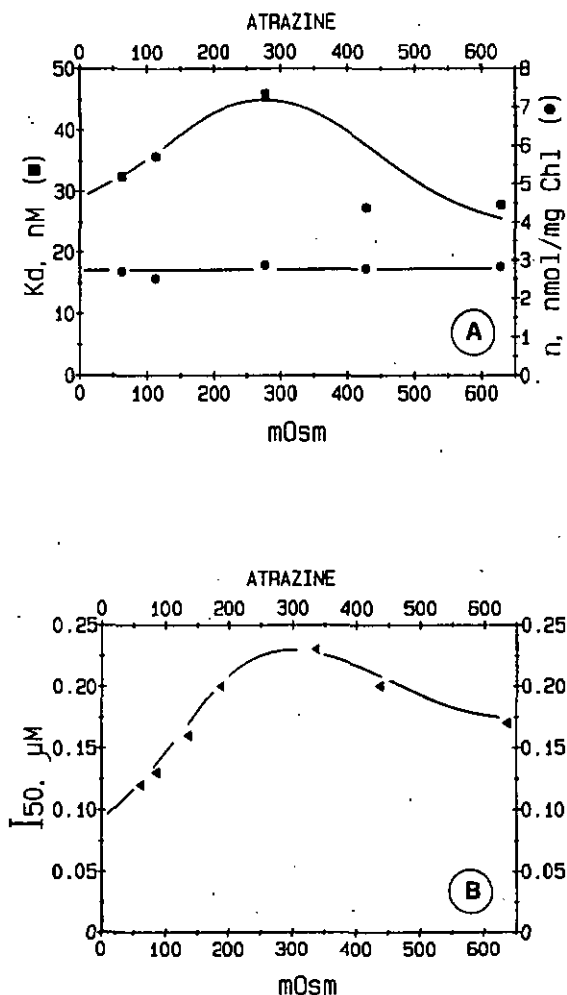


Fig. 16: (A) Valeurs des constantes de dissociation ( $K_d$  [■], nM atrazine) et du nombre de sites de liaison ( $n$  [●], nmol atrazine/mg Chl) dans la glace et à l'obscurité.

(B) Valeurs de la demi-inhibition ( $I_{50}$  [▲], μM atrazine) de l'activité  $H_2O \rightarrow FeCn(NH_4Cl)$  à 20 °C.

(A) et (B) sont estimés pour différentes osmolarités (mOsm) du milieu de suspension des membranes thylacoïdales d'Épinard. L'osmolarité du milieu est augmentée par des concentrations croissantes de sorbitol, alors que la force ionique du milieu reste constante.

La Fig. 17 présente pour des membranes thylacoïdales d'Epinaud et pour le DCMU, (A) les valeurs des  $K_d$  et  $n$  et (B) les valeurs  $I_{50}$  versus les mOsm du milieu de suspension. On constate que ni l'affinité, ni le nombre de sites de liaison ni le pouvoir inhibiteur du DCMU sont significativement modifiés. Des résultats comparables ont été observés pour les Morelles S et R (résultats non montrés).

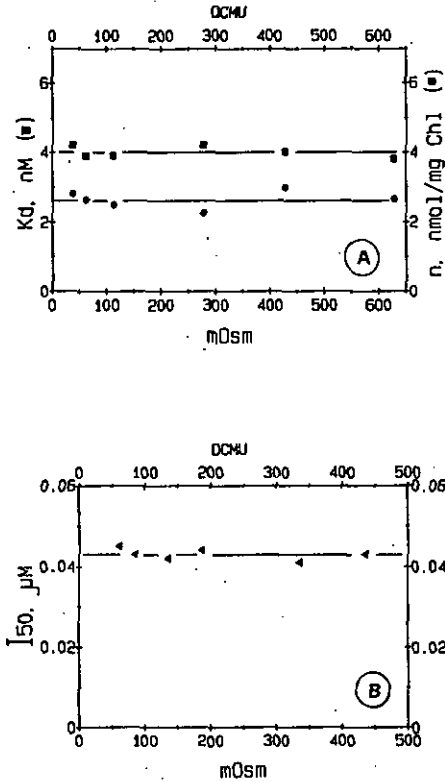


Fig. 17: (A) Valeurs des constantes de dissociation ( $K_d$  [■], nM DCMU) et du nombre de sites de liaison ( $n$  [●], nmol DCMU/mg Chl) dans la glace et à l'obscurité.  
 (B) Valeurs de la demi-inhibition ( $I_{50}$  [◄], μM DCMU) de l'activité  $H_2O \rightarrow FeCn(NH_4Cl)$  à 20 °C.

(A) et (B) sont estimés pour différentes osmolarités (mOsm) du milieu de suspension des membranes thylacoïdales d'Epinaud. L'osmolarité du milieu est augmentée par des concentrations croissantes de sorbitol, alors que sa concentration ionique reste constante.

Noûs avons travaillé dans des conditions ioniques qui favorisent un état accolé des membranes thylacoïdales ( $\geq 2$  mM  $MgCl_2$ ; Barber, 1980), car cet état se rapproche de l'état *in vivo* des thylacoïdes. Cependant, il a été observé que le pouvoir inhibiteur de certains herbicides est plus faible dans des thylacoïdes à l'état désaccolé qu'à l'état accolé (Olsen, 1984). Lors de la détermination des valeurs  $I_{50}$  (Figs 16B et 17B), l'activité contrôlée (sans herbicide) du flux des électrons photosynthétique n'a pas varié significativement en fonction de l'osmolarité du milieu réactionnel: Epinard,  $165 \pm 25$  (Fig 18), Morelle S,  $95 \pm 15$  et Morelle R  $80 \pm 25$   $\mu\text{mol FeCn réduit} \times \text{mg}^{-1} \text{Chl} \times \text{h}^{-1}$ .

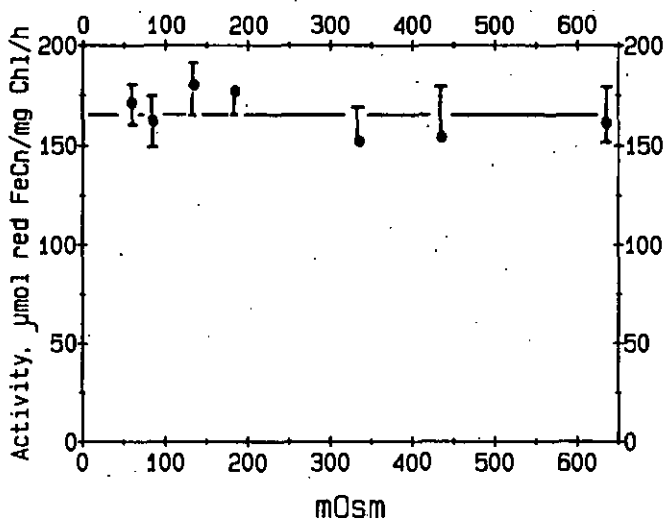


Fig. 18: Activité du flux d'électrons photosynthétique  $H_2O \longrightarrow FeCn$  ( $NH_4Cl$ ) à 20 °C chez des membranes thylacoïdales d'Epinard versus l'osmolarité du milieu réactionnel. Cette dernière est augmentée par des concentrations croissantes de sorbitol, alors que la concentration ionique reste constante. ( $n = 11$ ).

### Cas particulier des Solanacées.

Les changements d'affinité et de pouvoir inhibiteur de l'atrazine ne semblent donc pas être en relation avec une éventuelle augmentation ou diminution de l'activité du flux électronique. Par contre, le flux d'électrons est réduit à zéro aux osmolarités inférieures à 100 mOsm chez les Morelles S et R, ce qui corrobore les travaux de Blumenthal-Goldschmidt & Poljakoff-Mayber (1966), qui observèrent une plus grande fragilité des membranes thylacoïdales de la Tomate (Solanacée) en milieu très hypotonique. Ainsi, une dislocation complète (Dilley *et al.*, 1987; Laasch, 1987) des membranes de Morelles, trop fragiles pour supporter une turgescence élevée, n'est pas à exclure; des basses osmolarités pouvant alors, inhiber la réaction de Hill (Shavit & Avron, 1967) et l'activité du PS I (Lockau, 1979).

### Contraction ou gonflement des thylacoïdes

Nous avons observé par la technique du "light scattering" (LS) à 436 nm, des changements dynamiques de volume des thylacoïdes d'Epinard (résultats non montrés). Le LS augmente de 45 et de 15% pour des thylacoïdes dans un milieu de 35 et de 335 mOsm, respectivement, par rapport à des thylacoïdes en suspension dans un milieu de 635 mOsm. Pourtant, le sens de ces changements de volume ne peut être interprété de manière stricte par cette méthode, car des augmentations de diffusion du LS peuvent apparaître soit quand les thylacoïdes gonflent, soit quand ils se contractent (Packer & Murakami, 1972). Pourtant, l'augmentation du LS lorsque la concentration en sorbitol diminue, suggère, à l'instar de Tolberg & Macey (1965) et Hongladarom & Honda (1966), que les thylacoïdes gonflent en milieu hypotonique et se contractent en milieu hypertonique. Selon Blumenthal-Goldschmidt & Poljakoff-Mayber (1966) les thylacoïdes gonflent aussi bien en milieu hypo- qu' hypertonique.

### Atrazine et DCMU

On observe que l'affinité (Fig. 16A) et le pouvoir inhibiteur (Fig. 16B) de l'atrazine sont plus élevés chez des membranes en conditions hypo- et hypertonique que chez des membranes en milieu isotonique. Ceci suggère que l'accès de l'atrazine à son site d'action est facilité lorsque les membranes sont soumises à un stress osmotique. Selon Dilley *et al.* (1967) et Dilley & Rothstein (1967), on assiste à un amincissement de la bicouche membranaire lorsque les vésicules thylacoïdales sont gonflées ou contractées. Il se pourrait que les augmentations d'affinité et de pouvoir inhibiteur de l'atrazine soient attribuables à une élévation de la pression latérale membranaire suite à cet amincissement de la bicouche membranaire. Un packing membranaire augmenté pouvant induire une compression et pousser hors de la membrane certains polypeptides, voir même des complexes protéiniques et modifier ainsi, leur structure tertiaire et/ou quaternaire. Une modification de cet ordre pourrait altérer la conformation du polypeptide 32 kD et le rendre plus accessible à l'atrazine (Dilley, communications personnelles). Il se peut que certaines protéines se détachent de la membrane lorsque l'on varie la pression osmotique du milieu de suspension. Pourtant, on constate que

le nombre de sites de liaison de l'atrazine reste constant (Fig. 16A) et que l'activité du flux des électrons photosynthétique n'est pas altérée (Fig. 18), ce qui suggère que la composition des membranes thylacoïdales n'est probablement que peu ou pas modifiée pour autant qu'elles supportent le stress osmotique sans se disloquer.

Contrairement à l'atrazine, l'affinité (Fig. 17A) et le pouvoir inhibiteur du DCMU (Fig. 17B) sont insensibles à l'osmolarité du milieu de suspension. Il est pensable que la lipophilicité plus élevée du DCMU (Neumann *et al.*, 1987), sa stéréochimie plus appropriée (Gardner, 1989) et la conformation de son site de liaison moins profondément altérée par le stress osmotique (van Rensen, 1982; Vermaas *et al.*, 1984; Renger *et al.*, 1984), fassent que le DCMU puisse accéder à son site sans aucune restriction due aux tensions latérales. Les différences de comportement entre les deux herbicides, renforcent le concept des sites de liaison différents pour les urées substituées et pour les triazines symétriques, bien que certains d'entre-eux puissent se chevaucher (Trebst, 1980). Il est, par ailleurs, pensable que les sites de liaison respectifs de l'atrazine et du DCMU soient situés à différentes profondeurs dans la bicouche membranaire, le site atrazine étant plus profondément ancré que celui du DCMU.

#### Les lipides

Il est difficile de mettre en évidence un rôle spécifique des lipides dans ce type de stress, puisque l'ensemble de la membrane est soumis soit à un gonflement, soit à un rétrécissement. Néanmoins, les propriétés de liaison et d'inhibition de l'atrazine sont modulées par la pression osmotique à laquelle sont soumises les membranes thylacoïdales. Ceci suggère que des changements de "packing" de la partie lipidique altèrent la conformation des protéines sans en altérer la fonction. Selon Goltsev *et al.* (1987), des concentrations élevées de saccharose stabilisent les membranes thylacoïdales en (i) augmentant leur viscosité, (ii) diminuant la diffusion latérale de certaines protéines, (iii) augmentant l'organisation de la bicouche lipidique. En fait, nous sommes probablement en présence d'un système synergique où le rétrécissement de la membrane induit des modifications des deux parties, protéinique et lipidique.

#### Le pouvoir inhibiteur

Une autre manière de rendre compte du mode d'action d'un herbicide est d'exprimer son pouvoir d'inhibition relativement à l'affinité qu'il a pour son site de liaison ( $K_d/I_{50} \times 10^3$ ,  $K_d$  en nM et  $I_{50}$  en  $\mu$ M). Ce rapport exprime donc l'efficacité relative de l'herbicide (Fig. 19). Ainsi, on constate que l'efficacité relative de l'atrazine est plus élevée (Fig. 19) lorsque le thylacoïde est turgescent et qu'il semble se stabiliser lorsque les thylacoïdes sont en conditions iso- et hypertoniques.

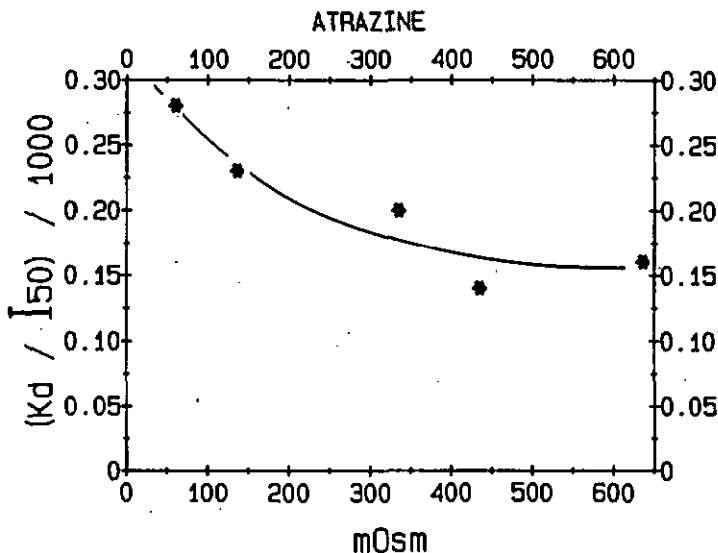


Fig. 19: Efficacité relative de l'atrazine sur des membranes thylacoïdales d'Épinard versus l'osmolarité du milieu. Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles décrites dans la Fig. 18. Pour plus d'information, voir le texte.

### Conclusions

On observe qu'un stress osmotique infligé à des membranes thylacoïdales et plus particulièrement un stress hypotonique, augmente l'affinité et le pouvoir inhibiteur de l'atrazine, dont l'efficacité relative est alors maximale en milieu fortement hypotonique. Le comportement du DCMU ne semble guère être influencé par l'osmolarité du milieu. Ainsi, un changement membranaire de nature plus structurale que fonctionnelle (l'activité du flux d'électrons n'étant pas altérée), affecte le site d'action de l'atrazine mais pas celui du DCMU. Cette observation suggère que les sites de liaison spécifiques des deux herbicides sont localisés à différentes profondeurs dans la bicouche membranaire, celui de l'atrazine étant situé plus profondément que celui du DCMU.

## 4.2.2 Stress thermique

**Principe**

La vitesse des réactions photochimiques de la photosynthèse n'est pas affectée par les changements de température, à moins que des modifications structurales interfèrent avec l'organisation des pigments et des centres réactionnels (CR). Par contre, les étapes enzymatiques et notamment celles de la chaîne de transport d'électrons dans les thylacoïdes et le couplage entre le flux d'électrons et la photophosphorylation sont dépendants de la température (Öquist, 1982). En fait, la photosynthèse se déroule à une température optimale qui semble dépendre de trois facteurs (1) l'augmentation de la vitesse des réactions chimiques en fonction de températures croissantes, (2) l'inactivation des enzymes aux températures élevées et (3) la mobilité des PQ modulée par l'intermédiaire du degré d'insaturation du MGDG (Öquist, 1982). Concernant les hautes températures, les premiers signes d'inhibition de la photosynthèse apparaissent dans le couplage du LHCP avec les CR du PS II (Schreiber & Armond, 1978) et dans le découplage entre le transport d'électrons et la photophosphorylation (Thomas et al., 1986b). Concernant les basses températures, les événements semblent plus complexes. Il a été suggéré par exemple, qu'aux basses températures, une diminution de l'énergie d'activation ( $E_a$ ) de certaines réactions enzymatiques permettrait aux membranes thylacoïdales de maintenir leur capacité photosynthétique (Öquist, 1983).

**L'énergie d'activation**

Pratiquement, l'effet de la température sur la vitesse de réaction peut être exprimée par l'équation d'Arrhenius :

$$d \log V / dT = E_a / 2.3 RT$$

par intégration,

$$\log V = - [(E_a / 2.3R) \times (1/T)] + \text{constante}$$

où :	$E_a$	-	quantité empirique appelée énergie d'activation
	R	-	constante des gaz = $8.31 \text{ J} \times \text{K}^{-1} \times \text{mole}^{-1} = 1.98 \text{ cal} \times \text{K}^{-1} \times \text{mole}^{-1}$
	V	-	vitesse maximale de réaction
	T	-	température absolue

La fonction  $\log V = F(1/T)$  est représentée par une droite de pente  $-E_a / 2.3 \times R$ . Il suffit donc, de déterminer graphiquement la pente de la droite et de multiplier cette valeur par  $2.3 \times 1.98 \text{ cal} \times \text{K}^{-1} \times \text{mole}^{-1} = 4.5 \text{ cal} \times \text{K}^{-1} \times \text{mole}^{-1}$  pour en déduire l'énergie d'activation  $E_a$ .

L'exposition de plantes sensibles au froid ("chilling sensitive plants") à des températures inférieures à 10 °C inhibe la photosynthèse et ceci plus particulièrement à la lumière (Powles, 1984). *In vitro*, le système de photolyse de l'eau des chloroplastes soumis à une température voisine de 0 °C est inhibé (Quinn & Williams, 1985; Misr & Meena, 1986). De plus, il a été observé que le niveau d'inhibition dépend des espèces (Smillie, 1979), de l'âge des feuilles (Kaniuga et al., 1978), des régimes des basses températures (Lyons, 1973) et de la durée du traitement (Smillie, 1979). Shneyour et al. (1973) montrèrent que l' $E_a$  du flux d'électrons photosynthétique  $H_2O \rightarrow NADP'$  en condition couplée augmente d'environ trois fois aux températures inférieures à 12 °C, pour des thylacoïdes isolés de plantes sensibles, comparé à des thylacoïdes de plantes résistantes au froid. Nolan & Smillie (1976 et 1977) observèrent également des changements d' $E_a$  chez des espèces résistantes au froid, lorsque l'activité du flux des électrons est découplée.

#### *Transition de phase des lipides*

Les changements d' $E_a$  de réactions enzymatiques se déroulant dans des membranes ont souvent été associés à des transitions de phase des lipides membranaires. Il a été suggéré que l'état physique des lipides affecte les propriétés des enzymes liés à la membrane de telle façon que leur  $E_a$  augmente lorsque la température descend au-dessous de la température de transition des lipides (Shneyour et al., 1973; Lyons, 1973; Murata et al., 1975; Roughan, 1985; Kenrick & Bishop, 1986; Raison & Orr, 1986a et b; Orr & Raison, 1987 et 1990). Cette dernière observation a été contestée, puisque la proportion de lipides insaturés est si élevée dans les plantes sensibles et les résistantes au froid, qu'une transition de phase de l'ensemble des lipides d'un état liquide-cristallin à un état gel n'apparaît qu'à des températures bien inférieures à 0 °C (Murata & Fork, 1977; Bishop et al., 1979; Quinn & Williams, 1985; voir également la 1<sup>re</sup> Partie). Ainsi, pour expliquer les changements d' $E_a$  du transport d'électrons dans les thylacoïdes des espèces sensibles et résistantes au froid, il faut prendre en considération l'existence de domaines de lipides mineurs mais hautement spécifiques, dont la transition de phase s'opère à des  $T > 0$  °C et qui affectent la conformation des protéines (Wolfe, 1978).

#### Pratique

Dans cette approche, il s'agit de déterminer: 1) l' $E_a$  à partir de la représentation d'Arrhenius pour le transport d'électrons total non cyclique; 2) le pouvoir inhibiteur de l'atrazine et du DCMU en fonction de la température et 3) l'affinité et le nombre de sites de liaison des deux herbicides sur des membranes thylacoïdales d'Epinard, de Morelles S et R soumis à des températures croissantes.

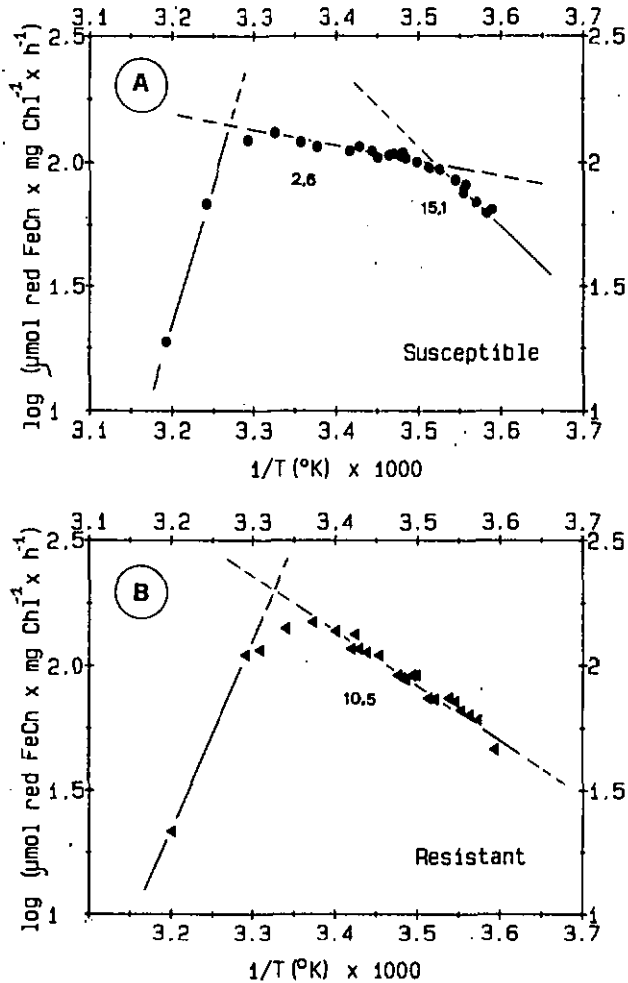


Fig. 20: Représentations d'Arrhenius du flux d'électrons  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{FeCn}$  ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) chez la Morelle sensible (A) et résistante (B). Les chiffres placés sous les différents segments représentent l'énergie d'activation ( $E_a$ ), exprimée en kcal/mol. Pour chaque valeur reportée, l'activité a été corrigée en fonction de la baisse d'activité du transport des électrons due au vieillissement. Ces deux graphes sont ceux d'expériences typiques qui ont été répétées trois fois pour chaque biotype. La variation standard est de  $\pm 1$  kcal/mol pour le biotype sensible et de  $\pm 2$  kcal/mol pour le résistant.

### L'énergie d'activation

La relation entre l'activité  $H_2O \longrightarrow FeCn(NH_4Cl)$  chez les Morelles S et R et la température, sous forme de représentation d'Arrhenius est décrite dans la Fig. 20. On constate qu'une rupture de linéarité ("break point") apparaît vers 12 °C pour la Morelle S (Fig. 20A). Aux températures inférieures à 12 °C, l' $E_a$  est de 15.1 et aux températures supérieures, de 2.6 kcal/mol. La température optimale pour cette activité photosynthétique chez la Morelle S est voisine de 30 °C; au-delà de cette température, l'activité du flux total découplé diminue rapidement. Dans la littérature, une température voisine de 12 °C a souvent été mentionnée comme étant la valeur critique au-dessous de laquelle les fonctions du chloroplaste et de la mitochondrie des plantes sensibles au froid subissent des dommages (Lyons, 1973; Shneyour et al., 1973; Öquist, 1983; Powles, 1984; Quinn & Williams, 1985).

#### "Break-point"

La température critique située à environ 12 °C a été associée à une augmentation de la saturation des acides gras chez les plantes sensibles au froid, par rapport aux résistantes (Nolan & Smillie, 1976 et 1977), à une altération de la structure membranaire (Raison & Orr, 1986a), à une inhibition de l'étape de réoxydation de  $Q_A$  (Scoufflaire et al., 1985; Mavaux, 1987), à une augmentation des centres PS II<sub>B</sub> au détriment des centres PS II<sub>A</sub> (Sundby et al., 1986; Maenpää, 1988), ou encore à des changements individuels de configuration des complexes protéiniques membranaires ou de leur lipides associés (Miller et al., 1988). Cependant, des "ruptures" dans la représentation d'Arrhenius pour des activités photosynthétiques découplées de plantes résistantes au froid (Nolan & Smillie, 1976, 1977; Williams & Quinn, 1987) ont aussi été signalées mais beaucoup moins fréquemment que pour des plantes sensibles. Notons qu'un changement d' $E_a$  n'a pas non plus été systématiquement observé chez ces dernières (Öquist & Hellgren, 1976). Par ailleurs, il semblerait que de tels dommages n'apparaissent que lorsque les plantes sont exposées à la lumière (Powles, 1984; Misr & Meena, 1986).

#### Biotypes sensible et résistant

A partir des représentations d'Arrhenius (Fig. 20), nous avons déterminé une  $E_a$  constante de  $8 \pm 2$  kcal/mol entre 6 et 25 °C pour l'activité  $H_2O \longrightarrow FeCn(NH_4Cl)$  chez le biotype R. Cette activité est, par rapport au biotype S (Fig. 20) : i) moins dépendante de la température quand  $T < 12$  °C, ii) plus dépendante de la température quand  $T > 12$  °C; iii) ralentie à 25 °C alors que chez le biotype S elle ne diminue que lorsque  $T > 30$  °C. Darmency & Casquez (1982), ayant déterminé des  $E_a$  de 14 et 3.6 kcal/mol en mesurant le dégagement d'oxygène en présence de FeCn et de  $NH_4Cl$  chez *Polygonum lapathifolium* S et R, respectivement, concluent que leur biotype R pourrait avoir les caractéristiques d'une plante résistante au froid. Chez le Chénopode blanc, Jansen et al. (1986) observent des  $E_a$  de 7.7 et de 11.6 kcal/mol pour S et R, respectivement. Dans le cas de *S. nigrum* S et R, les choses ne semblent pas aussi bien définies. Le biotype R de la Morelle se comporte effectivement comme une

plante résistante au froid lorsque  $T < 12^{\circ}\text{C}$ , comparé à la Morelle S. Par contre, lorsque  $T > 12^{\circ}\text{C}$ , l'inverse se produit. De plus, nous avons toujours observé chez R une chute de l'activité du transport d'électrons à une température inférieure (env.  $5^{\circ}\text{C}$ ) que celle observée chez S. Cette dernière propriété a déjà été mise en évidence chez les biotypes R de la Morelle (Ducruet & Ort, 1988) et du Sénéçon vulgaire (Havaux, 1989). En comparant l' $E_a$  de l'activité  $\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{FeCn}(\text{NH}_4\text{Cl})$  chez l'Epinard, plante résistante au froid, on observe une valeur constante de 6.0 kcal/mol entre 4 et  $30^{\circ}\text{C}$  (résultat non montré). Ainsi, le comportement du biotype R vis-à-vis de la température se rapproche de celui de l'Epinard bien que plus dépendant de la température entre 4 et  $25^{\circ}\text{C}$  et plus sensible aux températures plus élevées. Cette sensibilité thermique accrue chez les mutants R a été attribuée, soit à une plus grande fragilité du système de photolyse de l'eau (Lemoine *et al.*, 1983), soit à l'altération d'une partie des PS II ou à l'accumulation de  $\text{Q}_x$  réduit (Ducruet & Lemoine, 1985; Ducruet & Ort, 1988; Havaux, 1989).

#### *Flux d'électrons couplé, découplé ou basal*

Il apparaît que la réponse des biotypes vis-à-vis de la température dépend : 1) du type d'activité mesurée (dégagement d' $\text{O}_2$ , fixation du  $\text{CO}_2$ , photophosphorylation, fluorescence, etc...), 2) du type d'accepteur final d'électrons utilisé et 3) de la présence d'un découplant du transport d'électrons. En effet, Shneyour *et al.* (1973) observèrent des discontinuités dans les représentations d'Arrhenius lors de la photoréduction du NADP' mais pas du Diquat. Par contre, Nolan (1988) observa des interruptions dans les représentations d'Arrhenius aussi bien en utilisant le FeCn (hydrosoluble) ou le DAD (lipophile) comme accepteur final d'électrons chez des membranes thylacoïdales de Pois fixées ou non par le glutaraldéhyde. L'utilisation de DCPIP, de MV ou de FeCn a permis à Lemoine *et al.* (1983), de mettre en évidence une sensibilité thermique accrue des plastes R chez la Navette, mais à des seuils de sensibilité différents selon le type d'accepteur final d'électrons. Par contre, en absence de FeCn, Ducruet & Lemoine (1985) n'observèrent pas de diminution de dégagement d' $\text{D}_2$  chez R entre 20 et  $30^{\circ}\text{C}$ . Nous avons déterminé l' $E_a$  pour le flux d'électrons  $\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{MV}$  (basal) chez l'Epinard (résultat non montré) et avons trouvé une valeur de 5.5 kcal/mol, constante entre 4 et  $30^{\circ}\text{C}$ . Cette  $E_a$  se rapproche beaucoup de la valeur de 6.0 kcal/mol, déterminée également entre 4 et  $30^{\circ}\text{C}$  pour le flux d'électrons  $\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{FeCn}$  découplé. Pourtant, Nolan et Smillie (1977) observèrent une chute de l'activité du transport d'électrons à des températures systématiquement plus basses pour un flux découplé que pour un flux basal. Il apparaît donc que les résultats se contredisent selon les conditions choisies et entre auteurs. Pourtant, il semble que nos résultats corroborent davantage les travaux d'Horváth *et al.* (1986), qui suggèrent que les discontinuités rencontrées dans les présentations d'Arrhenius, reflètent plutôt des processus liés au transport d'électrons, qu'un phénomène de couplage du flux des électrons avec la photophosphorylation.

### Considérations générales

Les résultats exposés dans la 3<sup>ème</sup> Partie (composition lipidique, DBI, rapport lipides/protéines, asymétrie des galactolipides et stimulation de la fluorescence par les cations), suggèrent que les membranes thylacoïdales du biotype R sont plus fluides que celles du biotype S. Reprenant l'idée de Darmency & Gasquez (1982), qui suggèrent que les biotypes R s'apparentent aux espèces résistantes au froid, nous constatons, effectivement, que plusieurs analogies peuvent être mises en évidence: i) moins d'acide hexadéca-(3*trans*)-énoïque et d'acide palmitique dans le PG du biotype R que du S (3<sup>ème</sup> Partie § 4.2 et Murata *et al.*, 1982; Murata, 1983) et ii) un rapport lipides/protéines plus grand chez le biotype R que chez le biotype S (3<sup>ème</sup> Partie § 4.2 et Chapman *et al.*, 1983a et b). Ainsi, à l'instar de plusieurs auteurs, nous pensons que les ruptures de linéarité rencontrées dans les représentations d'Arrhenius sont associées à une transition de certains lipides spécifiques et étroitement associés aux complexes protéiniques (Lyons, 1973; Shneyour *et al.*, 1973; Murata *et al.*, 1975; Raison & Wright, 1983; Powles, 1984; Caldwell, 1987; Orr & Raison, 1987 et 1990; Baracca *et al.*, 1989). Il n'est pas impensable que les différentes techniques (calorimétrie différentielle, polarisation de la fluorescence, mesure de diverses activités du transport d'électrons, etc...) ou encore que les conditions utilisées (température de culture des plantes, type d'accepteurs d'électrons, etc...), révèlent des paramètres membranaires différents (Yamamoto & Ke, 1979; Miller *et al.*, 1988), ce qui pourrait expliquer le fait que les résultats rencontrés dans la littérature soient parfois contradictoires.

### Implications biologiques

Il semble que le paramètre de fluidité membranaire soit un facteur important dans la régulation des activités photosynthétiques des plantes résistantes à l'atrazine et résistantes au froid. Nous avons donc cherché à comprendre quelles étaient les implications de telles adaptations. A l'heure actuelle, les espèces qui présentent une résistance à l'atrazine appartiennent toutes au groupe des annuelles (Montegut, 1984), poussant préférentiellement pendant la période chaude de l'année. Or, ces biotypes semblent être moins adaptées ("fits") (voir 2<sup>ème</sup> Partie), ce qui peut être attribué, au moins partiellement, à leur sensibilité thermique au froid accrue. Mais il ne faut pas non plus perdre de vue, que ces biotypes apparaissent au moment de l'année où la pression due à l'atrazine est la plus forte. Toutefois, il est envisageable qu'à certaines latitudes les biotypes R possèdent un avantage phénologique par rapport aux biotypes S. Ainsi, lors de la culture de la Morelle, plante cosmopolite située entre les latitudes 54 °N et 45 °S, nous avons observé qu'en culture à basse température, les biotypes R croissaient, alors que les S ne se développaient pas (résultats non montrés).

## "Inhibition - stimulation" (atrazine)

Nous avons mesuré l'activité  $H_2O \rightarrow MV$  (basal) à différentes températures avant et après l'addition d'une dose sub létale d'atrazine ( $0.06 \mu M$ ) à des membranes thylacoïdales d'Epinaré (Fig. 21). On constate qu'aux basses températures ( $\leq 12^\circ C$ ), l'herbicide stimule l'activité. Par contre, aux températures supérieures à  $12^\circ C$ , l'activité est inhibée proportionnellement à l'augmentation de la température et devient nulle vers  $40^\circ C$ . Il est envisageable qu'aux températures inférieures à  $12^\circ C$ , certains microdomaines des membranes thylacoïdales soient dans un état gel et que l'herbicide fluidifie ces régions membranaires. Il se peut aussi qu'aux basses températures, une dose sub létale d'herbicide découple le flux des électrons et donc stimule ce dernier (Fig. 4). Dans les deux cas, il apparaît que l'action de l'herbicide est dépendante de la température.

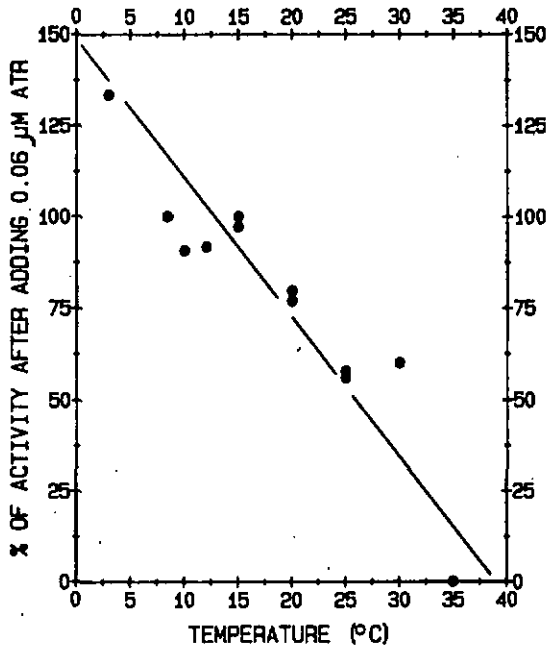


Fig. 21: Activité du dégagement d'oxygène (% de l'activité sans herbicide) de membranes thylacoïdales d'Epinaré en présence de méthylviologène (MV) et en condition basale, après l'addition de  $0.06 \mu M$  d'atrazine. A  $20^\circ C$  l'activité contrôle est de  $116 \mu mol$  d' $O_2$  dégagé  $\times mg$  Chl $^{-1}$   $\times h^{-1}$ .

La Fig. 22 présente des courbes d'inhibition de l'activité  $\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{FeCn} (\text{NH}_4\text{Cl})$  à deux températures différentes (9 et 30 °C) pour des membranes thylacoïdales d'Épinard. On constate que la forme des courbes est quelque peu différente: plus "sigmoïdale" aux basses températures qu'aux températures élevées. Ceci rend compte simultanément de la diminution du pouvoir inhibiteur de l'atrazine ( $I_{50}$  augmente) et de "l'effet de concentration" imposé par cet herbicide (voir § 4.1.1). Il semblerait que ce type de réponse soit en relation directe avec la lipophilicité de la molécule. En effet, selon Nishimura *et al.* (1975), la représentation de l'inhibition d'une activité par une substance quelconque versus la concentration de cette substance, qui montre une courbe d'inhibition "très sigmoïdale" est associée à une nature peu lipophile de la molécule, alors qu'une courbe plus linéaire est associée à une molécule de nature plus lipophile. Ceci suggère qu'à basse température, l'herbicide, en faible concentration, montre quelques difficultés à pénétrer la membrane jusqu'à son site d'action. Une fois dépassé un certain seuil de concentration, l'herbicide exerce une "pression" suffisante pour inhiber rapidement le flux d'électrons. Nous avons observé ce phénomène chez l'Épinard et la Morelle S pour l'atrazine et le DCMU.

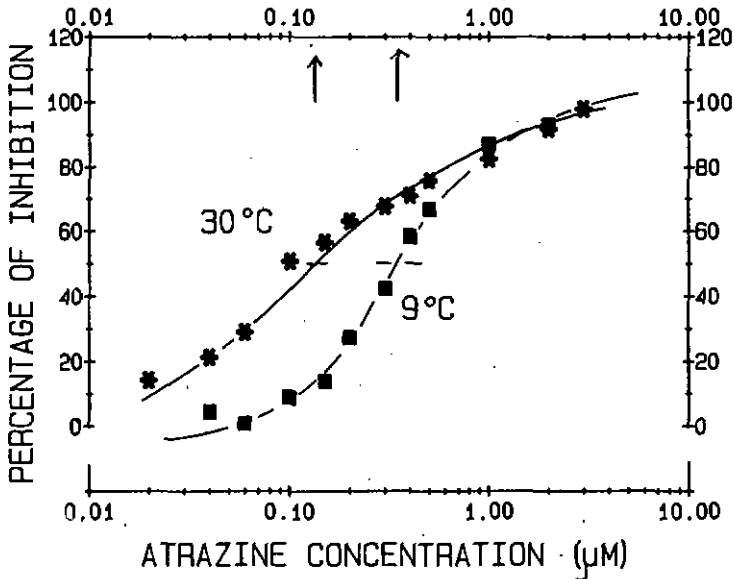


Fig. 22: Courbes d'inhibition de l'activité du transport des électrons  $\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{FeCn} (\text{NH}_4\text{Cl})$  par l'atrazine, à différentes températures, chez l'Épinard. Les valeurs  $I_{50}$  sont de 0.35 et 0.12  $\mu\text{M}$  à 9 (■) et 30 °C (\*), respectivement. Les activités avant l'inhibition sont de 133 et 243  $\mu\text{mol FeCn}$  réduit  $\times \text{mg}^{-1} \times \text{h}^{-1}$  à 9 et 30°C, respectivement.

La Fig. 23 présente les valeurs  $I_{50}$  de l'atrazine pour l'activité  $H_2O \rightarrow FeCn (NH_4Cl)$  chez *S. oleracea* et *S. nigrum* S versus la température. Dans ce type d'expériences, les deux plantes ont été cultivées et les membranes thylacoïdales isolées dans des conditions proches. Les thylacoïdes sont conservés à 4°C et les activités de transport d'électrons sont mesurées dans la cuvette du spectrophotomètre dont on peut faire varier la température. On constate que le pouvoir inhibiteur de l'atrazine diminue drastiquement aux basses températures, et notamment à  $T < 12^\circ C$ .

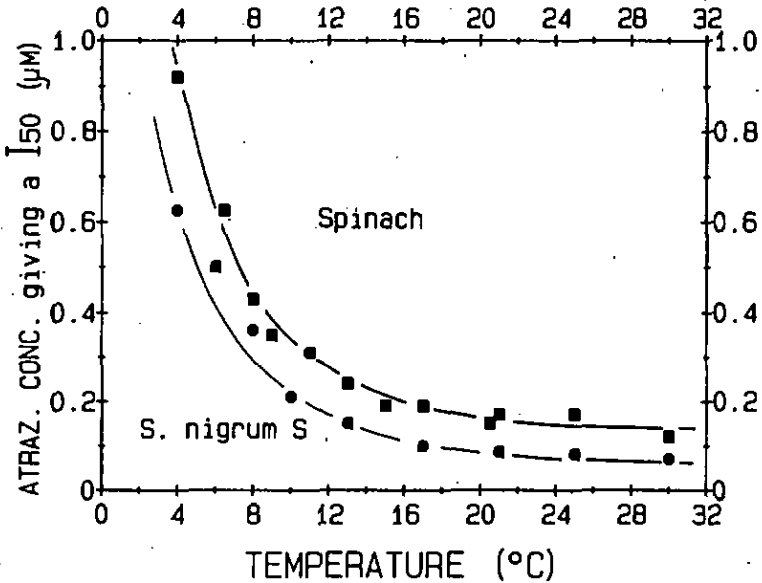


Fig. 23: Valeurs de demi-inhibition ( $I_{50}$ ) du flux d'électrons  $H_2O \rightarrow FeCn (NH_4Cl)$  par l'atrazine en fonction de la température d'incubation des membranes thylacoïdales d'Epinard (■) et de Morelle sensible à l'atrazine (●).

Par contre, le pouvoir inhibiteur de l'atrazine chez le biotype R (Fig. 24) semble être indépendant de la température (entre 4 et 20 °C). Cette dernière observation suggère que l'atrazine inhibe le flux des électrons chez le biotype S par un autre processus que chez le biotype R. L'effet de concentration est plus prononcé chez le biotype R, où l'atrazine agirait par saturation des différentes structures chloroplastiques (Fig. 6), désorganisant ainsi les membranes (Horvath et al., 1984). Il se peut aussi qu'en concentration élevée, l'atrazine bloque le transport d'électrons en se fixant sur le côté oxydant du PS II, à l'instar du DCMU (Renger, 1973; Etienne, 1974; Delrieu, 1981; Hsu et al., 1986; Vasil'ev et al., 1988).

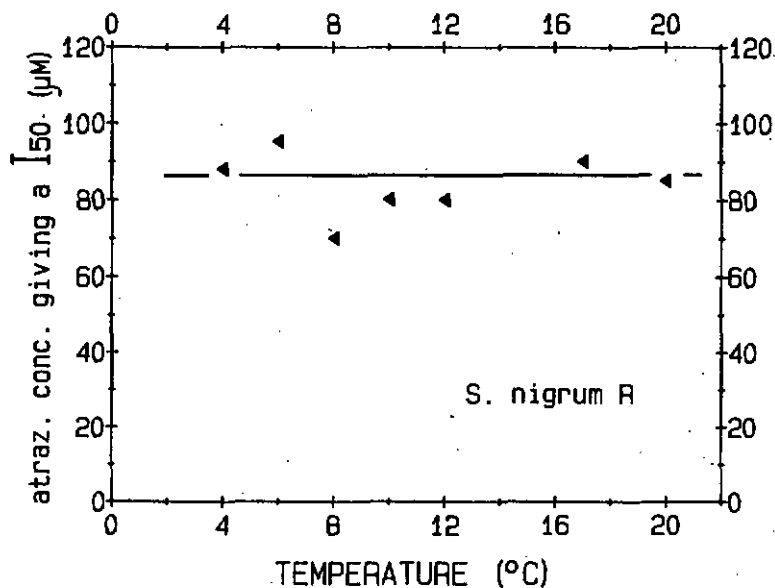


Fig. 24: *Idem* que pour la Fig. 23 mais pour la Morelle résistante à l'atrazine (◄).

## Liaison (atrazine)

Contrairement à ce qui se passe pour le pouvoir inhibiteur, on observe une diminution de l'affinité lorsque la température croît (Fig. 25) et ceci, de manière linéaire entre 0 et 30 °C. Lorsque la température augmente cette diminution d'affinité est probablement associée à un affaiblissement des forces de liaison hydrogène et/ou de van der Waals entre le polypeptide 32 kD et la molécule d'herbicide. Au-delà de 30 °C, l'affinité diminue très brusquement, ce qui suggère que certains centres PS II peuvent être altérés. Or, Sundby *et al.* (1986) observèrent une conversion des PS II<sub>a</sub> en PS II<sub>b</sub> lorsque la température augmente. Cette hétérogénéité des PS II a depuis longtemps été mis en évidence (Mellis, 1978) et il est apparu que les herbicides se lient avec une affinité beaucoup plus faible (Schreiber & Pfister, 1982; Drechsler & Neumann, 1989) ou même pas du tout (Wettern, 1986) sur les PS II<sub>b</sub>. De plus, dans nos conditions expérimentales, le pouvoir inhibiteur des herbicides est mesuré en condition de lumière saturante, alors que leur affinité est déterminée à l'obscurité. Il se pourrait donc, qu'à basse température et à la lumière, l'affinité des herbicides diminue brusquement, puisque nous avons noté que l'affinité des herbicides est plus faible à la lumière qu'à l'obscurité (Fig. 14). Nous proposons que des mesures de "binding" à différentes intensités lumineuses et en fonction de la température soient conduites dans le futur.

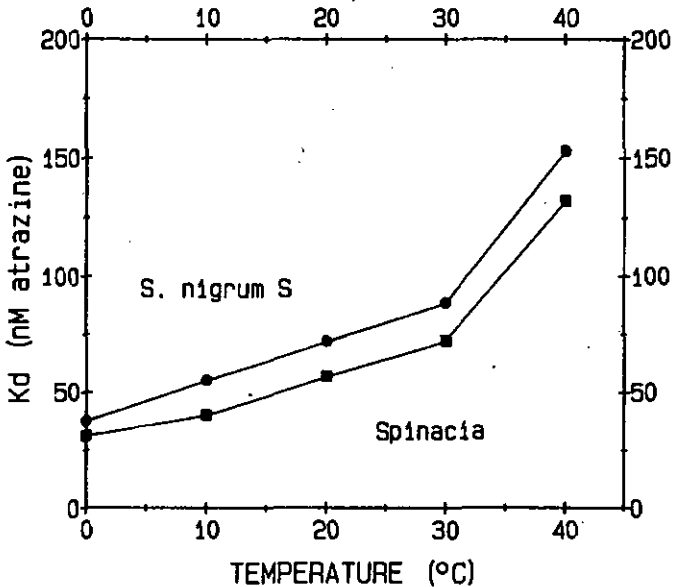


Fig. 25: Constantes de dissociation (nM) de l'atrazine pour des membranes chylacoïdales d'Epinaud (■) et de Morelle S (●) incubées à différentes températures.

## "Inhibition et liaison" (DCMU)

La Fig. 26 présente les valeurs  $I_{50}$  du DCMU pour l'activité  $H_2O \rightarrow FeCn (NH_4Cl)$ . On constate que cet herbicide développe un pouvoir inhibiteur croissant chez l'Epinard et la Morelle S, lorsque la température croît. Par contre, chez le biotype R, la température ne semble pas affecter le pouvoir inhibiteur du DCMU. La Fig. 27 présente les variations d'affinité du DCMU sur des membranes thylacoïdales d'Epinard, de Morelles S et R incubées à différentes températures. A l'instar de l'affinité de l'atrazine pour son site de liaison, celle du DCMU diminue lorsque la température augmente. Pour l'Epinard, cette baisse d'affinité est faible jusqu'à une température de 40°C mais augmente brusquement au-delà de 40°C. Chez la Morelle S, il n'y a pas non plus de grands changements, bien qu'elle semble montrer une plus grande sensibilité thermique entre 20 et 40°C que l'Epinard. Par contre, chez la Morelle R, le DCMU montre une forte baisse d'affinité aux températures supérieures à 30°C. Outre les différences interspécifiques, nous n'avons pour l'heure aucune explication satisfaisante à proposer pour expliquer l'affinité plus faible des herbicides pour les membranes thylacoïdales de *S. nigrum* que pour celles de *Spinacia*.

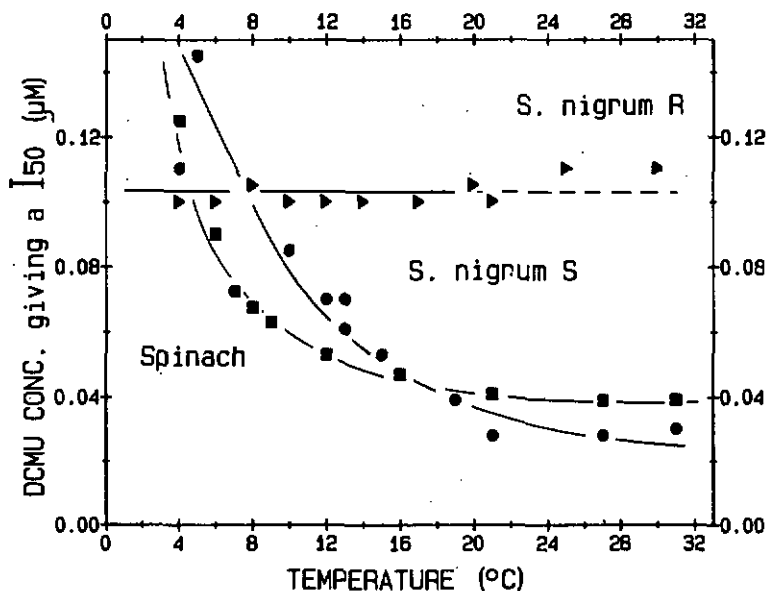


Fig. 26: Valeurs de demi-inhibition ( $I_{50}$ ) du flux d'électrons  $H_2O \rightarrow FeCn (NH_4Cl)$  par le DCMU en fonction de la température d'incubation des membranes thylacoïdales d'Epinard (■) et de Morelle sensible (●) ou résistante à l'atrazine (▲).

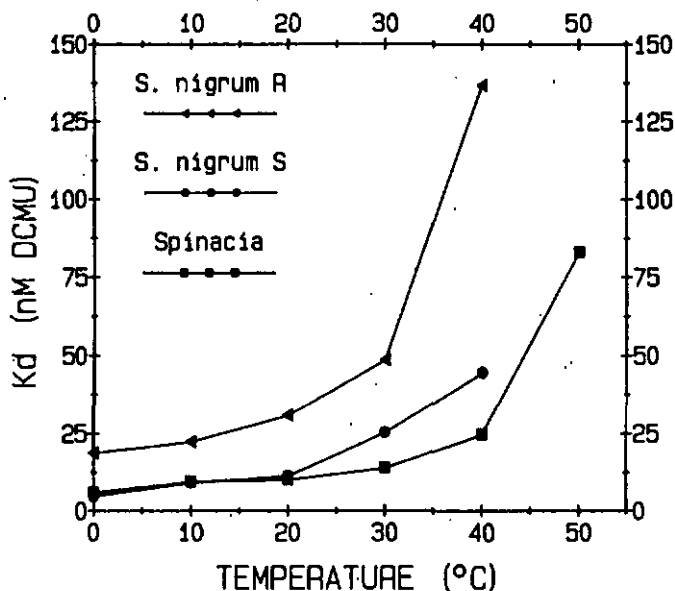


Fig. 27: Constantes de dissociation (nM) du DCMU pour des membranes thylacoïdales d'Épinard (■), de Morelle sensible (●) et résistante (▲) incubées à différentes températures.

#### Nombre de sites de liaison (atrazine & DCMU)

Le Tab.V présente le nombre de sites  $n$  (nmol herbicide/mg Chl) pour l'atrazine et le DCMU en fonction de la température d'incubation des membranes thylacoïdales d'Épinard, de Morelle S et R. On constate, que le nombre de sites de liaison des herbicides varie faiblement entre 0 et 30 °C. Par contre, aux températures supérieures, les valeurs  $n$  diminuent sensiblement (à 40 °C pour l'atrazine,  $n$  diminue d'env. 50% et pour le DCMU, d'env. 30% à 40 °C. et plus de 70% à 50 °C). Il semble donc apparaître deux phénomènes distincts: (1) aux températures décroissantes à partir de 30 °C, l'affinité des herbicides augmente légèrement, bien que le nombre de sites de liaison reste stable; (2) aux températures supérieures à 30 °C, on assiste à une forte diminution du nombre de sites de liaison et parallèlement à une forte diminution de l'affinité des herbicides pour leur site de liaison spécifique.

ATRAZINE	TEMPERATURE (°C)					
	0	10	20	30	40	50
Spinach	2.1	2.4	2.5	3.2	1.0	---
<i>S. nigrum</i> S	2.4	2.5	2.6	2.0	1.3	---
DCMU						
Spinach	2.1	2.3	2.2	1.9	1.6	0.6
<i>S. nigrum</i> S	2.9	2.6	2.3	2.5	1.7	---
<i>S. nigrum</i> R	2.1	2.0	2.2	1.9	1.4	---

Tab V: Nombre de sites de liaison de l'atrazine et du DCMU (nmol herbicide/mg Chl) chez l'Épinard, les Morelles sensible (S) et résistante (R) à l'atrazine en fonction de la température.

Le fait que le nombre de sites de liaison ne diminue pas significativement entre 0 et 30 °C, suggère que la structure membranaire n'est pas endommagée à ces températures. Cependant, le mode d'action des herbicides diffère en fonction de la température. Les "Scatchard plots" de la Fig. 28 sont à cet égard représentatifs, puisqu'on observe une disparition progressive de la phase de coopérativité positive lorsque la température augmente (pour l'atrazine, il en va de même, résultats non montrés). Selon Barber et al. (1984), lorsque la température baisse, la viscosité des thylacoïdes augmente. Il se pourrait donc, que l'on assiste à une fluidification progressive de la partie lipidique des membranes thylacoïdales induite par les herbicides. C'est-à-dire que les premières molécules d'herbicide touchant la membrane favoriseraient l'accès et la liaison des molécules suivantes sur leur site de liaison, par un effet de fluidification. Nous avons suggéré dans la 1<sup>re</sup> Partie de ce travail, que les herbicides fluidifient les membranes. Il est donc légitime de penser qu'à basse température, certains domaines de la membrane sont dans un état "gel" (Havaux & Lannoye, 1983), état qui disparaît soit lorsque la température augmente, soit lorsque l'on ajoute des agents fluidifiants comme de l'alcool benzylique (voir § 4.2.3) ou des herbicides.

Aux températures supérieures à 30 °C, lorsque le nombre de sites de liaison diminue significativement, on assiste vraisemblablement à une désorganisation des structures membranaires qui se manifeste entre autre par: une séparation des LHCP II des CR des PS II (Schreiber & Armond, 1978; Gounaris et al., 1983a et 1984; Coltsev et al., 1987), un désaccouplement des saccules, (Gounaris et al., 1983a; Thomas et al., 1986b) et par une forte destabilisation des interactions lipides-protéines induite par une séparation de phase du MGDG (Gounaris et al., 1983b). La diminution de la pression latérale membranaire aux températures voisines de 40-45 °C, semble induire la formation de structures hexagonales inversées chez le MGDG (Gounaris et al., 1983 et 1984). Un découplage entre le transport d'électrons et la photophosphorylation a également été observé à ces températures (Stidham et al., 1982; Thomas et al., 1986a; Harding et al., 1990).

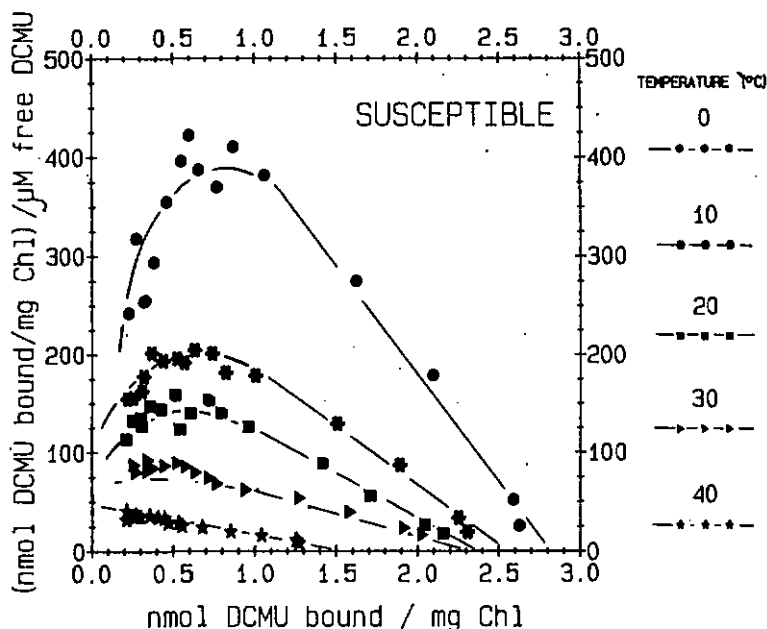


Fig. 28: Représentations de Scatchard de la liaison du DCMU, sur des membranes thylacoïdales de *S. nigrum* sensible à l'atrazine à différentes températures.

#### Considérations générales

Nous avons rencontré dans ce § 4.2.2, deux stress différents: un stress, dû au froid ( $T \leq 12$  °C) et un stress dû à la chaleur ( $T > 30$  °C).

- 1) Les représentations d'Arrhenius pour l'activité du flux d'électrons  $H_2O \longrightarrow FeCn(NH_4Cl)$  ont permis de mettre en évidence chez la Morelle S une discontinuité à 12 °C, que nous avons associée à une transition de phase de lipides spécifiques (Shneyour *et al.*, 1973; Lyons, 1973; Murata *et al.*, 1975; Roughan, 1985; Kenrick & Bishop, 1986; Raison & Orr, 1986a et b; Orr & Raison, 1987 et 1990), situés vraisemblablement dans des microdomaines (Wolfe, 1978). Par contre, ni chez l'Épinard, ni chez la Morelle R nous n'avons trouvé de changement d' $E_a$  entre 0 °C et leur température optimale d'activité de transfert d'électrons respective. Il a été suggéré qu'une courbe, plutôt qu'une droite, représenterait mieux les valeurs du log de l'activité versus l'inverse de la température en °K selon Arrhenius (Wolfe, 1979; Bishop & Kenrick, 1979).

Si cette suggestion se vérifie, on pourra alors réfuter l'existence des transitions de phase des lipides thylacoïdaux (Murata & Fork, 1977; Bishop *et al.*, 1979; Quinn & Williams, 1985) mais les données dont nous disposons présentement, ne nous permettent pas de trancher. Les  $E_a$  différentes entre l'Épinard (plante résistante au froid) et la Morelle (plante sensible au froid), ainsi que leurs différentes températures optimales pour le flux d'électrons, suggère que le biotype R se comporte comme une plante résistante au froid (Darnency & Gasquez, 1982), mais qui a développé une plus grande sensibilité thermique aux températures élevées (Lemoine *et al.*, 1983; Ducruet & Lemoine, 1985; Ducruet & Ort, 1988; Havaux, 1989). A basse température, le pouvoir inhibiteur des herbicides diminue mais leur affinité augmente, ce qui a suggéré que ces deux paramètres ne sont pas systématiquement interdépendants, mais qu'à basse température (< 30 °C) des centres PS II (PS II<sub>f</sub>) fonctionnels (Sundby *et al.* 1986) mais ayant perdus toute ou partie de leur capacité de lier les herbicides (Schreiber & Pfister, 1982; Drechsler & Neumann, 1989; Wettren, 1986) avaient été formés au détriment de centres PS II fonctionnels et liant les herbicides (PS II<sub>g</sub>). En considérant le paramètre de l'efficacité relative des herbicides, celui-ci augmente lorsque la température croît (Fig. 29). Cette dernière figure met en évidence que le pouvoir inhibiteur est primordial lors de la détermination de l'efficacité relative d'un herbicide et que le mode d'action de l'atrazine et du DCMU semble être modulé différemment par la température, puisque les courbes ont une physionomie différente (comparer les Figs 29A et B). Le pouvoir inhibiteur des deux herbicides est indépendant de la température entre 0 et 25 °C sur des membranes thylacoïdales du biotype R. Ceci suggère que l'atrazine inhibe le flux électronique via un effet de concentration ( $I_{50} \approx 85 \mu\text{M}$ ), désorganisant les structures thylacoïdales. Le site d'action du DCMU est également altéré chez le biotype R. Cette altération peut toucher la conformation du polypeptide 32 kD, ainsi que la partie lipidique, comme nous l'avons observé (voir 3<sup>ème</sup> Partie). Les thylacoïdes R, plus fluides que les S, peuvent lier le DCMU de manière moins dépendante de la température que ces derniers.

- 2) Le stress dû à la chaleur se manifeste à des températures supérieures à 30 °C. A ces températures, on observe une forte baisse de l'affinité et du nombre de sites de liaison des herbicides. Il semble que les températures comprises entre 30 et 40 °C soient préjudiciables au bon fonctionnement de l'appareil photosynthétique et à l'intégrité structurale des membranes thylacoïdales. A ces températures, on assiste à une déstabilisation des interactions lipides-protéines, induite principalement par une séparation de phase du MGDG (Gounaris *et al.*, 1983b).

L'action fluidifiante des herbicides, formulée dans la 1<sup>ère</sup> Partie, semble se confirmer. En effet, lorsque la température diminue, la fluidité membranaire diminue également et des concentrations croissantes d'herbicides semblent être nécessaires pour atteindre le "pool" de sites de liaison spécifiques des herbicides. Cette hypothèse tient compte de la phase de coopérativité positive qui disparaît lorsque la température s'élève.

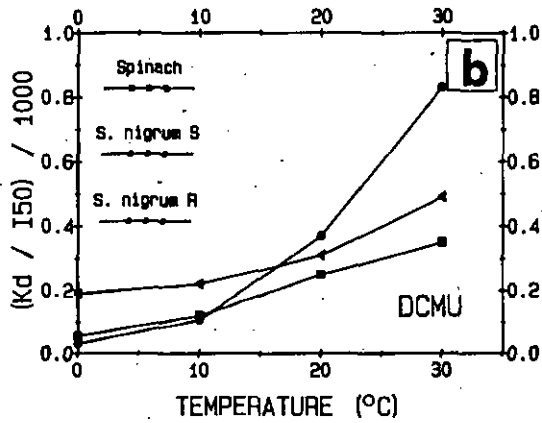
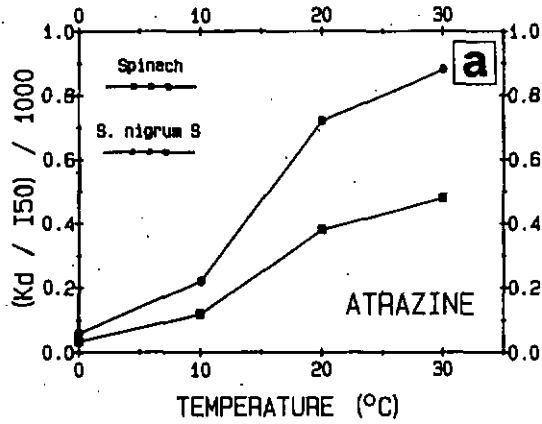


Fig. 29: Efficacité relative de l'atrazine (A) et du DCMU (B) sur des membranes thylacoïdales d'Épinard (■), de Morelle sensible (•) et résistante à l'atrazine (◄) versus la température du milieu de suspension.

O'un point de vue lipidique, le stress thermique est un stress plus spécifique que le stress osmotique, en ce sens que les températures  $\leq 12$  °C ("chilling temperatures") semblent être associées à une modification de la partie lipidique, particulièrement chez les plantes sensibles au froid (Shneyour *et al.*, 1973; Lyons, 1973, Murata *et al.*, 1975; Roughan, 1985; Kenrick & Bishop, 1986; Raison & Orr, 1986a et b; Orr & Raison, 1987 et 1990). Aux températures supérieures à 40 °C, la partie lipidique est également altérée (Gounaris *et al.*, 1983a,b et 1984). Par ailleurs, on a observé une instabilité plus grande vis-à-vis des températures élevées chez les biotypes R que chez les biotypes S (Lemoine *et al.*, 1983; Ducruet & Lemoine, 1985; Jansen *et al.*, 1986; Ricrocch *et al.*, 1987; Ducruet & Ort, 1988; Havaux, 1989). Il se peut donc que le phénomène de la résistance chloroplastique à l'atrazine soit en relation avec un/des phénomène/s d'ordre thermique mais qui reste/nt encore à être mieux définis.

#### 4.2.3 Stress chimique

##### Principe

Une technique couramment utilisée pour moduler les propriétés structurales des membranes artificielles (voir 1<sup>re</sup> Partie) et biologiques, consiste à les enrichir avec différents agents. Les agents les plus étudiés sont des: acides gras, lipides, stérols et protéines.

Un enrichissement des thylacoïdes en acides gras provoque des effets similaires à ceux du vieillissement *in vitro* accéléré des structures membranaires et altère, entre autre, les activités du flux électronique photosynthétique (Mvé Akamba & Siegenthaler, 1980; Henry *et al.*, 1982; Warden & Csatorday, 1987).

Un enrichissement des thylacoïdes en lipides, protéines et/ou stérols modifie le rapport lipides/protéines et semble moduler la fluidité membranaire, une valeur élevée de ce rapport étant associée à une membrane fluide, selon le concept de Ford & Barber (1983a).

L'addition de lipides aux membranes thylacoïdales a été possible via l'utilisation de liposomes d'espèces diverses de lipides naturels et/ou artificiels (Siegel *et al.*, 1981; Rochester & Andersson, 1986). Ce type d'enrichissement provoque une réorganisation structurale des thylacoïdes et une inhibition du flux d'électrons. Par ailleurs, Millner *et al.* (1983) observent que l'activité  $H_2O \longrightarrow MV$  (découplé) devient moins sensible au OCMU, suite à un enrichissement des thylacoïdes en phospholipides de Soja.

Il semble également que l'adjonction de mélittine dans la bicouche thylacoïdale restreigne la mobilité des molécules de lipides et inhibe les activités photosynthétiques (Bishop, 1983).

Un autre type d'enrichissement des thylacoïdes consiste à incuber ces derniers avec du cholestérol ou du cholestéryl hémisuccinate. NB il a été montré que le cholestérol et le cholestéryl hémisuccinate ont des effets identiques sur la fluidité des membranes mais que le second pénètre plus rapidement dans les bicouches (Shintzky *et al.*, 1979).

### Pratique

Il nous est apparu intéressant de moduler la fluidité membranaire, soit en enrichissant les thylacoïdes avec du cholestérol (effet condensant), soit en ajoutant aux membranes un antagoniste des stéroïls, comme l'alcool benzylique (Chin & Goldstein, 1985).

### Cholestérol

L'enrichissement des membranes thylacoïdales en cholestérol a été effectué à 20 °C, à l'obscurité et par injection de solutions éthanoliques de cholestérol à différentes concentrations. Le pourcentage d'éthanol dans la suspension n'a jamais dépassé 0.3 %. Les incubations ont été agitées constamment pendant 10 min et les thylacoïdes ont été lavés deux fois pour éliminer le cholestérol non lié aux membranes. La quantité de cholestérol lié aux membranes thylacoïdales a été déterminée (Fig. 30). On observe une relation linéaire entre la concentration de cholestérol dans le milieu d'incubation et la quantité de cholestérol lié aux membranes thylacoïdales. Ford et al., (1981) observèrent également une incorporation de type linéaire jusqu'à un rapport cholestérol/Chl (mol/mol) égal à 10. Cependant, il est extrêmement difficile d'estimer la quantité de cholestérol réellement incorporé dans les bicouches par rapport à celui qui est simplement associé à la surface des membranes (Yamamoto et al., 1981). Pourtant, Ford et al. (1981) et Yamamoto et al. (1981) estimèrent un rapport entre 0.4 et 0.6 mol de cholestérol associé par mol de Chl. Il semble donc qu'une partie seulement du cholestérol soit réellement liée aux thylacoïdes.

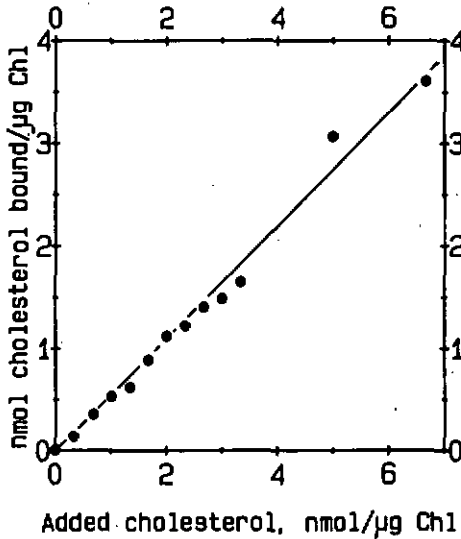


Fig. 30: Quantité de cholestérol lié aux membranes thylacoïdales d'Epinarad après deux lavages en fonction de la quantité de cholestérol présente dans le milieu d'incubation à 20 °C.

## Température

La fig. 31 présente l'effet du cholestérol sur le flux d'électrons  $H_2O \longrightarrow FeCn (NH_4Cl)$  à deux températures. On constate que le cholestérol n'agit pas de la même manière à 10 qu'à 20 °C. A cette dernière température, on assiste à une inhibition progressive du flux d'électrons versus la concentration en cholestérol. A environ 0.8 mol de cholestérol lié par mol de Chl ( $\approx 20\%$ , w/w, des lipides totaux), l'inhibition atteint un plateau situé à 50%. Il est pensable que la valeur de ce rapport corresponde à la quantité de cholestérol réellement incorporé dans la bicouche des thylacoïdes, puisque des concentrations supérieures de stérol n'affectent plus l'activité du transport électronique. Or, l'aggrégation de micelles de cholestérol avec les thylacoïdes ne semble pas altérer la vitesse des réactions photosynthétiques (Ford et al., 1981). Ces mêmes auteurs observent aussi une inhibition par le cholestérol, de l'oxydation du premier accepteur photoréduit du PS II en présence de DCPIP avec ou sans agent découplant. Yamamoto et al. (1981) constatent, lors de l'enrichissement des membranes chloroplastiques avec du cholestéryl hémisuccinate, une inhibition du flux  $H_2O \longrightarrow FeCn$  qui atteint un plateau à 50%, une inhibition des réactions obscures de la photosynthèse ainsi qu'un ralentissement de la diffusion des PQ et des différents complexes protéiques thylacoïdaux.

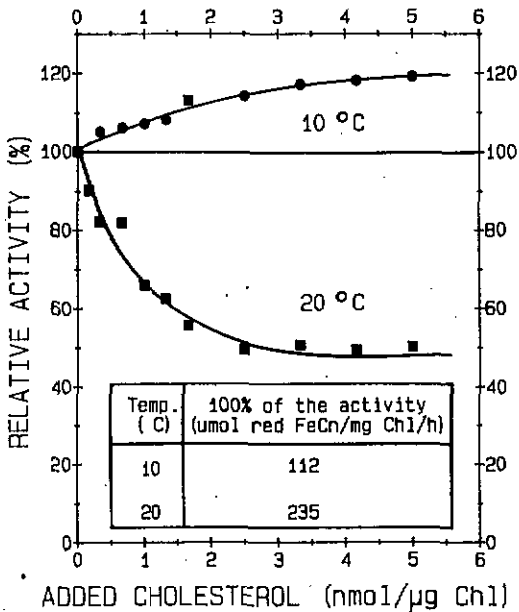


Fig. 31: Effet du cholestérol sur l'activité du flux d'électrons photosynthétique  $H_2O \longrightarrow FeCn (NH_4Cl)$  de membranes thylacoïdales d'Épinard à 10 (•) et 20 °C (■).

Dans tous les cas relatés, l'addition de stérols aux thylacoïdes provoque une augmentation de la viscosité membranaire (Ford & Barber, 1980, 1983a, b; Scoufflaire *et al.*, 1981, 1985; Ford *et al.*, 1981; Yamamoto *et al.*, 1981; Olsen, 1984; Pederson & Cox, 1984; Rawlyer & Siegenthaler, 1989). Par contre, lorsque nous avons mesuré l'activité  $H_2O \rightarrow FeCn(NH_4Cl)$  à 10 °C en présence de concentrations croissantes de cholestérol (Fig. 31), l'activité du flux d'électrons augmente d'environ 20% à partir d'un rapport proche de 5 nmol cholestérol/ $\mu g$  Chl. Il est possible que l'on assiste à l'effet double du cholestérol, c'est-à-dire qu'il rend les chaînes d'acides gras plus mobiles en-dessous de la température de transition et moins mobile en-dessus (voir 1<sup>re</sup> Partie et Oldfield & Chapman, 1972; Marsch & Smith, 1973; Pang & Miller, 1978; Shepherd & Buidt, 1979; Goodrich *et al.*, 1988).

A 10 °C, la mobilité des acides gras est restreinte par rapport à 20 °C mais il est possible qu'à cette température une addition de cholestérol induise du "désordre" dans la bicouche, la rendant plus fluide. A 20 °C, la fluidité des thylacoïdes est plus élevée qu'à 10 °C. Pourtant celle-ci semble être facilement altérée par l'addition de cholestérol, qui impose une restriction aux mouvements des différents constituants thylacoïdaux.

#### *L'inhibition*

Lorsque l'on détermine le  $I_{50}$  de l'atrazine et du DCMU sur le flux  $H_2O \rightarrow FeCn(NH_4Cl)$  de membranes thylacoïdales en présence de doses croissantes de cholestérol et incubées à 10 ou à 20 °C (Fig. 32), on constate que le pouvoir inhibiteur:

- de l'atrazine et du DCMU diminue à 10 °C.
- de l'atrazine est constant à 20 °C.
- du DCMU diminue à 20 °C.

Nous avons déjà constaté que le pouvoir inhibiteur des deux herbicides sur des membranes thylacoïdales sensibles à l'atrazine diminue lorsque la température décroît et plus particulièrement lorsque  $T < 12$  °C (Figs 23 et 26). Ceci suggère qu'à ces températures, alors que le cholestérol stimule l'activité photosynthétique (Fig. 31), une plus grande quantité d'herbicide est nécessaire pour inhiber le flux d'électrons. Pourtant, le pouvoir inhibiteur des herbicides n'atteint pas de plateau, ces molécules doivent donc, probablement, partitionner dans la membrane de façon moins spécifique (ailleurs que sur le polypeptide 32 kD) et/ou dans des micelles de cholestérol associées à la surface de la membrane. Une rigidification de la membrane par le cholestérol à 20 °C favorise l'action inhibitrice du DCMU. Peut-être le site de liaison du DCMU est-il plus accessible à cet herbicide dans ces conditions. Nous n'avons pas effectué de mesure de liaison d'herbicide sur des membranes thylacoïdales enrichies en cholestérol mais nous proposons que de telles expériences soient conduites dans le futur.

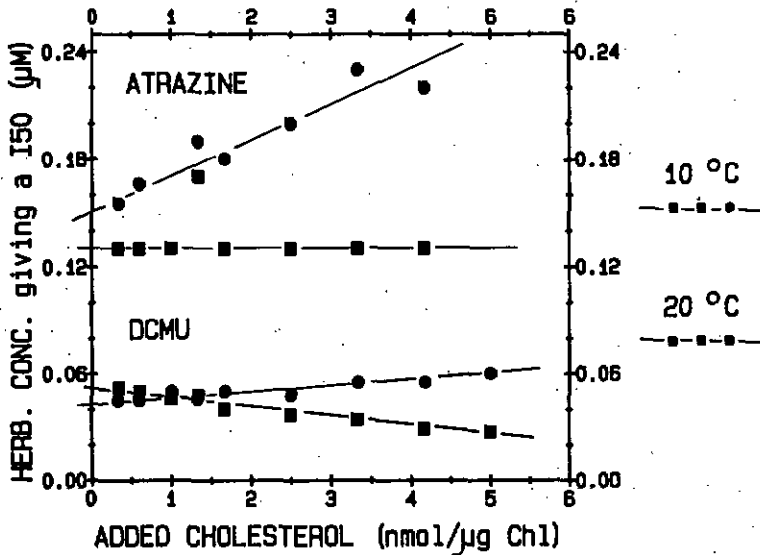


Fig. 32: Valeurs de demi-inhibition ( $I_{50}$ ) du flux d'électrons  $H_2O \rightarrow FeCn (NH_4Cl)$  pour l'atrazine et le DCMU à 10 (●) et 20 °C (■) sur des membranes thylacoïdales d'Epinard enrichies de quantités croissantes de cholestérol.

#### L'alcool benzylique

Une autre approche pour moduler la fluidité des membranes est d'augmenter cette dernière par adjonction d'alcool benzylique (AB). La molécule d'AB est neutre, hydrosoluble, partitionne rapidement dans la bicouche lipidique et abaisse la température à laquelle les lipides transitionnent (Colley & Metcalfe, 1972). La propriété de l'AB d'augmenter rapidement et de manière réversible la fluidité membranaire rend cette molécule très utile dans l'étude de la relation entre la structure et la fonction des membranes (Colley et al., 1971; Ashcroft et al., 1977; Reyes & Latorre, 1979; Needham et al., 1982; Pederson & Cox, 1984; Coster & Laver, 1986). Il nous intéressait donc de rechercher si l'addition d'AB sur des membranes thylacoïdales d'Epinard pouvait modifier le pouvoir inhibiteur de l'atrazine. Pour ce faire, nous avons traité des membranes thylacoïdales d'Epinard, en présence de concentrations croissantes d'AB, par une dose sublétales d'atrazine (0.06 μM) et nous avons mesuré l'activité  $H_2O \rightarrow MV$  (basal) à différentes températures. La Fig. 33 présente ces résultats. Comme nous l'avons déjà observé, l'atrazine

stimule le transport des électrons aux basses températures (Figs 3 et 21) et l'inhibe progressivement lorsque la température s'élève (4.2.2). Or, à 3 °C, en présence d'AB ( $\leq 15$  mM), l'atrazine ne modifie pas significativement le flux électronique mais à 12 et à 20 °C il le stimule, en tout cas aux concentrations d'AB  $\leq 7.5$  mM. Ceci suggère que l'AB favorise la pénétration de l'atrazine dans la bicouche membranaire, qui peut, à son tour, découpler plus aisément l'activité du flux électronique et accélérer ainsi, la consommation d'oxygène. Il se peut également que l'AB ait un effet découplant sur l'activité du transport d'électrons mais ceci semble peu probable car dans tous les cas étudiés l'AB inhibe entre 25 et 50% l'activité photosynthétique (résultats non montrés).

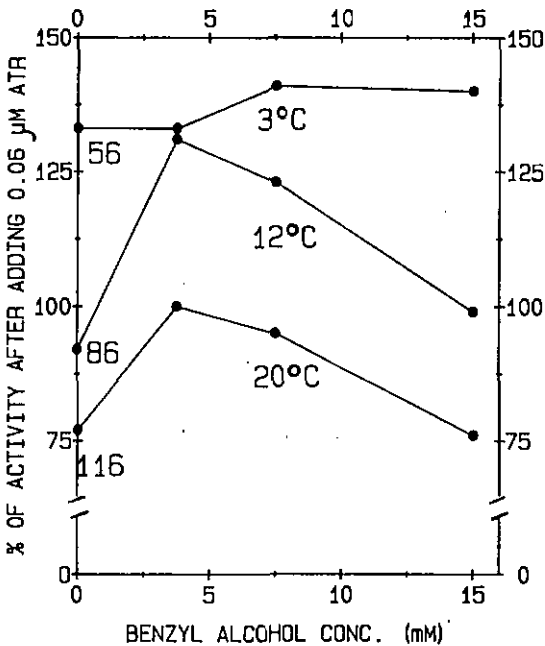


Fig. 33: Effet d'une dose sublétales d'atrazine ( $0.06 \mu\text{M}$ ) sur des membranes thylacoïdales d'Epinard en présence de concentrations croissantes d'alcool benzylique et à différentes températures. Les valeurs indiquées pour une concentration nulle d'alcool benzylique représentent l'activité basale  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MV}$  ( $\mu\text{mol O}_2$  consommé/mg Chl/h) en l'absence de tout herbicide, (Pour plus d'information, voir le texte).

Nous avons vu dans ces quelques expériences d'enrichissement des membranes thylacoïdales en cholestérol ou en AB à différentes températures, que l'on pouvait moduler la vitesse du flux électronique et le

pouvoir inhibiteur des herbicides. Cependant, ce type de stress est assez difficile à cerner, puisque les quantités d'agent chimique réellement incorporées dans la bicouche membranaire ne sont pas connues et qu'il est impossible d'enlever complètement les micelles et les agrégats de cholestérol restés à la surface de la membrane. Par ailleurs, à température ambiante, ces agents inhibent l'activité photosynthétique par des processus encore mal compris, ce qui rend l'interprétation des résultats délicate. Toutefois, il est possible que l'idée d'une fluidité optimale limite soit compatible avec le maintien de la structure et de la fonction membranaire (Raison *et al.*, 1982). Cette fluidité optimale limite, qui reste constante pour un matériel donné, est atteinte à différentes températures, selon que l'on ajoute un agent comme le cholestérol ou l'alcool benzylique.

Nous sommes conscients que beaucoup d'autres expériences de type stress chimique sont concevables dans l'étude de l'action des herbicides sur des membranes thylacoïdales mais nous avons préféré nous attarder sur des stress que l'on pouvait mieux contrôler.

#### 4.2.4 Stress par hydrogénation catalytique

À côté des quelques techniques dont nous avons déjà parlé et qui permettent d'altérer indirectement les constituants lipidiques (§ 4.2.1-3), il existe une méthode, beaucoup plus spécifique, puisqu'elle ne touche que la partie lipidique des membranes. Cette technique consiste à hydrogéner les acides gras des lipides membranaires en présence d'un catalyseur (= complexe d'un métal de transition). Restall *et al.* (1979) hydrogénèrent les doubles liaisons des acides gras des lipides thylacoïdaux en présence du catalyseur de Wilkinson, insoluble dans l'eau. Depuis ces expériences pionnières, les catalyseurs ont changé et actuellement, le palladium di (sodium alizarine monosulphate) ou Pd(QS)<sub>2</sub> est le catalyseur le plus utilisé pour saturer les doubles liaisons des acides gras, tout en préservant les activités liées aux membranes (flux d'électrons, phosphorylation, respiration, etc...). Le Pd(QS)<sub>2</sub> présente l'avantage de partitionner dans les thylacoïdes tout en étant facilement éliminable de la phase membranaire (lavages successifs des échantillons) car il est hydrosoluble (Quinn *et al.*, 1989).

Cette technique nous a permis de saturer, à des degrés différents, les acides gras des lipides acylés des membranes thylacoïdales de Morelles S et R. Nous avons déterminé les K<sub>d</sub>, les  $\eta$  et les pouvoirs inhibiteurs de l'atrazine et du DCMU sur ces membranes hydrogénées.

#### *Hydrogénation catalytique des lipides membranaires*

Les cinétiques d'hydrogénation des acides gras des thylacoïdes de Morelles S et R, pendant une durée maximale de 5 minutes en présence du catalyseur préactivé (forme B, voir Pak *et al.*, 1990), sont illustrées dans la Fig. 34A. On observe une baisse appréciable du contenu en doubles liaisons des acides gras des biotypes S et R. Cette diminution de la quantité des doubles liaisons suit une cinétique biphasique, c'est-à-dire qu'une phase de latence précède la réaction d'hydrogénation principale.

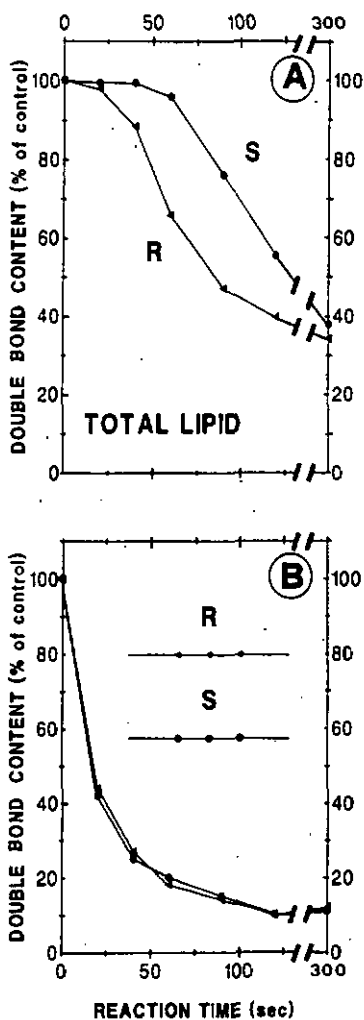


Fig. 34: Perte du contenu en doubles liaisons (%) des acides gras totaux. (A) Dans des membranes thylacoïdales de *S. nigrum* sensible et résistante à l'atrazine. (B) Dans des liposomes constitués des lipides polaires thylacoïdaux d'origine sensible et résistante, lors d'une hydrogénation catalytique homogène. Légende, biotype sensible (S,•) et résistant (R,◄) à l'atrazine.

La vitesse de la réaction d'hydrogénation principale est sensiblement la même chez les thylacoïdes S et R, par contre la période de latence est beaucoup plus courte au sein des thylacoïdes R. En effet, après une minute, env. 40% des doubles liaisons ont été hydrogénées chez le biotype R, contre seulement 5% chez le S. Chez le biotype R, environ 60% des doubles liaisons ont été saturées après deux minutes d'hydrogénation et trois minutes supplémentaires ne modifient plus grandement ce résultat (env. 5% de plus). Par contre, chez le biotype S, après deux minutes d'hydrogénation, quelque 45% des doubles liaisons ont été saturées et ce n'est que trois minutes plus tard que le contenu en doubles liaisons a baissé de plus de 60%, comme chez le R. Il semblerait qu'il soit possible d'hydrogéner davantage les membranes thylacoïdales (jusqu'à 90%, Vigh et al., 1985a) mais la réaction nécessite alors plusieurs heures, ce qui fait intervenir, outre le phénomène d'hydrogénation proprement dit, celui du vieillissement membranaire.

Lorsque des liposomes sont préparés (voir 1<sup>me</sup> Partie) à partir d'un extrait lipidique total dépigmenté des thylacoïdes S ou R (Fig. 34B) et qu'ils sont soumis aux mêmes conditions d'hydrogénation que les thylacoïdes, on observe que les lipides de ces liposomes "S" et "R" présentent des courbes de saturation identiques. Ce résultat indique que les lipides totaux du biotype S sont rendus accessibles au catalyseur, au même titre que ceux du R, lorsque l'architecture de la membrane native n'est plus. Les différences observées dans la Fig 34A sont alors attribuées à une accessibilité différente du catalyseur envers les membranes thylacoïdales R et S, ce qui suggère une différence de structure entre ces deux types de membranes thylacoïdales.

Afin de mieux comprendre la raison de cette "protection relative" des lipides vis-à-vis du catalyseur dans les membranes thylacoïdales S natives, par rapport aux R (Fig. 34A), nous avons étudié les cinétiques d'hydrogénation des différentes classes de lipides thylacoïdaux des deux biotypes (Fig. 35). On observe que les MGDG, DGDG et SQDG (Figs 35A, B et C) sont saturés plus rapidement chez R que chez S. On peut aussi noter que les temps de latence observés dans la Fig. 34A sont essentiellement le fait de MGDG et de DGDG, dûs à l'abondance de ces deux lipides. Par contre, les acides gras du PG des deux biotypes sont saturés à des vitesses très proches l'une de l'autre. Les cinétiques de saturation des doubles liaisons du MGDG des plantes S et R se superposent à celles des lipides totaux des deux biotypes respectifs (comparer Figs 34A et 35A). Ainsi, une estimation précise du degré d'hydrogénation des doubles liaisons des acides gras totaux pourrait être effectuée par la mesure de la diminution du DBI dans le seul MGDG. La saturation des acides gras du DGDG se rapproche grandement de celle du MGDG (comparer Figs 35A et B). Par contre, pour les deux glycérolipides ioniques, les SQDG et PG (Figs 35C et D), on assiste à une hydrogénation plus rapide que chez les deux galactolipides (comparer les Figs 35C et D avec les Figs 35A et B). Par ailleurs, le SQDG du biotype R est hydrogéné jusqu'à 90% après 5 minutes, alors que celui du S atteint un plateau situé à 70% d'hydrogénation, dans les mêmes conditions (Fig. 35G).

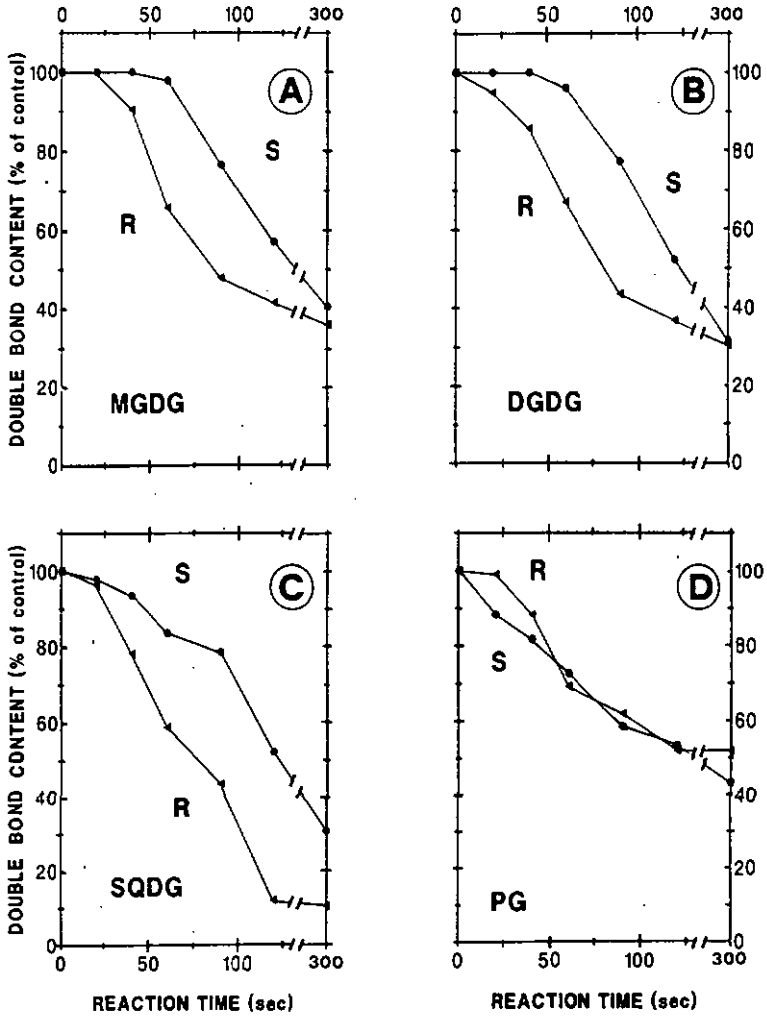


Fig. 35: Changement du degré d'insaturation des acides gras des classes de lipides des membranes thylacoïdales de *S. nigrum* sensible (S, ●) et résistante (R, ◐) à l'atrazine par hydrogénation catalytique. Légende, (A) monogalactosyldiacylglycérol (MGDG); (B) digalactosyldiacylglycérol (DGDG); (C) sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG) et (D) phosphatidylglycérol (PG).

Plusieurs résultats obtenus avec le catalyseur Pd(QS)<sub>2</sub> sur des membranes artificielles et biologiques suggèrent des différences d'accessibilité de cette molécule amphipathique aux substrats lipidiques. Trois raisons majeures peuvent être invoquées. i) une augmentation de la microviscosité membranaire (Vigh *et al.*, 1983; Quinn *et al.*, 1989); ii) l'apparition de phases hexagonales-II à l'intérieur de la bicouche (Vigh *et al.*, 1987) et iii) une association étroite des lipides avec les protéines (Katagiri *et al.*, 1981).

#### "La question de la microviscosité membranaire"

Les mesures de polarisation de la fluorescence du DPH n'ont révélé aucune différence significative entre la fluidité des thylacoïdes S et celle des R (Fig. 9, 3<sup>ème</sup> Partie). De plus, nous avons trouvé le même degré d'insaturation des lipides thylacoïdaux totaux (DBI = 2.53 ± 0.04) des biotypes S et R, quand bien même la composition en lipides des membranes S et R ne soit pas identique (Tab. III et IV; Figs 1 et 2, 3<sup>ème</sup> Partie). Ainsi, il ne semble pas que l'accessibilité entravée du catalyseur vers les doubles liaisons des lipides des membranes thylacoïdales S, soit due à une différence du contenu en lipides qui pourrait être responsable, en partie, de la microviscosité membranaire.

Un autre facteur pourrait restreindre l'accès du catalyseur vers les doubles liaisons des acides gras du biotype S, lorsque que ces dernières sont hydrogénées pendant une courte période (< 5 min), à savoir la présence de structures membranaires non lamellaires (Vigh *et al.*, 1987).

#### "La question de la phase hexagonale"

Nous avons montré que la distribution transmembranaire des MGDG et DGDG n'est pas la même chez les deux types de plante (§ 4.4.2, 3<sup>ème</sup> Partie et Rawyler *et al.*, 1987). En fait, si les rapports molaires MGDG/DGDG sont bas et pratiquement égaux dans la monocouche interne des thylacoïdes S et R (S = 1.24 et R = 1.32), ils sont considérablement plus élevés dans la monocouche externe (S = 9.67 et R = 7.00). En admettant que la valeur de ce rapport soit une première approximation pour apprécier la potentialité d'une membrane à former des structures non-lamellaires (voir discussion dans Giroud & Siegenthaler, 1984), on peut déduire de ces résultats que la tendance de la monocouche externe à former des structures non-lamellaires (p.ex. en entravant l'accès ou la distribution du catalyseur dans les membranes thylacoïdales S) est plus marquée chez les membranes S que chez les R. Pourtant, au moins trois objections majeures peuvent s'opposer à cette supposition. Premièrement nous avons trouvé des vitesses d'hydrogénation réduites pour tous les glycolipides, bien qu'il soit reconnu que le DGDG, un lipide formant des structures lamellaires, soit exclu des domaines non lamellaires (Quinn *et al.*, 1989). Deuxièmement, il est largement reconnu que des séparations de phase entre structures lamellaires et non lamellaires apparaissent lorsque l'on expose des membranes à des températures non physiologiques (T > 35 °C) (Giroud & Siegenthaler, 1984; Horvath, I. *et al.*, 1986; Quinn, 1989; Vigh *et al.*, 1989; Quinn *et al.*, 1989) raison pour laquelle, dans nos conditions, la température a toujours été maintenue basse (2 °C).

Finalement, nous avons suggéré une stabilité thermique réduite des membranes thylacoïdales R, lorsque ces dernières sont soumises à des températures élevées (§ 4.2.2, voir aussi Ducruet & Drt, 1988; Havaux, 1989). Etant donné que l'apparition de structures non lamellaires peut être directement liée à une stabilité thermique réduite (Quinn, 1989; Vigh *et al.*, 1989), il est difficile de croire que l'hydrogénation des thylacoïdes S soit limitée par la présence de phases lipidiques non lamellaires.

#### "La question de l'association lipides-protéines"

Bien que plusieurs propositions de topographie moléculaire de la membrane thylacoïdale aient été faites, il existe encore des incertitudes considérables quant à la taille de la "coquille" de lipides fermement liés autour des protéines. Les interactions lipides-protéines dans les thylacoïdes et les fractions subthylacoïdales ont été étudiées grâce à l'emploi d'analogues des lipides. Ainsi, le MGDG présente des interactions avec les protéines moins préférentielles que le PG, suggérant que le rôle du MGDG dans les membranes thylacoïdales est, en partie, structural (Li *et al.*, 1989). Il semble aussi que la fraction lipidique dont la mobilité est restreinte soit en rapport avec des valeurs du rapport protéines/lipides des différentes membranes thylacoïdales (Li *et al.*, 1990). Or, nous avons mentionné que ce rapport est plus élevé chez le biotype S que chez le R (2,70 et 2,33 mg protéines/ $\mu$ mol lipides, respectivement) (voir aussi Chap. 4.2, 3<sup>ème</sup> Partie et Rawlyer *et al.*, 1987). D'une manière correspondante et pour autant que la quantité de complexes protéines-lipides immobilisés soit plus élevée chez le biotype S que chez le R, il se peut que cela suffise pour restreindre l'accessibilité relative du catalyseur dans les plastes S.

Nous avons déterminé les changements de composition des acides gras des différentes classes de lipides en fonction du temps d'hydrogénation chez les deux biotypes de *S. nigrum* (voir annexes 2.1 à 2.4). Chez les quatre classes de lipides, on observe que les acides hexadécatriénoïque, linoléique et linoléinique disparaissent plus rapidement chez R que chez S (annexes 2.1 à 2.4, Figs D, G et H). Parallèlement à la diminution des quantités d'acides gras triénoïques des MGDG, DGDG et SQDG (annexes 2.1 à 2.3, Figs D et H), on assiste à une augmentation des quantités des acides gras monoénoïques et saturés plus rapide chez R que chez S (annexes 2.1 à 2.3, Figs A, B, E et F). Par contre, les acides oléique et stéarique du PG apparaissent plus rapidement chez S que chez R (annexe 2.4, Figs E et F). Ces deux acides gras sont présents ensemble à raison d'environ 20 mol% du PG après 5 minutes d'hydrogénation. Il est intéressant de noter que l'on n'observe pas de différence de vitesse de saturation de l'acide linoléinique du PG, bien que les acides plus saturés (18:0 et 18:1) soient formés plus rapidement chez le S que chez le R. Cependant, il est difficile de corrélérer ces résultats avec le DBI du PG natif (Tab. III, 3<sup>ème</sup> Partie), puisque l'écart entre les valeurs du DBI du biotype S et du R est mineur. En plus des différences de vitesse d'hydrogénation des doubles liaisons des acides gras chez les biotypes S et R, on observe la présence chez R mais pas chez S, des acides palmitique (16:0) des DGDG et PG et hexadécadiénoïque (16:2) du DGDG seulement (annexes 2.2 et 2.4, Figs D). L'acide *trans*-9-octadécénoïque (18:1*trans*, acide gras n'existant normalement pas chez ce type de

plante) dans les MGDG et DGDG hydrogénés des deux biotypes apparaît également (annexes 2.1 et 2.2, Figs D). En effet, Vigh et al. (1987) observèrent que la technique d'hydrogénation engendre quelques isomères positionnels d'acides gras en *cis* et *trans*. Ainsi, les différences d'hydrogénation des lipides entre les plantes S et R ne sont pas uniquement des différences de vitesse mais également de "stratégie", c'est-à-dire que le catalyseur n'induit pas la formation de produits identiques chez les deux biotypes. De plus, il est reconnu que la vitesse de saturation des doubles liaisons est plus rapide pour des acides gras poly- que monoinsaturés (Vigh et al., 1985a) et que la susceptibilité des lipides au sein des membranes thylacoïdales vis-à-vis de l'hydrogène en présence du Pd(QS)<sub>2</sub> diminue comme suit: MGDG > DGDG > SQDG > PG (Horváth, I. et al., 1986). Nous ne trouvons rien de semblable dans nos conditions, vraisemblablement, parce que la concentration du catalyseur est trop élevée et que la vitesse d'hydrogénation est telle qu'elle dissimule les différences fines de réactivité entre les classes de lipides.

En conclusion, les différences de cinétique d'hydrogénation des MGDG, DGDG et SQDG entre le biotype S et le R (Fig. 35), suggèrent que le catalyseur doit avoir accès aux acides gras de ces lipides plus facilement, donc plus rapidement, chez la plante R que chez la S. Les différences mentionnées pour les SQDG et PG sont mineures lorsque l'on considère l'ensemble de la membrane car chacun de ces deux lipides ne représente qu'environ 10% des lipides totaux des membranes thylacoïdales (voir Tab. IV, 3<sup>ème</sup> Partie). Il est cependant possible que ces lipides anioniques modulent la microviscosité de certains domaines spécifiques de la membrane et qu'ils jouent un rôle non négligeable, puisque l'architecture membranaire de base semble être sous l'influence directe de l'interaction entre les lipides et les protéines. Or, il semble que la relation entre ces deux composants majeurs des membranes thylacoïdales soit à l'origine d'une plus grande protection des lipides des plantes S, comparé aux R, vis-à-vis du catalyseur. Il se peut que non seulement la différence du rapport protéines/lipides (Chap. 4.2, 3<sup>ème</sup> Partie) influence la vitesse d'hydrogénation mais encore, qu'un changement de configuration du polypeptide 32 kD, dans les thylacoïdes du mutant, par rapport au S, favorise l'attaque des MGDG, DGDG et SQDG par le Pd(QS)<sub>2</sub>, tout en protégeant celle du PG. Siengenthaler et al. (1989) ont montré que 10% du PG était inaccessible au traitement à la PLA<sub>2</sub>, ce qui leur a suggéré qu'une population de PG était fortement liée à un ou plusieurs domaines protéiques. Nous avons proposé à plusieurs reprises (§ 4.2, 4.4, 4.5, 3<sup>ème</sup> Partie et 4.2.2 4<sup>ème</sup> Partie) que les membranes thylacoïdales du biotype R semblent être plus fluides que les S. Or, une fluidité accrue des membranes thylacoïdales du biotype R ou tout au moins de certaines de leurs régions pourrait expliquer un accès facilité du catalyseur. Ainsi, l'hydrogénation catalytique semble être une méthode sensible, bien qu'indirecte, de l'estimation de la fluidité relative d'une membrane, à l'instar de la technique d'hydrolyse des lipides membranaires via l'utilisation de lipases et de la technique de la stimulation de la fluorescence des chlorophylles associées au PS II par les cations (voir Chap. 4.4 et 4.5, 3<sup>ème</sup> Partie). Par contre, la technique de polarisation de fluorescence (voir Chap. 4.5, 3<sup>ème</sup> Partie et Ford & Barber, 1980) ne semble pas être à même de déceler des différences de fluidité apparaissant dans des microdomaines préférentiellement localisés dans le voisinage direct des complexes protéiques (Barber et al., 1984).

*Effet de l'hydrogénation des lipides sur l'incorporation du DCMU dans des membranes thylacoïdales*

Dans la suite de notre étude, nous avons hydrogéné les doubles liaisons des acides gras des lipides thylacoïdaux des biotypes S et R à divers degrés et nous avons déterminé les constantes de dissociation et les nombres de sites de liaison de l'atrazine et du OCMU dans ces membranes thylacoïdales "stressées" par hydrogénation catalytique. Il nous est apparu primordial de rechercher les modifications du comportement de liaison des herbicides dans des membranes thylacoïdales vivantes mais dont la fluidité a été diminuée par modification directe de la partie lipidique. En effet, ce type de stressa est un des rares qui n'altère que la partie lipidique et de manière contrôlée, tout en ne modifiant pas trop l'activité photosynthétique. On peut s'attendre à ce que l'affinité et/ou le nombre de sites de liaison des herbicides soient modifiés suite à un changement conformationnel de leur site d'attache. En augmentant la température du milieu d'incubation, il devrait être possible de rétablir un comportement de liaison des herbicides proche de celui effectué avec des membranes thylacoïdales non hydrogénées.

Remarquons tout d'abord que le pourcentage d'hydrogénation des lipides thylacoïdaux a été estimé en mesurant la diminution de l'acide linoléique (Figs 36 à 40). De plus, nous avons définis une échelle d'appréciation pour les différents pourcentages de perte du C<sub>18:2</sub> (Tab. VI).

Perte de l'acide linoléique (%)	Estimation du degré d'hydrogénation
0 à 14	faible
15 à 29	doux
30 à 50	élevé
> 50	très élevé

Tab. VI: Evaluation du degré d'hydrogénation par la perte de l'acide linoléique total (pour plus d'information, voir le texte).

La Fig. 36 décrit l'incorporation du DCMU dans les membranes thylacoïdales S contrôle et hydrogénées en fonction de la température. On observe que: i) par rapport à des membranes non hydrogénées, une hydrogénation de 28% des doubles liaisons diminue de 38, 23 et 20% l'incorporation du DCMU lorsqu'elle a atteint un plateau et quand les membranes thylacoïdales sont incubées à 0, 20 et 40 °C, respectivement (n.b. la réaction d'hydrogénation est conduite à 2 °C); ii) l'incorporation du DCMU dans les membranes contrôles diminue de 20 et 50% quand la température passe de 0 à 20 et de 0 à 40 °C, respectivement. Par contre, iii) lorsque les membranes ont été hydrogénées de 28%, on n'observe plus de différences significatives d'incorporation du DCMU entre 0 et 20 °C, quand bien même, entre 0 et 40 °C l'écart reste élevé (env. 40%). Le fait que l'hydrogénation des thylacoïdes atténue la baisse d'incorporation du DCMU (lorsque la température augmente) suggère que la saturation des doubles liaisons accroît la résistance thermique des thylacoïdes.

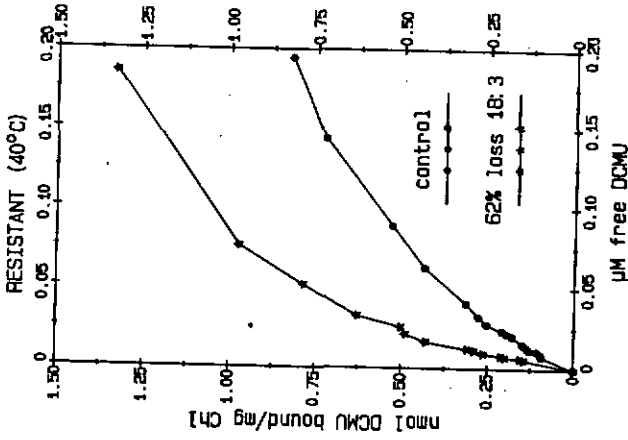


Fig. 37: Courbes d'incorporation du DCMU dans des membranes thylacoïdales de *S. nigrum* résistantes à l'atrazine et incubées à différentes températures (0, 20 et 40 °C).

n.b. il s'agit de la concentration de DCMU libre:

Légende: thylacoïdes contrôlé (—,•) et hydrogénés à 62% (---,\*)

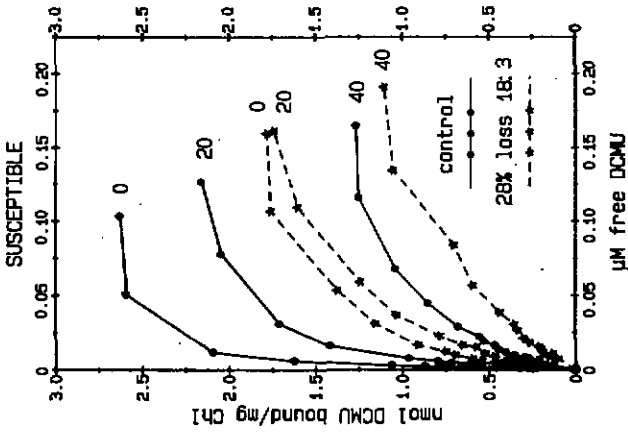


Fig. 36: Courbes d'incorporation du DCMU dans des membranes thylacoïdales de *S. nigrum* sensible à l'atrazine et incubées à différentes températures (0, 20 et 40 °C).

n.b. il s'agit de la concentration de DCMU libre:

Légende: thylacoïdes contrôlé (—,•) et hydrogénés à 28% (---,\*)

Dans la Fig. 37, nous comparons l'incorporation du DCMU à 40 °C entre des membranes thylacoïdales de Morelles R contrôle et des membranes qui ont perdu 62% d'acide linoléique. On constate que les membranes hydrogénées incorporent davantage de DCMU à cette température. Ainsi, il semble être possible de rétablir la perte d'incorporation d'un herbicide suite à un stress thermique, en saturant, préalablement à ce stress, les doubles liaisons des acides gras des lipides membranaires.

*Effet d'une hydrogénation catalytique des lipides sur l'affinité et le nombre de sites de liaison de l'atrazine et du DCMU*

Dans la perspective de ce chapitre, il nous a paru intéressant, de déterminer l'affinité ainsi que le nombre de sites de liaison de l'atrazine et du DCMU sur des membranes hydrogénées à des degrés différents et soumises à diverses températures. La Fig. 38 présente les  $K_d$  (A) et les  $n$  (B) de l'atrazine pour des membranes thylacoïdales de Morelles S hydrogénées à 15 et 35% et incubées à 0, 20, 30 et 40°C. On observe que:

dans les membranes contrôle (0% d'hydrogénation),

- l'affinité de l'atrazine diminue lorsque la température augmente;
- le nombre de sites de liaison de l'atrazine, par rapport à 0°C, diminue significativement à 40°C (45%) mais en-deçà, il reste  $\geq 2$  nmol/mg Chi;

dans les membranes hydrogénées à 15%, par rapport aux membranes contrôle soumises aux mêmes températures,

- l'affinité de l'atrazine diminue, drastiquement à 0°C (env. 80%), pas à 20°C et d'env. 10% à 40°C;
- le nombre de sites de liaison de l'atrazine est diminué à divers degrés selon la température (38, 73 et 46% à 0, 20 et 40°C);

dans des membranes hydrogénées à 35%, par rapport aux membranes contrôle soumises aux mêmes températures,

- l'affinité de l'atrazine diminue, drastiquement à 20°C (env. 70%), quelque peu à 30°C (env. 20%) mais augmente à 40°C (env. 10%);
- le nombre de sites de liaison de l'atrazine est diminué à divers degrés selon la température (40% à 20 et 40°C et 65% à 30°C).

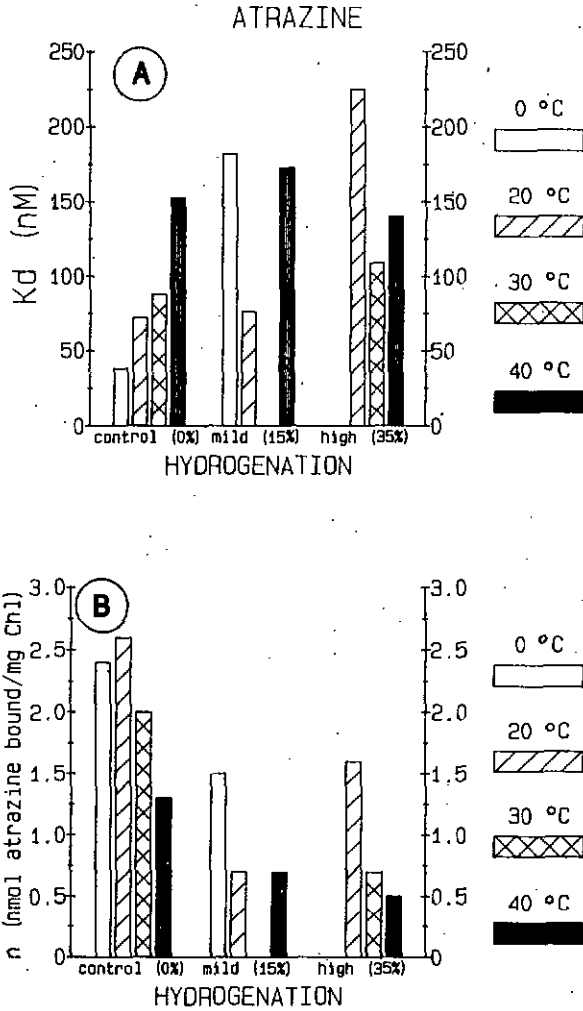


Fig. 38: (A) Constante de dissociation ( $K_d$ , nM) et (B) nombre de sites de liaison ( $n$ , nmol/mg Chl) de l'atrazine sur des membranes thylacoïdales de *S. nigrum* sensible à l'atrazine. Membranes contrôle (0%), hydrogénées doucement (15%) et fortement hydrogénées (35%) et incubées à différentes températures.

la Fig. 39 présente les  $K_d$  (A) et les  $\Pi$  (B) du DCMU pour des membranes thylacoïdales de Morelles S hydrogénées à 28 et 43% et placées à 0, 20 et 40°C. On constate que:

dans les membranes contrôles (0% d'hydrogénation),

- l'affinité du OCMU diminue lorsque la température augmente;
- le nombre de sites de liaison du OCMU, par rapport à 0°C, diminue de 40% à 40 °C mais en deçà, il reste > 2 nmol/mg Chl;

dans les membranes hydrogénées à 28%, par rapport à des membranes contrôle soumises aux mêmes températures,

- l'affinité du OCMU diminue à 0, 20 et 40°C, soit d'env 75, 73 et 63%, respectivement;
- le nombre de sites de liaison du OCMU est diminué d'env. 35% à 0°C mais ne semble plus être modifié aux températures de 20 et 40°C;

dans des membranes hydrogénées à 43%, par rapport à des membranes contrôle soumises aux mêmes températures,

- l'affinité du DCMU n'est pas altérée à 20°C et diminue d'env. 30% à 40°C;
- le nombre de sites de liaison est diminué d'env. 30% à 20°C et d'env. 10% à 40°C;

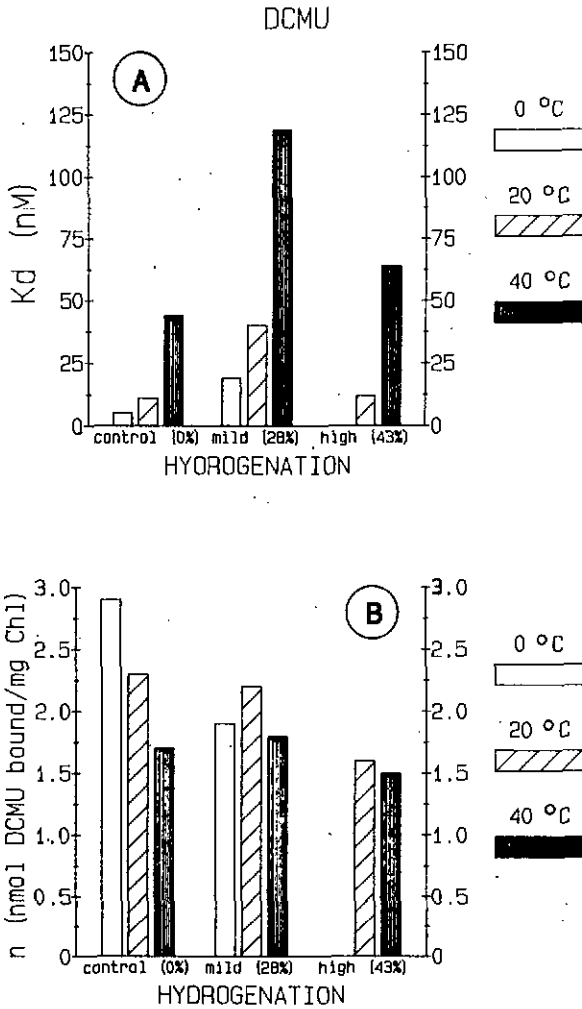


Fig. 39: (A) Constante de dissociation ( $K_d$ , nM) et (B) nombre de sites de liaison ( $n$ , nmol/mg Chl) du DCMU sur des membranes thylacoïdales de *S. nigrum* sensible à l'atrazine. Membranes contrôle (0%), hydrogénées doucement (28%) et fortement hydrogénées (43%) et incubées à différentes températures.

la Fig. 40 présente les  $K_d$  (A) et les  $\mu$  (B) du DCMU pour des membranes thylacoïdales de Morelles R hydrogénées à 10 et 62% et placées à 0, 20 et 40 °C. On constate que:

dans les membranes contrôles (0% d'hydrogénation,

- l'affinité du DCMU diminue lorsque la température augmente;
- le nombre de sites de liaison du DCMU, par rapport à 0 °C, ne change pas à 20 °C mais diminue d'un tiers à 40 °C;

dans les membranes hydrogénées à 10%, par rapport à des membranes contrôle soumises aux mêmes températures,

- l'affinité du DCMU diminue d'env. 40% à 0 et 20 °C mais augmente de quelque 55% à 40 °C;
- le nombre de sites de liaison du DCMU est diminué à 0, 20 et 40 °C, soit d'env. 25, 35 et 43%, respectivement;

dans des membranes hydrogénées à 62%, par rapport à des membranes contrôle soumises aux mêmes températures,

- l'affinité du DCMU est diminuée d'env. 40% à 20 °C mais augmente d'env. 25% à 40 °C;
- le nombre de sites de liaison est diminué d'env. 23% à 20 °C et d'env. 30% à 40 °C;

Après une brève description des Figs 38 à 40, on constate qu'il n'est pas aisé de comparer les différents résultats, probablement pour deux raisons au moins:

- 1) il est difficile d'hydrogéner des membranes S et R à un même degré.
- 2) les membranes S et R hydrogénées à divers degrés se comportent différemment vis-à-vis de la température.

Cependant, comparées aux contrôles, les membranes hydrogénées présentent quelques caractéristiques intéressantes. En fait, il semble qu'il soit possible de jouer avec le degré d'hydrogénation et la température pour que, soit l'affinité, soit le nombre de sites, varie:

- A) Lorsque des membranes thylacoïdales S ont subi une hydrogénation douce, l'affinité de l'acrazine ne varie pas à 20 °C mais le nombre de sites de liaison baisse drastiquement (Fig. 38).

Lorsque des membranes thylacoïdales S ont subi une hydrogénation douce, l'affinité du DCMU diminue significativement mais le nombre de sites de liaison ne varie pas (Fig. 39).

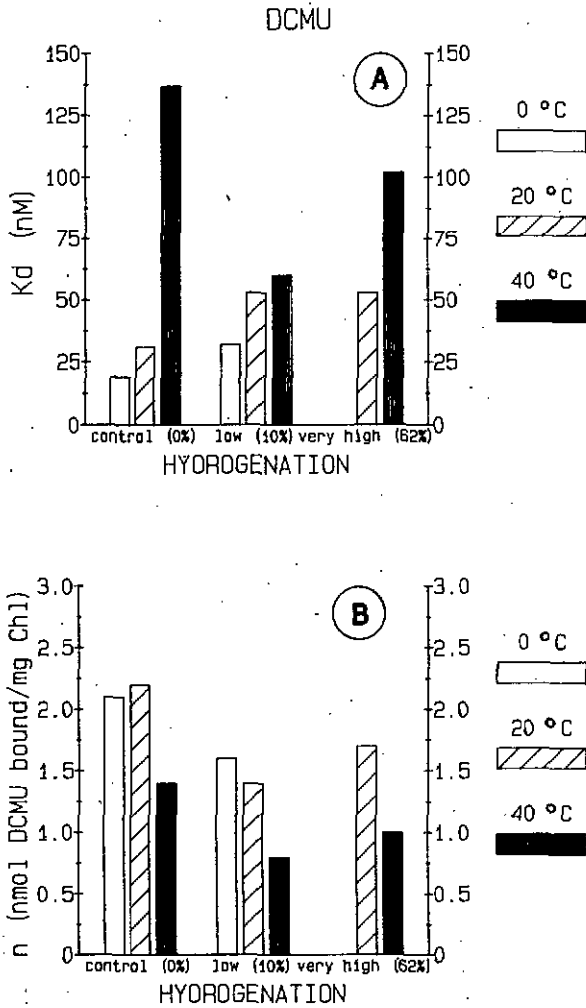


Fig. 40: (A) Constante de dissociation ( $K_d$ , nM) et (B) nombre de sites de liaison ( $n$ , nmol/mg Chl) du DCMU sur des membranes thylacoïdales de *S. nigrum* résistante à l'atrazine. Membranes contrôle (0%), hydrogénées faiblement (10%) et très fortement hydrogénées (62%) et incubées à différentes températures.

B) Lorsque des membranes thylacoïdales S ont subi une hydrogénation élevée, l'affinité de l'atrazine varie peu à 40 °C mais le nombre de sites de liaison diminue considérablement (Fig. 38).

Lorsque des membranes thylacoïdales R ont subi une hydrogénation élevée, l'affinité du DCMU augmente à 40 °C mais le nombre de sites de liaison diminue (Fig. 40).

La saturation des acides gras des thylacoïdes S semble avoir un effet opposé sur les propriétés de liaison de l'atrazine et du DCMU. L'hydrogénation atténue la mobilité des différents constituants membranaires (Thomas *et al.*, 1986) et modifierait la configuration de la protéine 32 kD. La nouvelle configuration du polypeptide 32 kD serait telle que le nombre de sites de liaison de l'atrazine soit diminué mais que son affinité pour les sites de liaison non altérés ne soit pas modifiée. Quant au nombre de sites de liaison du DCMU, il ne serait pas modifié mais son affinité serait affaiblie. De plus, le degré d'hydrogénation des membranes thylacoïdales S doit être plus élevé pour atténuer les effets de la température, lors de la liaison du DCMU, comparé à celle de l'atrazine.

Concernant le pouvoir inhibiteur des deux herbicides sur l'activité  $H_2O \longrightarrow FeCl(NH_4Cl)$ , nous avons vu précédemment que la valeur moyenne du  $I_{50}$  de l'atrazine pour des membranes thylacoïdales de *S. nigrum* S se situe vers 0.16  $\mu M$  et celle du DCMU, vers 0.035  $\mu M$  (Tab. III). Lorsque les lipides thylacoïdaux du biotype S sont saturés de 28%, la valeur  $I_{50}$  de l'atrazine baisse de moitié (0.08  $\mu M$ ), alors que celle du DCMU double (0.07  $\mu M$ ) (résultats non montrés). On constate là encore qu'un comportement d'inhibition opposé apparaît entre l'atrazine et le DCMU lorsque le degré d'hydrogénation est doux. C'est-à-dire que le pouvoir inhibiteur de l'atrazine augmente, alors que celui du DCMU diminue. Ceci est à mettre en relation avec le fait que i) le nombre de sites de liaison de l'atrazine diminue contrairement à celui du DCMU, ii) l'affinité du DCMU diminue, contrairement à celle de l'atrazine.

En conclusion, nous constatons que les effets de l'hydrogénation des doubles liaisons des acides gras des lipides thylacoïdaux sur l'interaction herbicides/thylacoïdes sont multiples. Un faible degré d'hydrogénation (< 15%) suffit à modifier significativement le comportement de liaison et d'inhibition des herbicides, alors qu'une saturation plus prononcée ne modifie guère ces paramètres. Cette dernière observation n'est pas sans rappeler l'effet drastique sur la température de transition de phase ( $T_c$ ) qu'engendre le remplacement des acides gras saturés par des monoinsaturés dans des liposomes, quand bien même une augmentation des doubles liaisons (acides gras bi- et tri-insaturés), ne change plus grandement la  $T_c$  (Vigh *et al.*, 1985). La saturation des doubles liaisons semble accroître la résistance des membranes thylacoïdales au stress thermique, ce qui permet de moduler les propriétés de liaison des herbicides sur des thylacoïdes hydrogénés, en changeant la température. Ainsi, s'il semble exister une fluidité maximale limite, compatible avec le maintien de la structure et de la fonction membranaires qui reste constante pour un matériel donné mais qui est atteinte à différentes

températures (Raison *et al.*, 1982). L'hydrogénation semble affecter les propriétés de liaison et d'inhibition de l'atrazine et du DCMU de manière opposée

- en modifiant le nombre de sites de liaison de l'atrazine mais pas celui du DCMU,
- en modifiant l'affinité de ce dernier sans altérer celle de l'atrazine et
- en augmentant le pouvoir inhibiteur de l'atrazine mais en diminuant celui du DCMU

Horváth *et al.* (1987) observèrent une augmentation des centres PS II<sub>o</sub> au détriment des centres PS II<sub>a</sub> lors de l'hydrogénation des membranes thylacoïdales de Pois. En tenant compte de cette observation, il se peut que l'atrazine ne se fixe pas sur les centres PS II<sub>o</sub> (Wettern, 1986), ce qui correspond à une diminution du nombre de sites de liaison mais qu'il se fixe sur les PS II<sub>a</sub> restants, sans que son affinité soit modifiée. Par contre, le DCMU pourrait se fixer sur les centres PS II<sub>o</sub> (n variant pas) mais avec une affinité diminuée. (n.b. il semble que le phénomène de la résistance chloroplastique soit de même nature, c'est-à-dire qu'il diminue l'affinité du DCMU chez le biotype R, comparé au S, sans que son nombre de sites de liaisons ne soit modifié significativement). Le pouvoir inhibiteur augmenterait lorsque moins de sites de liaison sont disponibles (cas de l'atrazine), alors qu'il diminuerait quand le nombre de sites de liaison ne varie pas mais que son affinité est affaiblie (cas du DCMU). Dans ce dernier cas, il faudrait une concentration d'herbicide plus élevée qui favoriserait une partition de l'herbicide dans la partie membranaire qui inhiberait le flux d'électrons.

#### 4.2.5 Stress lipolytique

Bien que la stress par hydrogénation catalytique n'affecte que la partie apolaire des lipides polaires des membranes thylacoïdales, il ne privilégie spécifiquement, ni une classe lipidique, ni une région précise de la membrane. Or, il existe un autre type de stress, le stress lipolytique, qui affecte selon le type de lipase choisi, seulement les phospho- ou les galactolipides (voir 4.4, 3<sup>ème</sup> Partie). De plus, par un traitement lipolytique approprié (voir 3.3), il est possible de ne délipider que la monocouche externe des membranes thylacoïdales. Ainsi, dans ce dernier §, nous présenterons les résultats des liaisons de l'atrazine et du DCMU, ainsi que le pouvoir inhibiteur de ces deux herbicides sur des membranes thylacoïdales d'Epinard et de Morelles S et R dont la presque totalité soit des phospho- soit des galactolipides de la monocouche externe, voire des deux classes de lipides, ont été hydrolysés.

La quantité d'atrazine liée aux membranes thylacoïdales du biotype S de Morelle augmente progressivement en fonction de la concentration en herbicide (Fig. 41). Les degrés d'incorporation sont similaires dans les contrôles et les membranes thylacoïdales traitées par la PLA<sub>2</sub> ou par la LRA. Comme prévu, les membranes thylacoïdales du biotype R ne lient pas l'atrazine dans le domaine de concentration utilisé (Pfister et al., 1979). La quantité de OCMU liée aux thylacoïdes des biotypes S et R augmente progressivement en fonction de la concentration d'herbicide (Fig. 42). Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les membranes thylacoïdales contrôles et les traitées avec les lipases (Fig. 42A), contrairement aux thylacoïdes R, dans lesquels les deux traitements lipolytiques diminuent l'incorporation du OCMU (env. 30% de moins à 0.02  $\mu\text{M}$  OCMU) (Fig. 42B).

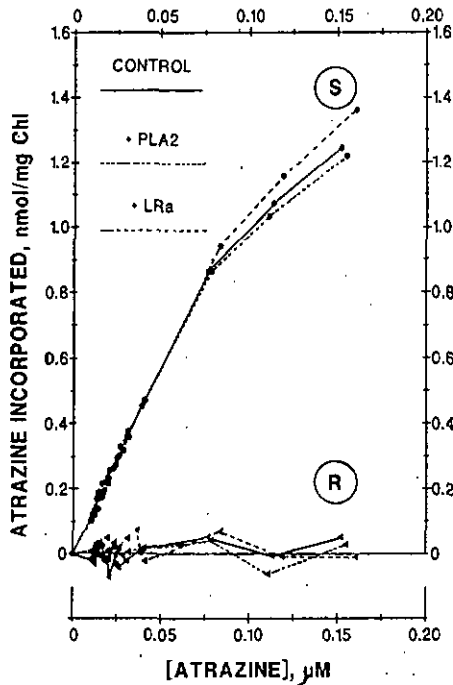


Fig. 41: Incorporation de l'atrazine-<sup>14</sup>C (nmol/mg Chl) en fonction de la concentration ( $\mu\text{M}$ ) de l'herbicide, dans des membranes thylacoïdales isolées des biotypes sensible (S) et résistant (R) à l'atrazine de la Morelle.

Membranes contrôle (—); traitées à la PLA<sub>2</sub> (-----) ou à la LRA (- - -).

Les traitements PLA<sub>2</sub> et LRa ne changent pas grandement les valeurs Kd ni les  $\mu$  de l'atrazine (Tab. VII). Dans le cas du DCMU, le biotype S de la Morelle présente des valeurs Kd inférieures à celles du R, en accord avec les résultats de Pfister et al. (1979). Pourtant, dans les deux biotypes, un traitement à la PLA<sub>2</sub> augmente sensiblement les valeurs Kd, alors qu'un traitement LRa ne présente pas d'effet mesurable. Les deux traitements lipolytiques ne changent pas significativement les valeurs  $\mu$  dans le biotype S de la Morelle, alors qu'elle diminue d'env. un tiers dans le biotype R (Tab. VII).

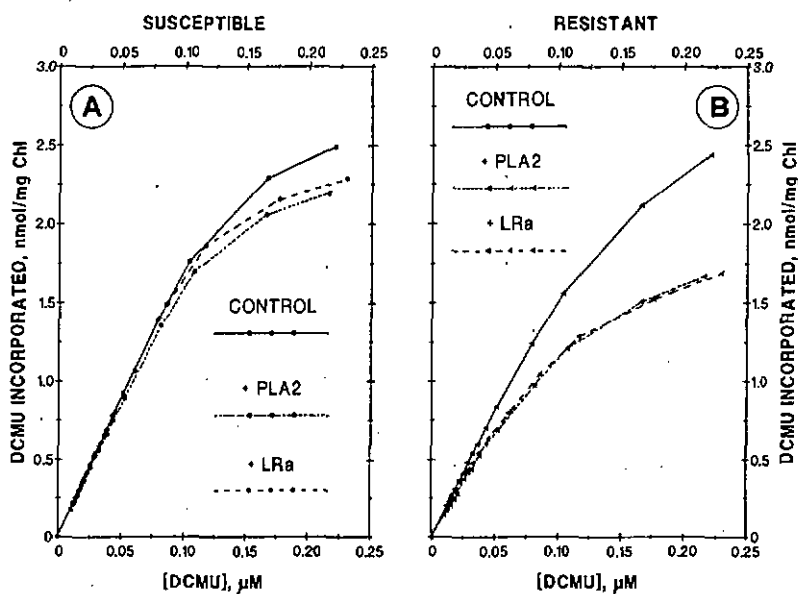


Fig. 42: Incorporation du DCMU-<sup>14</sup>C (nmol/mg Chl) en fonction de la concentration en herbicide (μM), dans des membranes thylacoïdales de *Solanum nigrum* sensible (A) et résistant (B) à l'atrazine. Les symboles sont les mêmes que dans la Fig. 41.

Dans les membranes traitées à la  $PLA_2$ , les valeurs  $I_{50}$  des deux herbicides augmentent chez le biotype R mais diminuent chez le S (Tab, VII). Dans les membranes traitées à la LRA, les valeurs  $I_{50}$  des deux herbicides augmentent chez le biotype R alors qu'elles sont affectées différemment par le traitement à la LRA chez le biotype S, diminuant pour l'atrazine et augmentant pour le DCMU.

Il n'y a pas de correspondance stricte entre les valeurs des Kd et des  $I_{50}$ , en accord avec Jurainic & Stemler (1983) et Thiel & Böger (1983). Nous avons, cependant, combiné les informations contenues dans les Kd et les  $I_{50}$  par la détermination de l'efficacité relative ( $Kd/I_{50}$ ). La délipidation de la monocouche externe des membranes thylacoïdales S en phospholipides accroît l'efficacité relative de l'atrazine et du DCMU. La délipidation en galactolipides augmente l'efficacité relative de l'atrazine et réduit celle du DCMU. Les délipidations affectent dans une moindre mesure l'efficacité relative du DCMU dans les membranes thylacoïdales R.

### Discussion

On constate que certains lipides acylés des membranes thylacoïdales modulent les propriétés de liaison et d'inhibition des herbicides du PS II (urea/triazine type herbicides). En effet, la méthode lipolytique utilisée dans ce type de stress permet d'obtenir une déplétion sélective de certains lipides de la monocouche externe, alors que la monocouche interne reste intacte (Rawlyer & Siegenthaler, 1985; Siegenthaler & Giroud, 1986; Siegenthaler *et al.*, 1987 et 1989). Cette approche semble à l'heure actuelle la plus spécifique pour moduler la partie lipidique des membranes et notamment des lipides thylacoïdaux en proche interaction avec le polypeptide 32 kD. Cependant, il est possible que des réarrangements lipidiques apparaissent dans les membranes attaquées par des lipases de façon à ce que la déplétion très localisée s'étende et se confonde dans l'ensemble de la membrane. Pourtant, le mouvement transmembranaire des molécules lipidiques peut être exclu car toutes les incubations sont conduites à basse température (Siegenthaler *et al.*, 1989). La formation de micelles cylindriques inversées a été observée dans des membranes thylacoïdales de Pois traitées à la  $PLA_2$  d'abeille à 25 °C et en absence de BSA (Thomas *et al.*, 1985). Pourtant, dans ce dernier cas, il n'y a pas de déplétion lipidique *sensu stricto* mais la température élevée et la présence des produits d'hydrolyse pourraient bien être à l'origine de la formation de structures hexagonales-II. Néanmoins, même si des altérations secondaires de ce type devaient survenir, elles seraient tout de même en rapport avec la phase lipidique membranaire. De plus, il est envisageable qu'une déplétion lipidique dans la monocouche externe des membranes thylacoïdales favorise un affaiblissement des interactions de certains polypeptides avec d'autres constituants membranaires, ce qui pourrait provoquer une perte de ces polypeptides dans le milieu externe. En réalité, le largage de protéines a été observé dans des membranes thylacoïdales soumises à des traitements à la  $PLA_2$  ou à la galactolipase (Krupa, 1983) mais ce phénomène est probablement en rapport avec les conditions extrêmement drastiques

utilisées par cet auteur. Cependant nous ne pouvons exclure une perte de certains polypeptides des membranes thylacoïdales. Néanmoins, la Table V montre que dans des membranes thylacoïdales traitées, l'inhibition du flux d'électrons photosynthétique est limitée et que le nombre de sites de liaisons de l'atrazine et du DCMU reste pratiquement inchangé. La perte de polypeptides membranaires directement impliqués dans les phénomènes de liaison des herbicides et d'inhibition du transport électronique semble donc négligeable dans nos conditions expérimentales.

Nous avons vu qu'une déplétion en phospholipides de la monocouche externe (correspondant à 7% des lipides totaux) ne change pas l'affinité de l'atrazine, alors qu'elle diminue sensiblement celle du DCMU, bien que le nombre de sites de liaison des deux herbicides reste constant. Cette observation est confirmée par une étude comparable que nous avons conduit avec des membranes thylacoïdales d'Epinarde (Tab. VIII). Si les deux sites de fixation sont localisés dans une seule monocouche (externe ou interne) et en admettant qu'ils soient altérés de la même manière par la déplétion des phospholipides, on pourrait s'attendre à ce que les paramètres de liaison des deux herbicides soient modifiés. Ceci n'est pas le cas (Tab. VII et VIII). Par conséquent, il apparaît, d'une part, que le site de liaison de l'atrazine (considéré pour être localisé uniquement sur le polypeptide 32 kD), qui est insensible (Kd ne change pas) à une déplétion des phospholipides, est peut-être localisé (ou est influencé plus fortement) dans la monocouche interne intacte des membranes thylacoïdales. D'autre part, le site de liaison du DCMU, qui est sensible (Kd augmente) à une altération des phospholipides, est probablement préférentiellement localisé dans la monocouche externe. Par contre, une hydrolyse des galactolipides dans la monocouche externe (correspondant à 30% des lipides totaux) ne change pas significativement ni l'affinité ni le nombre de sites de liaison de l'atrazine et du DCMU, ce que nous avons confirmé avec des membranes thylacoïdales d'Epinarde (Tab. VIII). Nous aurions pu nous attendre à un résultat opposé puisque le MGDG est la classe de lipides la plus abondante dans les membranes thylacoïdales. Des résultats récents ont, cependant, fait apparaître que les molécules de PG interagissent préférentiellement avec les protéines membranaires, comparé au MGDG (Li *et al.*, 1989). Ces résultats, ainsi que les nôtres suggèrent que le PG joue un rôle plus spécifique au sein des thylacoïdes, comparé au MGDG. Ce sont probablement les espèces les plus saturées du PG (éventuellement du MGDG) qui sont concernées dans les interactions lipides-protéines, comme l'atteste le fait que les complexes PS II et les centres réactionnels de ces photosystèmes sont hautement enrichis en lipides saturés (Gounaris & Barber, 1985).

Nous avons également mesuré le pouvoir inhibiteur de l'atrazine et du DCMU dans des particules PS II de type "BBY" (voir 3.2). Aucune différence d'inhibition de la part des deux herbicides n'est apparue entre des membranes thylacoïdales intactes et les particules PS II (résultats non montrés). Il est pensable que le PC soit en relation avec le polypeptide 32 kD et qu'il maintienne une conformation adéquate du polypeptide 32 kD. Dans des particules PS II, l'environnement lipidique immédiat de la protéine fixatrice des herbicides n'est vraisemblablement pas altéré et il reste fonctionnel, contrairement à un traitement lipolytique, qui doit attaquer les lipides en proche contact avec les polypeptides du PS II.

Tab VII : Constantes de dissociation des herbicides (atrazine et DCMU),  $K_d$  (nM), nombre total de sites de liaison,  $n$  (nmol/mg Chl) et concentration de desl-inhibition du flux d'électrons découplé  $H_2O$ /ferricyanure ( $\mu M$ ) dans des thylacoïdes de *S. elongatus* sensible (S) et résistant (R) à l'atrazine. L'efficacité relative des deux herbicides ( $K_d/I_{50}$ ) est définie par le rapport entre le pouvoir inhibiteur ( $1/I_{50}$ ) et la constante d'association ( $1/K_d$ ).

	SUSCEPTIBLE			RESISTANT		
	control	+PLA	+LRa	control	+PLA	+LRa
ATRAZINE						
$K_d$	32 ±8	32 ±8	37 ±7	----	----	----
$n$	1.7±0.2	1.6±0.2	1.8±0.2	----	----	----
$I_{50}$	0.14	0.10	0.08	40.0	120.0	50.0
$K_d/I_{50} \times 10^3$	0.23	0.32	0.50	----	----	----
DCMU						
$K_d$	10 ±1	14 ±2	9 ±2	25 ±1	35 ±2	28' ±7
$n$	2.8±0.1	2.6±0.1	2.5±0.1	3.0±0.1	2.1±0.1	2.0±0.1
$I_{50}$	0.027	0.020	0.050	0.034	0.060	0.040
$(K_d/I_{50}) \times 10^3$	0.37'	0.70	0.18	0.74	0.58	0.70

Dans les contrôles, le 100% de l'activité du flux d'électrons photosynthétique correspond à environ 100  $\mu mol$  ferricyanure réduit/mg chlorophylle/h dans les membranes sensibles et résistantes. En absence d'herbicide, l'activité du transport découplé des électrons diminue d'environ 7 et 27% après le traitement PLA, et LRa, respectivement. Les valeurs  $I_{50}$  ( $\pm$  20% pour l'atrazine et  $\pm$  10% pour le DCMU) sont déterminées à partir d'une courbe typique.

Tab VIII : Constantes de dissociation ( $K_d$ , nM), nombre total de sites de liaison ( $n$ , nmol herbicide/mg Chl), concentration de desl-inhibition du flux d'électrons découplé et efficacité relative de l'atrazine et du DCMU dans des thylacoïdes d'Epineid. Les conditions sont les mêmes que celles décrites dans le Tab. VII.

	ATRAZINE				DCMU			
	Contrôle	+PLA	+LRa	+(PLA, & LRa)	Contrôle	+PLA	+LRa	+(PLA, & LRa)
$K_d$	21	23	24	52	8	14	7	8
$n$	1.9	1.8	2.1	2.2	2.4	2.5	2.5	2.1
$I_{50}$	0.16	0.13	0.16	0.16	0.04	0.04	0.04	0.03
$(K_d/I_{50}) \times 10^3$	0.13	0.18	0.15	0.33	0.20	0.35	0.18	0.27

Dans des membranes thylacoïdales traitées à la  $PLA_2$ , la baisse d'affinité du DCMU est similaire dans les deux biotypes (Tab. VII) mais le nombre de sites de liaison du DCMU diminue seulement dans les membranes R. L'affinité réduite du DCMU dans le biotype R peut être due soit à un changement conformationnel (Renger et al., 1984), soit à l'absence d'un groupe hydroxyle (Sigematsu et al., 1989), induit par la mutation glycine 264, dans le polypeptide 32 kD. Ainsi, il est pensable qu'une déplétion lipidique altère d'une manière plus marquée la conformation d'un polypeptide déjà déstabilisé (R) comparé à un polypeptide stable et fonctionnant pleinement (S).

L'efficacité relative des deux herbicides augmente après une déplétion des phospholipides dans les membranes thylacoïdales du biotype S de la Morelle (Tab. VII) et de l'Epinard (Tab. VIII), ce qui suggère que les phospholipides interagissent avec la région de fixation commune aux deux herbicides. Par conséquent, il est pensable que ce site commun soit localisé essentiellement dans la monocouche externe. Par contre, une déplétion en galactolipides des thylacoïdes du biotype S de la Morelle et de l'Epinard a des effets antagonistes sur l'efficacité relative de l'atrazine et du DCMU, ce qui suggère que les galactolipides interagissent préférentiellement avec les parties du site de liaison qui sont spécifiques à chaque herbicide. Le fait que des déplétions lipidiques de la monocouche externe des membranes thylacoïdales R ont peu d'influence sur l'efficacité relative des herbicides peut être attribuée à la substitution d'une sérine par une glycine. En fait, la sérine est à même d'établir des liaisons hydrogène, contrairement à la glycine. Dans les membranes thylacoïdales S de pareilles liaisons peuvent exister entre le polypeptide 32 kD et des molécules voisines, contribuant à des interactions spécifiques, caractéristiques du biotype S. L'absence du groupe hydroxyle de la sérine dans le mutant interdit l'apparition de telles interactions, ce qui provoque une insensibilité marquée de l'efficacité relative du DCMU lors de la déplétion lipidique des thylacoïdes R.

Lorsque les deux lipases sont ajoutées en même temps dans une suspension de membranes thylacoïdales d'Epinard, on assiste à une baisse d'affinité de l'atrazine mais pas du DCMU (Tab. VIII). Le nombre de sites de liaison des deux herbicides n'est pas significativement altéré. Le pouvoir inhibiteur de l'atrazine ne change pas, contrairement à celui du DCMU qui diminue quelque peu. Il en résulte que l'efficacité relative des deux herbicides augmente. Il est à préciser que lorsque les membranes thylacoïdales sont traitées par les deux lipases simultanément, les thylacoïdes ne se disloquent pas mais ils se comportent comme des membranes intactes du point de vue de leur propriété de sédimentation lors de leur isolement et de leur lavage. Par contre, l'activité du flux électronique  $H_2O \rightarrow FeCn(NH_4Cl)$  est plus profondément altérée (env. 50% de perte), comparé à des membranes attaquées par un seul enzyme.

En conclusion, le stress lipolytique nous a permis de mettre en évidence que des populations de phospho- et de galactolipides de la monocouche externe des thylacoïdes S développent des interactions avec le polypeptide 32 kD qui leur sont propres. Ces interactions lipides/protéines sont différentes entre le biotype sauvage et le muté, le groupement hydroxyle de la sérine (absent chez le mutant) étant probablement à l'origine de cette différence.

## 5 RESUME

Le rôle que peuvent jouer les lipides des membranes thylacoïdales dans le maintien de la conformation du polypeptide 32 kD en interaction avec la liaison des herbicides n'a pas fait, jusqu'à maintenant, l'objet d'étude approfondie (Millner et al., 1983; Vasil'ev et al., 1988). Dans ces deux travaux, le rapport lipides/protéines des membranes thylacoïdales a été augmenté par l'incorporation de lipides exogènes ou d'acide oléique, de façon à ce que la réponse des membranes thylacoïdales vis-à-vis des herbicides soit altérée. Pourtant, l'aspect qualitatif de pareils traitements (où vont les molécules de lipides extrinsèques et comment sont-elles distribuées?) n'est généralement pas contrôlé. Ceci est un sérieux inconvénient lorsque l'on considère que l'interaction des herbicides avec le polypeptide 32 kD doit avoir une localisation bien définie à l'intérieure de la membrane thylacoïdale. Pour cette raison, nous avons tenté d'altérer le plus spécifiquement possible la partie lipidique des membranes thylacoïdales, après avoir recherché les différents éléments susceptibles de moduler les propriétés de liaison et d'inhibition des herbicides.

Le résumé des résultats présentés dans cette 4<sup>ème</sup> Partie s'articule donc en trois temps: 1) quelques éléments qui modulent les propriétés de liaison et d'inhibition des herbicides sur des membranes thylacoïdales normales (= non stressées); 2) effets des différents stress infligés à des membranes thylacoïdales, quant aux propriétés de liaison et d'inhibition des herbicides; 3) différences entre les membranes thylacoïdales du biotype R et celles du S.

- 1) Nous avons observé que l'affinité et le pouvoir inhibiteur des herbicides sont plus grands en condition de lumière limitante que saturante, que le nombre de sites de liaison de l'atrazine est plus grand à l'obscurité qu'à la lumière, alors que celui du DCMU ne change pas. Le pouvoir inhibiteur des herbicides semble être plus fort en condition découplée que basale bien que leur affinité et leur nombre de sites de liaison soient plus faibles en condition découplée que couplée.
- 2) Un stress de type hypo- ou hypertonique augmente l'affinité et le pouvoir inhibiteur de l'atrazine mais pas ceux du DCMU qui restent constants (Tab. IX). A basse température (< 12 °C), l'affinité des herbicides augmente mais leur pouvoir inhibiteur semble diminuer, quand bien même les nombres de sites de liaison des deux herbicides ne soient pas altérés (Tab. IX). Des températures élevées ont pour effets de diminuer à la fois l'affinité et le nombre de sites de liaison des herbicides, sans changer significativement leur pouvoir inhibiteur (Tab. IX). Le fait de saturer d'une manière douce les doubles liaisons des acides gras des lipides thylacoïdaux diminue le nombre de sites de liaison de l'atrazine et augmente son pouvoir inhibiteur, alors qu'il affaiblit l'affinité du DCMU et diminue son pouvoir inhibiteur (Tab. IX). Une déplétion de la monocouche externe des thylacoïdes en phospholipides affaiblit l'affinité du DCMU

seulement et augmente le pouvoir d'inhibition des deux herbicides, alors qu'une déplétion en galactolipides, ne fait qu'augmenter le pouvoir inhibiteur de l'atrazine et diminuer celui du DCMU (Tab. IX).

- 3) Le biotype S de *Solanum nigrum* se comporte comme une plante sensible au froid ("chilling sensitive"), alors que le biotype R se comporte vis-à-vis des basses températures (< 12°C), comme une plante résistante au froid, quand bien même ce biotype semble avoir développé une sensibilité thermique accrue aux températures élevées. Les membranes thylacoïdales du biotypes R semblent être plus fluides que les S.

On a également observé dans cette 4<sup>ème</sup> Partie, que l'affinité et le pouvoir inhibiteur de l'atrazine sont quelque quatre fois plus faibles que ceux du DCMU. Par contre le nombre de sites de liaison est similaire pour les deux herbicides. Il est aussi à noter, que les herbicides semblent jouer un rôle d'agent fluidifiant dans des membranes thylacoïdales dont la viscosité a été augmentée par des facteurs extrinsèques (température) ou intrinsèques (saturation des doubles liaisons).

## 6 CONCLUSIONS DE LA QUATRIEME PARTIE

Arrivé au terme de cette Partie, il est apparu que dans des membranes thylacoïdales non stressées, il existe une bonne corrélation entre l'affinité de l'herbicide pour son site de liaison et son pouvoir d'inhibition d'une activité du flux des électrons photosynthétique (lorsque l'affinité augmente, le pouvoir inhibiteur augmente également). On a également observé que l'affinité des herbicides pour leur site de liaison spécifique est plus élevé à l'obscurité qu'à la lumière, ce qui corrobore l'hypothèse de compétition des herbicides avec les PQ pour un site de liaison commun. Par contre, le nombre de sites de liaison de l'atrazine diminue lorsque les membranes thylacoïdales sont éclairées, alors que celui du DCMU reste constant. Le fait que l'affinité et le pouvoir inhibiteur du DCMU sont environ quatre fois plus élevés que ceux de l'atrazine, suggèrent que le DCMU doit avoir un plus grand nombre de possibilités de se fixer sur son site de liaison spécifique que l'atrazine (Fig. 43A).

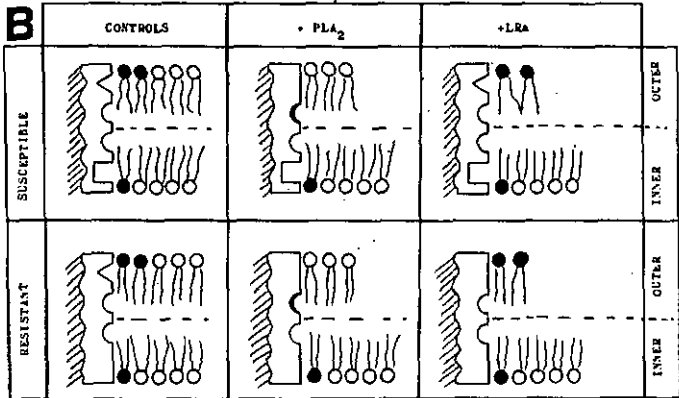
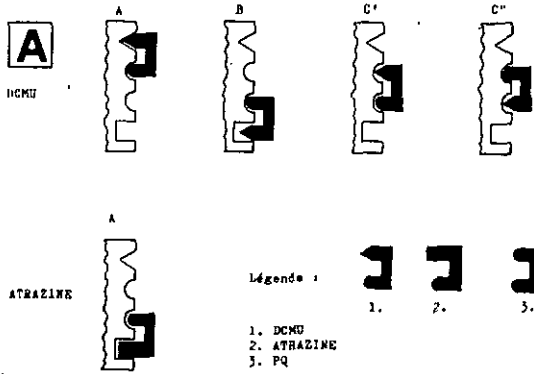


Fig. 43 : Modèle de liaison des inhibiteurs (atrazine & DCMU) et des plastoquinones (PQ) sur des membranes thylacoïdales (modifié d'après Pfister et al., 1979; Trebst, 1980). Ce modèle présente plusieurs concepts; en (A): 1) Une orientation transversale asymétrique des différents sites spécifiques de liaison des herbicides 2) L'existence de deux types différents de région de liaison des herbicides, une région essentielle qui après avoir lié une molécule (herbicide ou PQ) bloque le transport des électrons et interdit les domaines nécessaires à l'attachement spécifique des inhibiteurs. En (B): 1) L'absence de domaine spécifique de liaison de l'atrazine sur la protéine 32 kD mutée. 2) Les modifications des différents sites de liaison selon que les phospho- ou les galactolipides de la monocouche externe des membranes thylacoïdales ont été hydrolysés par la phospholipase A<sub>2</sub> de *Vipera russelli* ou par la lipase de *Rhizopus arrhizus*, respectivement.

Le Tab. IX résume les résultats de l'affinité, du nombre de sites et du pouvoir inhibiteur de l'atrazine et du DCMU sur des membranes thylacoïdales soumises aux différents stress étudiés dans ce travail. Il est apparu que dans des membranes thylacoïdales stressées, le comportement de liaison et d'inhibition des deux herbicides divergent, dans la plupart des cas. Ainsi, le fait de stresser l'ensemble des membranes thylacoïdales de façon aspécifique (stress osmotique), nous a permis d'observer que le comportement de l'atrazine seulement était altéré, alors que celui du DCMU ne l'était pas (Tab. IX). Cette dernière observation nous suggère que le site de liaison de l'atrazine n'est pas le même que celui du DCMU. Un stress affectant plus spécifiquement la partie lipidique des membranes thylacoïdales (hydrogénation des doubles liaisons des acides gras des lipides thylacoïdaux) nous montre que lorsque la fluidité membranaire est altérée, le nombre de sites de liaison de l'atrazine est diminué mais pas celui du DCMU. Par contre l'affinité de ce dernier est diminuée mais pas celle de l'atrazine. De plus, le fait que le pouvoir inhibiteur de l'atrazine augmente et que celui du DCMU diminue, suggère que des centres PS II non fonctionnels sont formés au détriment de centres fonctionnels. Il semble que l'atrazine soit incapable de se lier à ces centres PS II transformés alors que le DCMU le pourrait encore mais avec une affinité plus faible. Dans le premier cas, il en résulte un plus petit nombre de sites de liaison, donc un plus grand pouvoir inhibiteur de l'atrazine, alors que dans le cas du DCMU, si le nombre de sites de liaison n'est pas altéré, l'affinité semble être diminuée et par conséquent le pouvoir d'inhibition de cet herbicide est affaibli.

Lorsque seulement la partie lipidique du feuillet externe des membranes thylacoïdales est altérée (déplétion des lipides de la monocouche externe des membranes thylacoïdales, voir Fig. 43B), on observe que les phospholipides semblent jouer un rôle plus important que les galactolipides dans les phénomènes de liaison du DCMU. Par contre, l'atrazine ne semble pas être affectée par l'altération du feuillet externe des thylacoïdes. Une déplétion en phospholipides favorise le pouvoir d'inhibition des herbicides, alors qu'une déplétion en galactolipides augmente le pouvoir inhibiteur de l'atrazine mais diminue celui du DCMU. Ces dernières observations suggèrent que: i) les phospholipides interagissent avec la région de fixation commune aux deux herbicides et par conséquent le site commun aux deux herbicides est localisé essentiellement dans la monocouche externe, ii) les galactolipides interagissent préférentiellement avec les parties du site de liaison qui sont spécifiques à chaque herbicide. Pourtant, les deux types de lipides sont en étroite collaboration, puisque lorsque l'on hydrolyse simultanément les phospho- et les galactolipides de la monocouche externe des membranes thylacoïdales, c'est l'affinité de l'atrazine qui diminue, alors que celle du DCMU recouvre des valeurs proches de celles du contrôle. L'absence des deux types de lipides modifie significativement la conformation du site de liaison de l'atrazine, alors que l'absence des phospholipides seulement suffit à altérer le site de liaison du DCMU.

ATRAZINE		DCMU				
STRESS	affinité	nb de sites	pouvoir inhibiteur	affinité	nb de sites	pouvoir inhibiteur
hypotonique <sup>a)</sup>	+	z	.	z	z	z
hypertonique <sup>a)</sup>	+	z	+	z	z	z
"chilling" température <sup>a)</sup>	+	z	+	+	z	+
température > 30 °C <sup>a)</sup>	+	+	z	+	+	z
saturation des ac. gras <sup>a),b)</sup>	z	+	+	+	z	+
déplétion de la monoouche externe en :						
- phospholipides <sup>c)</sup>	z	z	.	.	z	.
- galactolipides <sup>c)</sup>	z	z	.	z	z	.

Tab. IX: Table récapitulative des effets des différents stress infligés à des membranes thylacoïdales sensibles sur les propriétés de liaison et d'inhibition de l'atrazine et du DCMU. Pour plus d'information, voir le texte se rapportant aux stress respectifs. <sup>a)</sup> par rapport à des thylacoïdes suspendus en milieu isotonique, <sup>b)</sup> par rapport à des membranes thylacoïdales en suspension à 20 °C, <sup>c)</sup> par hydrogénation catalytique homogène (30% de saturation des doubles liaisons), <sup>d)</sup> par rapport à des membranes thylacoïdales contrôles.

## RESUME ET CONCLUSIONS FINALES

Le lecteur aura lu l'ensemble des conclusions auxquelles ce travail aboutit à la fin de chacune des parties, soit aux pages 52, 96, 138 et 227. Il me paraît donc superflu de les récapituler ici. En revanche, les quatre facettes bien distinctes de ce travail nous permettent de résumer l'ensemble de cette recherche simplement, soit,

à propos de l'interaction herbicides-membranes artificielles:

Les herbicides DCMU et atrazine suppriment la prétransition et abaissent la  $T_g$  des membranes lipidiques en ayant une action fluidifiante. L'atrazine a cependant des effets plus limités dans des vésicules à l'état gel. De plus, ces deux molécules partitionnent à des degrés différents dans les bicouches lipidiques (le  $K_p$  du DCMU est environ quarante fois plus élevé que celui de l'atrazine).

à propos de la phénologie des morelles:

Les biotypes sensibles présentent un meilleur taux de germination en serre tempérée dans la terre que les résistants (environ deux fois). Les biotypes résistants sont plus tardifs que les sensibles, mais leur hauteur est supérieure en fin de culture. Le pouvoir reproducteur, ou pouvoir de dissémination des biotypes résistants est inférieur d'environ 30% à celui des sensibles. Nous pouvons alors parler d'une moins grande "fitness" des biotypes résistants par rapport aux sensibles.

à propos des membranes thylacoïdales des morelles:

Les membranes thylacoïdales du biotype R ont subi, outre la mutation sur la protéine 32 kDa, un certain nombre de modifications ou d'adaptations. La convergence de nos résultats suggère que les membranes thylacoïdales du biotype R sont plus fluides que celles du biotype S.

à propos de l'interaction herbicides-membranes biologiques:

Les comportements de liaison et d'inhibition des deux herbicides divergent dans la plupart des membranes thylacoïdales soumises aux différents stress, ce qui suggère que le site de liaison de l'atrazine n'est pas rigoureusement le même que celui du DCMU.

Les phospholipides semblent interagir avec une région de fixation commune aux deux herbicides, et qui est probablement localisé uniquement dans la monocouche externe. Les galactolipides semblent interagir préférentiellement avec des parties du site de liaison qui sont spécifiques à chaque herbicide.

Nous pouvons donc résumer que, d'une part, les herbicides affectent la partie lipidique des membranes et que, d'autre part, les lipides membranaires modulent l'interaction des herbicides avec leur site d'action. La mutation du polypeptide 32 kDa chez le biotype résistant à l'atrazine ne semble toucher qu'indirectement la partie lipidique des membranes thylacoïdales; suite probablement à une adaptation secondaire du thylacoïde. Cette modification affecte non seulement les propriétés de liaison et d'inhibition des herbicides type-diuron, mais encore le comportement d'activité photosynthétique et par conséquent le développement "au champ" du mutant.

Au terme de cette étude, on peut se demander s'il était judicieux d'entreprendre une recherche sur l'atrazine et sur des biotypes résistants à cet herbicide...? En effet, plusieurs pays européens ont déjà interdit l'emploi de cette molécule sur leur territoire, la Suisse cherche une solution pour diminuer significativement les doses d'application, voire de l'interdire. Quant à la résistance, voilà déjà plus de vingt ans que les premiers mutants ont été découverts et environ dix ans que la mutation a été localisée sur le polypeptide 32 kDa.

Cependant, le nombre et la dispersion géographique des mauvaises herbes résistant aux herbicides se sont développés rapidement ces dernières années et la situation devient préoccupante. Ce type de mauvaises herbes existe dans 40 Etats des Etats-Unis, dans 8 provinces du Canada, dans 18 pays européens et dans 10 autres pays. A ce jour, 107 types de mauvaises herbes résistant aux herbicides ont été identifiées, y compris 57 espèces dont le biotype est résistant aux triazines et 50 résistant à 14 autres catégories d'herbicides.

Géographiquement, les mauvaises herbes résistant aux herbicides gagnent également du terrain d'année en année. On estime actuellement que pas loin d'un million d'hectares des USA sont infestés par des mauvaises herbes résistant aux herbicides à base de triazine et qu'en outre, deux millions d'hectares au moins sont infestés au Canada et en Europe.

La recherche a mis en évidence que la plupart des biotypes résistants à l'atrazine sont aisément contrôlables par d'autres herbicides. Néanmoins, force nous est de constater que l'ampleur du phénomène prend des dimensions épidémiques. C'est dans ce cadre qu'il devient indispensable d'intensifier la recherche sur la résistance, la génétique des mauvaises herbes et la biochimie (LeBaron, 1990).

## BIBLIOGRAPHIE

- Abramson, M.B. (1970) Structural changes in lecithin-water systems. *Biochim. Biophys. Acta* 225:167-170
- Adir, N. and Ohad, I. (1986) Probing for the interaction of the 32 kDa-Qb protein with its environment by use of bifunctional cross-linking reagents. *Biochim. Biophys. Acta* B50:264-274
- Ahrens, W.H. and Stoller, E.W. (1983) Competition, growth rate, and CO<sub>2</sub> fixation in triazine-susceptible and -resistant smooth pigweed (*Amaranthus hybridus*). *Weed Sci.* 31:438-444
- Allen, M.M., Turnburke, A.C., Lagace, E.A. and Steinback, K.E. (1983) Effects of photosystem II herbicides on the photosynthetic membranes of the cyanobacterium *Aphanocapsa* 6308. *Plant Physiol.* 71:388-392
- Anderson, J.M. (1984) Molecular organization of chloroplast thylakoid membranes. In: *Advances in Photosynthesis Research, Vol. III*, Nijhoff, M./Dr Junk, W., pp 1-10, The Hague: Sybesma, C. (ed.)
- Antunes-Madeira, M.C., Carvalho, A.P. and Madeira, V.M.C. (1980) Effects of insecticides on thermotropic lipid phase transitions. *Pestic. Biochem. Physiol.* 14:161-169
- Antunes-Madeira, M.C. and Madeira, V.M.C. (1984) Partition of parathion in synthetic and native membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 778:49-56
- Antunes-Madeira, M.C. and Madeira, V.M.C. (1987) Partition of malathion in synthetic and native membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 901:61-66
- Appelqvist, L.A. (1972) A simple and convenient procedure for the hydrogenation of lipids on the micro- and nanomole scale. *J. Lip. Res.* 13:146-148
- Arntzen, C.J. and Briantaís, J.M. (1975) Chloroplast structure and function. In: *Bioenergetics of Photosynthesis*, Academic Press, pp 51-115, New York: Covindjee (ed.)
- Aro, E.M., Somersalo, S. and Karunen, P. (1987) Membrane lipids in *Ceratodon purpureus* protonema grown at high and low temperatures. *Physiol. Plant.* 69:65-72
- Ashcroft, R.C., Coster, H.G.L. and Smith, J.R. (1977) The molecular organisation of bimolecular lipid membranes. The effect of benzyl alcohol on the structure. *Biochim. Biophys. Acta* 469:13-22
- Avramovic-Zikic, O. and Colbow, K. (1978) Turbidity changes of lipid vesicles near the phase transition temperature as an indication of fusion. *Biochim. Biophys. Acta* 512:97-104
- Bandeem, J.D. and McLaren, R.D. (1976) Resistance of *Chenopodium album* L. to triazine herbicides. *Can. J. Plant Sci.* 56:411-412

- Bangham, A.D., Standish, M.M and Watkins, J.G. (1965) Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* 13:238-252
- Bangham, A.D. (1982) Preparation of liposomes and methods for measuring their permeabilities. In: *Techniques in Life Sciences, Techniques in Lipid and Membrane Biochemistry - Part II*, Elsevier, Biomedical, pp 1-25, Ireland: (ed.)
- Baracca, A., Amler, E., Solaini, G., Parenti Castelli, G., Lenaz, G. and Moustek, J. (1989) Temperature-induced states of isolated F1-ATPase affect catalysis, enzyme conformation and high-affinity nucleotide binding sites. *Biochim. Biophys. Acta* 976:77-84
- Barber, J. (1980) Membrane surface charges and potentials in relation to photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 594:253-308
- Barber, J. (1982) Influence of surface charges on thylakoid structure and function. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33:261-295
- Barber, J. (1985) Thylakoid membrane structure and organisation of electron transport components. In: *Photosynthetic Mechanisms and the Environment*, Elsevier Science, B.V. (Biomedical Division), pp 91-134, : Barber, J. and Baker, N.R. (eds)
- Barber, J., Ford, R.C., Mitchell, R.A.C. and Millner, P.A. (1984) Chloroplast thylakoid membrane fluidity and its sensitivity to temperature. *Planta* 161:375-380
- Batzri, S. and Korn, E.D. (1973) Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochim. Biophys. Acta* 298:1015-1019
- Beaumont, G., Lord, A. and Grenier, G. (1980) Effets physiologiques de l'atrazine à doses sublétales sur *Lemna minor*. V. Influence sur l'ultrastructure des chloroplastes. *Can. J. Bot.* 58:1571-1577
- Bentham, G. and Hoosker, J.D. 1924 *Handbook of British Flora*, Reeve, L. & Co Ltd,
- Berg, S., Dodge, S., Krogmann, D.W. and Dilley, R.A. (1974) Chloroplast grana membrane carboxyl groups. *Plant. Physiol.* 53:619-627
- Berthold, D.A., Babcock, G.T. and Yocum, C.F. (1981) A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II: preparation from spinach thylakoid membranes. *PEBS Lett.* 134:231-234
- Bervae, J.C.A.M., Ketchie, D.O. and Kuiper, P.J.C. (1987) Lipid composition of pine needle chloroplasts and apple bark tissue as affected by growth temperature and daylength changes. 2. Glycolipids, neutral lipids and chlorophyll. *Physiol. Plant.* 71:425-429
- Bialek-Bylka, G.E. and Wrobel, D. (1986) Temperature-induced spectral properties of chlorophyll a incorporated into egg-yolk lecithin liposomes and lipo-protein complexes. *Acta Biochim. Biophys. Hung.* 21:369-379

- Bishop, D.G. and Kenrick, J.R. (1979) The influence of fatty acid unsaturation on fluidity and molecular packing of chloroplast membrane lipids. In: *Low Temperature Stress in Crop Plants: The Role of the Membrane*, Academic Press, pp 375-389, New York: Lyons, J.M., Graham, D. and Raison, J.K. (eds)
- Bishop, D.G. (1983) Functional role of plant membrane lipids. In: *Biosynthesis and Function of Plant Lipids*, Waverly Press, pp 81-103, Baltimore: Thompson, W.W., Mudd, J.B. and Gibbs, M. (eds)
- Bjorkman, O. (1981) Response to different flux density. In: *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol 12A, Physiological Plant Ecology I, Responses to the Physical Environment*, Springer-Verlag, pp 57-107, Berlin: Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B. and Ziegler, H. (eds)
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959) A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917
- Blumenthal-Goldschmidt, S. and Poljakoff-Mayber, A. (1966) Comparison of the osmotic volume changes in chloroplasts isolated from different plants. *Plant Cell Physiol.* 7:357-362
- Boardman, N.K. (1977) Comparative photosynthesis of sun and shade plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28:355-377
- Brasseur, R., de Meutter, J. and Ruyschaert, J.M. (1984) Mode of insertion of chlorophyll *a* in a lipid layer. A conformational approach. *Biochim. Biophys. Acta* 764:295-300
- Browse, J., McCourt, P. and Somerville, C. (1986) A mutant of *Arabidopsis* deficient in C18:3 and C16:3 leaf lipids. *Plant. Physiol.* 81:859-864
- Bruinsma, J. (1961) A comment on the spectrophotometric determination of chlorophyll. *Biochim. Biophys. Acta* 53:576-578
- Burgert, K.L. and Burnside, O.C. (1972) Optimum temperature of germination and seedling development of Black Nightshade. *Res. Rep. N. Cent. Weed Control, Conf* 56-57
- Burke, J.J., Wilson, R.F. and Swafford, J.R. (1982) Characterization of chloroplast isolated from triazine-susceptible and triazine-resistant biotypes of *Brassica campestris* L. *Plant. Physiol.* 70:24-29
- Caldwell, C.R. (1987) Temperature-induced protein conformational changes in barley root plasma membrane-enriched microsomes. 2. Intrinsic protein fluorescence. *Plant Physiol.* 84:924-929
- Caldwell, C.R. and Whitman, C.E. (1987) Temperature-induced protein conformational changes in barley root plasma membrane-enriched microsomes. 1. Effect of temperature on membrane protein and lipid mobility. *Plant Physiol.* 84:918-923
- Chapman, D. (1983) Biomembrane Fluidity: The concept and its development. In: *Membrane Fluidity in Biology. Volume 2: General Principles*, Academic Press, pp 5-41, New York: Aloia, R.C. (ed.)

- Chapman, D.J., De-Felice, J. and Barber, J. (1983a) Growth temperature effects on thylakoid membrane lipid and protein content of pea chloroplasts. *Plant Physiol.* 72:225-228
- Chapman, D.J., De-Felice, J. and Barber, J. (1983b) Influence of winter and summer growth conditions on leaf membrane lipids of *Pisum sativum* L. *Planta* 157:218-223
- Chapman, D.J.; De-Felice, J. and Barber, J. (1985) Characteristics of chloroplast thylakoid lipid composition associated with resistance to triazine herbicides. *Planta* 166:280-285
- Chapman, D. and Fast, P.G. (1968) Studies of chlorophyll-lipid-water systems. *Science* 160:188-189
- Chapman, D.J., Millner, P.A., Ford, R.C. and Barber, J. (1982) Lipid content of chloroplast thylakoid and regulation of photosynthetic electron transport. In: *Biochemistry and Metabolism of Plant Lipids*, Elsevier, Biomedical Press, pp 363-368, 8.V.: Wintermans, J.F.G.M. and Kuiper, P.J.C. (eds)
- Chin, J.M. and Goldstein, D.B. (1985) Effects of alcohols on membrane fluidity and lipid composition. In: *Membrane Fluidity in Biology*, Academic Press, pp 1-39, London: Aloia, R.C. and Boggs, J.M. (eds)
- Chong, C.S. and Colbow, K. (1976) Light scattering and turbidity measurements on lipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 436:260-282
- Chow, W.S. and Barber, J. (198D) 9-amino-acridine fluorescence changes as a measure of surface charge density of thylakoid membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 589:346-352
- Chow, W.S., Osmond, C.B. and Muang, L.K. (1989) Photosystem II function and herbicide binding sites during photoinhibition of spinach chloroplast *in-vivo* and *in-vitro*. *Photosynth. Res.* 21:17-26
- Colbow, K. (1973) Chlorophyll in phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 31B:4-9
- Colley, C.M. and Metcalfe, J.C. (1972) The localisation of small molecules in lipid bilayers. *PEBS Lett.* 24: 241-246
- Colley, C.M., Metcalfe, S.M., Turner, B., Burgen, A.S.V. and Metcalfe, J.C. (1971) The binding of benzyl alcohol to erythrocyte membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 233:720-729
- Conrad, S.G. and Radosevich, S.R. (1979) Ecological fitness of *Senecio vulgaris* and *Amaranthus retroflexus* biotypes susceptible or resistant to atrazine. *J. Appl. Ecol.* 16:171-177
- Cornell, B.A., Middlehurst, J. and Separovic, F. (198D) The molecular packing and stability within highly curved phospholipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 59B:405-410

- Coster, H.C.L. and Laver, D.R. (1986) The effect of benzyl alcohol and cholesterol on the acyl chain order and alkane solubility of bimolecular phosphatidylcholine membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 861:406-412
- Courteney, A.D. (1968) Seed dormancy and field emergence in *Polygonum aviculare* L. *J. Appl. Ecol.* 5:675-684
- Cullis, P.R., Mope, M.J. and Tilcock, C.P.S. (1986) Lipid polymorphism and the role of lipids in membranes. *Chem. Phys. Lipids* 40:127-144
- Cullis, P.R. and Kruijff de, B. (1979) Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 559:399-420
- Curatolo, W. (1987) The physical properties of glycolipids. *Biochim. Biophys. Acta* 906:111-136
- Darmency, M. and Gasquez, J. (1982) Differential temperature-dependence of the Hill activity of isolated chloroplasts from triazine resistant and susceptible biotypes of *Polygonum lapathifolium* L. *Plant Sci. Lett.* 24:39-44
- Davies, E.C., Chow, W.S. and Jordan, B.R. (1986) A study of factors which regulate the membrane appression of lettuce thylakoids in relation to irradiance. *Photosynth. Res.* 9:359-370
- Davies, H., Jordan, B.R. and Harwood, J.L. (1984) Adaptation of chloroplast lipids to incident light. In: *Structure, Function and Metabolism of Plant Lipids*, Elsevier Science B.V., pp 393-396. Amsterdam: Siegenthaler, P.A. and Eichenberger, W. (eds)
- Dawson, R.M.C. (1969) Enzymatic hydrolysis of monomolecular layers of lipids. In: *Methods in Enzymology*. Vol. XIV. *Lipids*, Academic Press, pp 633-648, New York: Lowenstein, J.M. (ed.)
- Deamer, D.W. and Bramhall, J. (1986) Permeability of lipid bilayers to water and ionic solutes. *Chem. Phys. Lipids* 40:167-188
- Delrieu, M.J. (1981) 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea effects on the oxidizing side of photosystem II. *Photobiochem. Photobiophys.* 3:137-144
- Demant, E.J.F., Op den Kamp, J.A.F. and Van Deenen, L.L.M. (1979) Localization of phospholipids in the membrane of *Bacillus megaterium*. *Eur. J. Biochem.* 95:613-619
- Demel, R.A. and Kruijff de, B. (1976) The function of sterols in membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 457:109-132
- Dilley, R.A., Park, R.B. and Branton, D. (1967) Ultrastructural studies of the light-induced chloroplast shrinkage. *Photochem. Photobiol.* 6:407-412

- Dilley, R.A. and Rothstein, A. (1967) Chloroplast membrane characteristics. *Biochim. Biophys. Acta* 135:427-443
- Dilley, R.A., Theg, S.M. and Beard, W.A. (1987) Membrane-proton interactions in chloroplast bioenergetics: Localized Proton domains. In: *Annual Review of Plant Physiology, Volume 38, Annual Reviews Inc.*, pp 347-389, Palo Alto, California: Briggs, W.R., Jones, R.L. and Walbot, V. (eds)
- Dorne, A.J., Joyard, J. and Douce, R. (1990) Do thylakoids really contain phosphatidylcholine?. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:71-74
- Drechsler, Z. and Neumann, J. (1982) Inhibition of oxygen evolution in chloroplasts by ferricyanide. *Plant. Physiol.* 70:840-843
- Drechsler, Z. and Neumann, J. (1989) Evidence for two types of electron transfer processes through photosystem II. *Photosynth. Res.* 21:187-195
- Dubacq, J.P. and Trémolières, A. (1983) Occurrence and function of phosphatidylglycerol containing-(trans)-hexadecenoic acid in photosynthetic lamellae. *Physiol. Vég.* 21:293-312
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28:350-356
- Ducruet, J.M. and Lemoine, Y. (1985) Increased heat sensitivity of the photosynthetic apparatus in triazine-resistant biotypes from different plant species. *Plant Cell Physiol.* 26:419-429
- Ducruet, J.M. and Ort, D.R. (1988) Enhanced susceptibility of photosynthesis to high leaf temperature in triazine-resistant *Solanum nigrum* L. Evidence for photosystem II D, protein site of action. *Plant Sci.* 56:39-48
- Eaton-Rye, J.J. and Govindjee (1988) Electron transfer through the quinone acceptor complex of photosystem II in bicarbonate-depleted spinach thylakoid membranes as a function of actinic flash number and frequency. *Biochim. Biophys. Acta* 935:237-247
- Eckert, H.J., Toyoshima, Y., Akabori, K. and Dismukes, G.C. (1987) The involvement of lipids in the light-induced charge separation in the reaction center of photosystem II. *Photosynth. Res.* 14:31-41
- Edmonds, J.M. (1979) The biology and Taxonomy of Solanaceae. In: *Biosystematics of Solanum* (Maurella), Academic Press, pp 529-548, London: Haukes, J.L., Lester, R.N. and Svelting, A.D. (eds)
- Eigenberg, K.E. and Chan, S.I. (1980) The effect of surface curvature on the head-group structure and phase transition properties of phospholipid bilayer vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 599:330-335

- Etienne, A.L. (1974) New results on the properties of photosystem II centers blocked by 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea in their different photoactive states. *Biochim. Biophys. Acta* 333:320-330
- Eze, K. and Dumbroff, J. (1982) A comparison of the Bradford and Lowry methods for the analysis of protein in chlorophyllous tissue. *Can. J. Bot.* 60:1046-1049
- Farineau, J. (1986) Effets d'herbicides sur le transfert d'électrons entre les plastoquinones Qa et Qb du photosystème II. Etude par spectroscopie d'absorption dans l'UV. *Physiol. Vég.* 24:463-474
- Farineau, J. and Mathis, P. (1985) Effects of herbicides on binary oscillations of ultraviolet flash-induced absorption changes in chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 808:103-111
- Fedtko, C. 1982. *Biochemistry and Physiology of Herbicide Action*, Berlin: Springer-Verlag, pp. 1-202.
- Ford, R. and Barber, J. (1980) The use of diphenylhexatriene to monitor the fluidity of the thylakoid membrane. *Photochem. Photobiophys.* 1:263-270
- Ford, R.C. and Barber, J. (1983) Time-dependant decay and anisotropy of fluorescence from diphenylhexatriene embedded in the chloroplast thylakoid membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 722:341-348
- Ford, R.C., Chapman, D.J., Barber, J., Pedersen, J.Z. and Cox, R.P. (1982) Fluorescence polarization and spin-label studies of the fluidity of stromal and granal chloroplast membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 681:145-151
- Feast, P.M. and Roberts, H.A. 1970. *Weed seeds Populations*, : Rep. Nat. Veg. Res. Stu., pp. pp 144.
- Fersht, A. (1977) The basic equations of enzyme kinetics. In: *Enzyme Structure and Mechanism*, Freeman, W.H. and Company, pp. 84-102, San Francisco: (ed.)
- Ford, R. and Barber, J. (1980) The use of diphenylhexatriene to monitor the fluidity of the thylakoid membrane. *Photochem. Photobiophys.* 1:263-270
- Ford, R.C. and Barber, J. (1983a) Incorporation of sterol into chloroplast thylakoid membranes and its effect on fluidity and function. *Planta* 158:35-41
- Ford, R.C. and Barber, J. (1983b) Time-dependant decay and anisotropy of fluorescence from diphenylhexatriene embedded in the chloroplast thylakoid membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 722:341-348
- Ford, R.C., Yamamoto, Y. and Barber, J. (1981) Lipid fluidity and photosynthetic electron flow: Effect of cholesterol. In: *Photosynthesis I. Photophysical Processes-Membrane Energization*, Balban International Science Services, pp 617-626, Philadelphia: Akeyunoglou, G. (ed.)

- Fulford, A.J.C. and Peel, W.E. (1980) Lateral pressures in biomembranes estimated from the dynamic of fluorescent probes. *Biochim. Biophys. Acta* 598:237-246
- Carcie-Saudin, J.M. and Aguirre, R. (1983) Comparicion de la germinacion de un biotipo sensible y otro resistente, a la atrazina, de *Solanum nigrum* ssp. *nigrum*. *An. INIA/Ser. Agric.* 23:71-78
- Gardner, G. (1989) A stereochemical model for the active site of photosystem II herbicides. *Photochem. Photobiol.* 49:331-336
- Gaspar, T., Penel, C., Degli Agosti, R. and Greppin, H. (1987) Relations inter-organes: croissance, dominance apicale et floraison. *Annae Biologique XXVI (Pasc 2):*6-99
- Gasquez, J. and Compoin, J.P. (1981) Isoenzymatic variations in populations of *Chenopodium album* L. resistant and susceptible to triazines. *Agroecosystems* 7:1-10
- Gasquez, J., Darmency, H. and Compoin, J.P. (1981) Comparaison de la germination et de la croissance de biotypes sensible et résistant aux triazines chez quatre espèces de mauvaises herbes. *Weed Res.* 21:219-225
- Gasquez, J. (1981) La résistance chloroplastique. 11ème Conférence du Coloma IV:981-1008
- Casquez, J. (1984) Approche génétique des mauvaises herbes: variabilité infraspécifique évolution - résistances. *Recherche Agronomique en Suisse* 23:77-88
- Genz, A. and Holzwarth, J.F. (1986a) Dynamic fluorescence measurements on the main phase transition of dipalmytoylphosphatidylcholine vesicles. *Eur. Biophys. J.* 13:323-330
- Genz, A., Holzwarth, J.F. and Tsong, T.Y. (1986b) The influence of cholesterol on the main transition of unilamellar dipalmytoylphosphatidylcholine vesicles. *Biophys. J.* 50:1043-1051
- Giardi, M.T., Marder, J.B. and Barber, J. (1988) Herbicide binding to the isolated photosystem II reaction centre. *Biochim. Biophys. Acta* 934:64-71
- Giroud, C. (1986) Etude comparative de la distribution et du rôle des lipides dans le prothylacoïde et le thylacoïde mature d'avoine. Thèse, Université de Neuchâtel
- Giroud, C. and Siegenthaler, P.A. (1984) Study of the distribution of phospholipids in prothylakoids and thylakoids from oat and spinach. In: *Structure, Function and Metabolism of Plant Lipids*, Elsevier Science, pp 413-416, Amsterdam: Siegenthaler, P.A. and Eichenberger, W. (eds)

- Giroud, C. and Siegenthaler, P.A. (1988) Development of oat prothylakoids into thylakoids during greening does not change transmembrane galactolipid asymmetry but preserves the thylakoid bilayer. *Plant. Physiol.* 88:412-417
- Givelberg, A. and Horowitz, M. (1984) Germination of *Solanum nigrum* seeds. *J. Exp. Bot.* 153:588-598
- Givelberg, A., Poljakoff-Mayber, A. and Kleifel, J. (1984) Germination of *Solanum nigrum* seeds of a local variety. *Hassadeh* 65:178-181
- Goltsev, V., Yordanov, I., Stoyanova, T. and Venediktov, P. (1987) High-temperature damage and acclimation of the photosynthetic apparatus. 1. temperature sensitivity of some photosynthetic parameters of chloroplast isolated from acclimated and non-acclimated bean leaves. *Planta* 170:471-477
- Gombos, Z., Barabas, K., Joo, F. and Vigh, L. (1988) Lipid saturation induced microviscosity increase has no effect on the reducibility of flashoxidized cytochrome *f* in pea thylakoids. *Plant Physiol.* 86:335-337
- Goodrich, R.P., Handel, T.M. and Baldeschwieler, J.D. (1988) Modification of lipid phase behavior with membrane-bound cryoprotectants. *Biochim. Biophys. Acta* 938:143-154
- Gounaris, K. and Barber, J. (1985) Isolation and characterisation of a photosystem II reaction centre lipoprotein complex. *FEBS Lett.* 188:68-72
- Gounaris, K., Brain, A.P.R., Quinn, P.J. and Williams, W.P. (1983a) Structural and functional changes associated with heat-induced phase-separations of non-bilayer lipids in chloroplast thylakoid membranes. *FEBS Lett.* 153:47-52
- Gounaris, K., Brain, A.R.R., Quinn, P.J. and Williams, W.P. (1984) Structural reorganisation of chloroplast thylakoid membranes in response to heat-stress. *Biochim. Biophys. Acta* 766:198-208
- Gounaris, K., Mannock, D.A., Sen, A., Brain, A.P.R., Williams, W.P. and Quinn, P.J. (1983d) Polyunsaturated fatty acyl residues of galactolipids are involved in the control of bilayer/non-bilayer lipid transition in higher plant chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 732:229-242
- Gounaris, K., Sen, A., Brain, A.P.R., Quinn, P.J. and Williams, W.P. (1983a) The formation of non-bilayer structures in total polar lipid extracts of chloroplast membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 728:129-139
- Gounaris, K., Sunby, C., Andersson, B. and Barber, J. (1983b) Lateral heterogeneity of polar lipids in the thylakoid membranes of spinach chloroplasts. *FEBS Lett.* 156:170-174

- Gounaris, K., Whitford, D. and Barber, J. (1983c) The effect of thylakoid lipids on an oxygen-evolving photosystem II preparation. *FEBS Lett.* 163:230-234
- Govindjee and Coleman, W.J. (1990) How plants make oxygen. *Sci. Americ.* February:42-51
- Graan, T. and Ort, D.R. (1986) Detection of oxygen-evolving photosystem II centers inactive in plastoquinone reduction. *Biochim. Biophys. Acta* 852:320330
- Gratani, L. and Fiorentino, E. (1986) Relationship between chlorophyll content and leaf biomass for *Quercus ilex* in a mediterranean maquis stand. *Photosynthetica* 20:267-273
- Grenier, G., Proteau, L., Marier, J.P. and Beaumont, G. (1987) Effects of sublethal concentration of atrazine on the chlorophyll and lipid composition of chlorophyll-protein complexes of *Lemna minor*. *Plant Physiol. Biochem.* 25:409-413
- Gremaud, M. 1981. *Recherche de taxonomie expérimentale sur Cardus defloratus L. s l (Compositae)*, Neuchâtel: Bibliothèque de botanique de l'Université de Neuchâtel (cote PSO),
- Gressel, J. (1979) *Plant Regulation and World Agriculture*, Plenum Press: Scott, T.V.,
- Gressel, J., Ammon, H.U., Fogelfors, H., Gasquez, J., Kay, Q.O.N. and Kees, H. (1982) Discovery and distribution of herbicide-resistant weeds outside North America. In: *Herbicide Resistance in Plants*, Wiley-Interscience, John Wiley & sons, pp 31-55, New York: LeBaron, H.M. and Gressel, J. (eds)
- Gressel, J. and Segel, L.A. (1978) The paucity of plants evolving genetic resistance to herbicides: possible reasons and implications. *J. Theor. Biol.* 75:349-371
- Gressel, J. and Segel, L.A. (1982) Interrelating factors controlling the rate of appearance of resistance: The outlook for the future. In: *Herbicide Resistance in Plants*, Wiley-Interscience, John Wiley & sons, pp 325-348, New York: LeBaron, H.M. and Gressel, J. (eds)
- Haehnel, W. (1984) Photosynthetic electron transport in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35:659-693
- Häfliger, E. and Brun-Hool, J. (1968) *Tables des adventices Geigy*. Documenta Ciba Geigy
- Haldane, J.B.S. (1960) More precise expressions for the cost of natural selection. *J. Genet.* 57:351
- Hall, D.O. and Rao, K.K. (1989) Immobilized photosynthetic membranes and cells for the production of fuels and chemicals. *Chimicaoggi* 7:41-47

- Harding, S.A., Guikema, J.A. and Paulsen, G.M. (1990) Photosynthetic decline from high temperature stress during maturation of wheat. 1. Interaction with senescence processes. *Plant. Physiol.* 92:648-653
- Harwood, J.L. (1980) Plant acyl lipids: Structure, distribution, and analysis. In: *The Biochemistry of Plants. A Comprehensive treatise. Lipids: Structure and Function, Volume 4*, Academic Press, pp 1-55, New York: Stumpf, P.K. (ed.)
- Harwood, J.L. (1984) Effects of the environment on the acyl lipids of algae and higher plants. In: *Structure, Function and Metabolism of Plant Lipids*, Elsevier Science, pp 543-550, Amsterdam: Siegenthaler, P.A. and Eichenberger, W. (eds)
- Havaux, M. (1987) Effects of chilling on the redox state of the primary electron acceptor  $Q_A$  of photosystem II in chilling-sensitive and resistant plant species. *Plant Physiol. Biochem.* 25:735-743
- Havaux, M. (1989) Comparison of atrazine-resistant and -susceptible biotypes of *Senecio vulgaris* L.: Effects of high and low temperatures on the *in vivo* photosynthetic electron transfer in intact leaves. *J. Exp. Bot.* 40:849-854
- Havaux, M. and Lannoye, R. (1983) Temperature dependence of delayed chlorophyll fluorescence in intact leaves of higher plants. A rapid method for detecting the transition of thylakoid membrane lipids. *Photosynth. Res.* 4:257-263
- Heller, R. 1979 *Physiologie Végétale*, Paris: Masson, Ed. 2
- Henry, L.E.A., Strasser, R.J. and Siegenthaler, P.A. (1982) Alteration in the acyl lipid composition of thylakoid induced by aging and its effect on thylakoid structure. *Plant. Physiol.* 69:531-536
- Hinz, H.J. and Sturtevant, J.H. (1972) Calorimetric studies of dilute aqueous suspensions of bilayers formed from synthetic 1-alpha-*lecithins*. *The J. Biol. Chem.* 19:6071-6075
- Hirschberg, J., Bleecker, A., Kyle, D.J. and McIntosh, L. (1984) The molecular basis of triazine-herbicide resistance in higher-plant chloroplasts. *Z. Naturforsch.* 39c:412-420
- Holm, L.G., Plunkett, D.L., Pancho, J.V. and Herberger, J.P. (1977) . In: *The World's Worst Weeds Distribution and Biology*, Univ. Press of Hawaii, pp 609, Honolulu:
- Holt, J.S. and Goffner, D.P. (1985) Altered leaf structure and function in triazine-resistant common groundsel (*Senecio vulgaris*). *Plant. Physiol.* 79:699-705
- Holt, J.S., Stemler, A.J. and Radosevich, S.R. (1981) Differential light response of photosynthesis by triazine-resistant and triazine susceptible *Senecio vulgaris* biotypes. *Plant Physiol.* 67:744-748

- Hongladarom, T. and Honda, S.I. (1966) Reversible swelling and contraction of isolated spinach chloroplasts. *Plant. Physiol.* 41:1686-1694
- Horvath, G., Droppa, M., Hideg, E., Rozsa, Z. and Farkas, T. (1989) The role of phospholipids in regulating photosynthetic electron transport activities: Treatment of chloroplasts with phospholipase A2. *J. Photochem. Photobiol.* 3:515-527
- Horvath, G., Droppa, H. and Melis, A. (1984) Herbicide action on photosystem II in spinach chloroplast: concentration effect on PSIIa and PSIIb. *Photobiochem. Photobiophys.* 7:249-256
- Horvath, G., Droppa, H., Szito, T., Mustardy, L.A., Horvath, L.I. and Vigh, L. (1986) Homogeneous catalytic hydrogenation of lipids in the photosynthetic membrane: effects on membrane structure and photosynthetic activity. *Biochim. Biophys. Acta* 849:325-336
- Horvath, I., Mansourian, A.R., Vigh, L., Thomas, P.G., Joo, F. and Quinn, P.J. (1986) Homogeneous catalytic hydrogenation of the polar lipids of pea chloroplasts *in situ* and the effects on lipid polymorphism. *Chem. Phys. Lipids* 39:251-264
- Horvath, G., Melis, A., Hideg, E., Droppa, H. and Vigh, L. (1987) Role of lipids in the organization and function of photosystem II studied by homogenous catalytic hydrogenation of thylakoid membranes *in situ*. *Biochim. Biophys. Acta* 891:68-74
- Hoshina, S. (1981) Temperature dependence of optical properties of chlorophyll *a* incorporated into phosphatidylcholine liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 638:334-340
- Hoshina, S. (1983) Temperature-induced change of chlorophyll *a* forms in phosphatidylcholine liposomes. *Plant Cell Physiol.* 24:937-940
- Hoshina, S. and Itoh, S. (1987) Characterization of photosystem I chlorophyll-protein complexes reconstituted into phosphatidylcholine liposomes. *Plant Cell Physiol.* 28:599-609
- Hoshina, S. and Nishida, K. (1975) Photoswelling and light-inactivation of isolated chloroplast. II. Functional and structural changes in isolated chloroplasts under the influence of lysolecithin. *Plant Cell Physiol.* 16:475-484
- Houslay, M.D. and Stanley, K.K. 1982. *Dynamics of Biological Membranes*, New York: John Wiley,
- Hsu, B.D., Lee, J.Y. and Pan, R.L. (1986) The two binding sites for DCMU in photosystem II. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 141:682-688
- Huner, N.P.A., Krol, M., Williams, J.P., Maissan, E. and Low, P.S. (1987) Low temperature development induces a specific decrease in *trans*-3-hexadecenoic acid content which influences LHCII organization. *Plant Physiol.* 84:12-18

- Ireland, C.R., Tefler, A., Covello, P.S., Baker, N.R. and Barber, J. (1988) Studies on the limitations to photosynthesis in leaves of the atrazineresistant mutant of *Senecio vulgaris*. *Pianta* 173:459-467
- Janiak, M.J., Small, O.H. and Shipley, G.G. (1976) Nature of the thermal pretransition of synthetic phospholipids: dimyristoyl- and dipalmitoyllecithin. *Biochemistry* 15:4575-4580
- Jansen, M.A.K., Hob, J.H., Wesseliuss, J.C. and Rensen van, J.S. (1986) Comparison of photosynthetic activity and growth performance in triazineresistant and susceptible biotypes of *Chenopodium album*. *Physiol. Veg.* 24:475-484
- Jansen, M.A.K., Shaaltiel, Y., Kazzes, O., Canaani, O., Malkin, S. and Gressel, J. (1989) Increased tolerance to photoinhibitory light in paraquat-resistant *Conyza bonariensis* measured by photoacoustic spectroscopy and  $^{14}$  CO<sub>2</sub>-fixation. *Plant. Physiol.* 91:1174-1178
- Johnson, G. and Williams, J.P. (1989) Effects of growth temperature on the biosynthesis of chloroplastic galactosyldiacylglycerol molecular species in *Brassica napus* leaves. *Plant. Physiol.* 91:924-929
- Jornod, G. (1987) Observations météorologiques faites en 1986 à l'Observatoire cantonal de Neuchâtel. *Bulletin de la Société Neuchâtoise des sciences naturelles* 110:125-132
- Jursinic, P. and Dennenberg, R. (1989) Measurement of stoichiometry of photosystem II to photosystem I reaction centers. *Photosynth. Res.* 21:197-200
- Jursinic, P. and Stemler, A. (1983) Changes in [ $^{14}$ C]atrazine binding associated with the oxidation-reduction state of the secondary quinone acceptor of photosystem II. *Plant Physiol.* 73:703-708
- Keeley, P.E. and Thullen, R.J. (1983) Influence of planting date on the growth of black nightshade (*Solanum nigrum*). *Weed Sci.* 31:180-184
- Koch, W. (1970) Temperaturansprüche von Unkräutern bei der Keimung. *Saatgut Wirtschaft* 22:85-86
- Kantor, H.L., Mabrey, S., Prestegard, J.H. and Sturtevant, J.M. (1977) A calorimetric examination of stable and fusing lipid bilayer vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 566:402-410
- Kates, M. 1972. *Techniques in Lipidology*, North Holland: Elsevier
- Katz, J.J. (1979) Chlorophyll - lipid interactions. In: *Advances in the Biochemistry and Physiology of Plant Lipids*, Elsevier, Biochemical Press, pp 37-56, North-Holland: Appelqvist, L.A. and Lijenberg, C. (eds)
- Ketchie, D.O., Berwaes, J.C.A.M. and Kuiper, P.J.C. (1987) Lipid composition of pine needle chloroplasts and apple bark tissue as affected by growth temperature and daylength changes. 1. Phospholipids. *Physiol.Plant.* 71:419-424

- Kluge, M. (1983) Crassulacean acid metabolism. In: *Photosynthesis, Development, Carbon, Metabolism and Plant Productivity, Volume II*. Academic Press, pp 231-262. : Govindjee (ed.)
- Koch, W. (1970) Temperaturansprüche von Unkräutern bei der Keimung. *Saatgut Wirtschaft* 22:85-86
- Kralnev, A.G. and Vainer, L.M. (1989) Penetration of ascorbate acid into bilayer phospholipid membranes Plenum Publish. Corp. 2979:1703-1709
- Kremer, J.M.H., Kops-Werkhofen, M.M., Pathmanoharan, C., Gijzeman, O.L.J. and Wiersema, P.H. (1977a) Phase diagrams and the kinetics of phospholipid exchange for vesicles of different composition and radius. *Biochim. Biophys. Acta* 471:177-188
- Kremer, J.M.H., Esker van de, M.W.J., Pathmanoharan, C. and Wiersema, P.H. (1977b) Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method. *Biochemistry* 16:3932-3935
- Krupa, Z., Huner, N.P.A., Williams, J.P., Maissan, E. and James, O.R. (1987) Development at cold-hardening temperatures. *Plant Physiol.* 84:19-24
- Kaniuga, Z., Sochanowicz, B., Zabek, J. and Krzystyniak, K. (1978) Photosynthetic apparatus in chilling-sensitive plants. I. Reactivation of Hill reaction activity inhibited on the cold and dark storage of detached leaves and intact plants. *Planta* 140:121-128
- Katagiri, C., Owen, J.S., Quinn, P.J. and Chapman, O. (1981) Hydrogenation of plasma lipoproteins by water-soluble catalyst; its use as a structural probe. *Eur. J. Biochem.* 118:335-338
- Kenrick, J.R. and Bishop, D.G. (1986) The fatty acid composition of phosphatidylglycerol and sulfoquinovosyldiacylglycerol of higher plants in relation to chilling sensitivity. *Plant Physiol.* 81:946-949
- Ketchie, D.O., Bervae, J.C.A.M. and Kuiper, P.J.C. (1987) Lipid composition of pine needle chloroplasts and apple bark tissue as affected by growth temperature and daylength changes. 1. Phospholipids. *Physiol.Plant.* 71:419-424
- Khanna, R., Pfister, K., Keresztes, A., Rensen van, J.S. and Govindjee (1981) Evidence for close spatial location of the binding sites for CO<sub>2</sub> and for photosystem II inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* 634:105-116
- Krupa, Z. (1983) The action of lipase on chloroplast membrane: 2. Polypeptide patterns of bean galactolipase- and phospholipase A<sub>2</sub>-treated thylakoid membranes. *Photosynth. Res.* 4:229-239
- Kulshreshtha, S., Mishra, D.P. and Gupta, R.K. (1987) Changes in contents of chlorophyll, proteins and lipids in whole chloroplast and chloroplast membrane fractions at different leaf water potentials in drought resistant and sensitive genotypes of wheat. *Photosynthetica* 21:65-70

- Kunst, L., Browse, J. and Somerville, C. (1989) Enhanced thermal tolerance in a mutant of *Arabidopsis* deficient in palmitic acid unsaturation. *Plant Physiol.* 91:401-408
- Kyle, D.J. (1985) The 32000 Dalton Qb protein of photosystem II. *Photochem. Photobiol.* 41:107-116
- Laasch, H. (1987) Non-photochemical quenching of chlorophyll a fluorescence in isolated chloroplasts under conditions of stressed photosynthesis. *Planta* 171:220-226
- Laasch, H., Pfister, K. and Urbach, W. (1981) Comparative binding of photosystem II-herbicides to isolated thylakoid membranes and intact algae. *Z. Naturforsch.* 36c:1041-1049
- Laasch, H., Pfister, K. and Urbach, W. (1982) High- and low-affinity binding of photosystem II herbicides to isolated thylakoid membranes and intact algal cells. *Z. Naturforsch.* 37c:620-631
- Laasch, H., Schreiber, U. and Urbach, W. (1984) Binding of radioactively labelled DCMU in dependence of the redox state of the photosystem II acceptor side. In: *Advances in Photosynthesis Research IV*, Nijhoff, M./Dr Junk, W., pp 25-28, The Hague: Sybesma, G. (ed.)
- Laasch, H., Urbach, W. and Schreiber, U. (1983) Binary flash-induced oscillations of [<sup>14</sup>C]DCMU binding to the photosystem II acceptor complex. *FEBS Lett.* 159:275-279
- Landolt, R.E. (1977) *Oekologische Zeigerwerte zur Schweizer Flora*, Zurich: Presse de l'EPFZ,
- Laroche, A., Beaumont, G. and Grenier, G. (1989) Analyse des lipides des chloroplastes isolés de *Lemna minor* en présence d'une concentration sublétales d'atrazine. *Plant Physiol. Biochem.* 27:93-97
- Lauer, E. (1953) Ueber die Keimtemperatur von Ackerunkräutern und deren Einfluss auf die Zusammensetzung von Unkrautgesellschaften. *Flora Jena* 140:551-595
- Lawaczeck, R., Masatsune, K., Girardet, J.L. and Sunney, I.C. (1975) Effects of structural defects in sonicated phospholipid vesicles on fusion and ion permeability. *Nature* 256:584-586
- LeBaron, H. (1990) Weed control feature. *GIPAP Bulletin* 16 (4) 3-5
- Lee, A.G. (1975a) Segregation of chlorophyll *a* incorporated into lipid bilayers. *Biochemistry* 14:4397-4402
- Lee, A.G. (1975b) Fluorescence studies of chlorophyll *a* incorporated into lipid mixtures, and the interpretation of "phase" diagrams. *Biochim. Biophys. Acta* 413:11-23
- Lee, A.G. (1976) Immiscibility in phosphatidylcholine-cholesterol mixtures. *FEBS Lett.* 62:359-363

- Lee, A.G. (1977) Lipid phase transitions and phase diagrams. 1. Lipid phase transitions. *Biochim. Biophys. Acta* 472:237-281
- Lee, A.G. (1983) Lipid phase transition and mixtures. In: *Membrane Fluidity in Biology*, Academic Press, Vol.2, pp 43-88, London: Aloia, R.G. (ed.)
- Lee, A.G., East, J.M. and Froud, R.J. (1986) Are essential fatty acids essential for membrane function ?. *Prog. Lipid Res.* 25:41-46
- Lehoczki, E., Laskay, G., Pölös, E. and Mikulas, J. (1984) Resistance to triazine herbicides in horsweed (*Conyza canadensis*). *Weed Sci.* 32:669-674
- Lehoczki, E., Pölös, E., Laskay, G. and Farkas, T. (1985) Chemical composition and physical states of chloroplast lipids related to atrazine resistance in *Conyza canadensis* L. *Plant Sci.* 42:19-24
- Lemoine, Y., Dubacq, J.P. and Ducruet, J.M. (1983) Modification de l'appareil photosynthétique et de sa stabilité thermique chez une population de navette (*Brassica campestris*) résistante à l'atrazine. *Actes du sixième congrès international sur le colza* 1:197-202
- Lenaz, G. and Curatola, G. (1975) Perturbation of membrane fluidity. *J. Bioenerget.* 7:223-299
- Leong, T.Y. and Anderson, J.M. (1983) Changes in composition and function of thylakoid membranes as a result of photosynthetic adaptation of chloroplasts from pea plants grown under different light conditions. *Biochim. Biophys. Acta* 723:391-399
- Li, G., Horvath, L.I., Knowles, P.F., Murphy, D.J. and Marsh, D. (1989a) Spin label saturation transfer ESR studies of protein-lipid interactions in photosystem II-enriched membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 987:187-192
- Li, G., Knowles, P.F., Murphy, D.J. and Marsh, D. (1990) Lipid-protein interactions in stacked and destacked thylakoid membranes and the influence of phosphorylation and illumination. Spin label ESR studies. *Biochim. Biophys. Acta* 1024:278-284
- Li, G., Knowles, P.F., Murphy, D.J., Nishida, I. and Marsh, D. (1989b) Spin-label ESR studies of lipid-protein interaction in thylakoid membranes. *Biochemistry* 28:7446-7452
- Lichtenhaler, H.K. (1981) Adaptation of leaves and chloroplast to high quanta fluence rates. In: *Photosynthesis and Productivity, Photosynthesis and Environment VI*, Salaban International Services, pp 273-287, Philadelphia: Akoyunoglou, G. (ed.)
- Lichtenhaler, H.K. (1989) Plant lipid biosynthesis as target for herbicides. In: *Biological Role of Plant Lipids*, Plenum Publishing Corporation, pp 389-400, New York: Siacs, P.A., Cruz, K. and Kremmer, T. (eds)

- Lichtenthaler, H.K., Kuhn, G., Prenzel, H. and Meier, D. (1982) Chlorophyll-protein levels and degree of thylakoid stacking in radish chloroplasts from high-light, low-light and bentazon-treated plants. *Physiol. Plant.* 56:183-188
- Lockau, W. (1979) The inhibition of photosynthesis electron transport in spinach chloroplasts by low osmolarity. *Eur. J. Biochem.* 94:365-373
- Lynch, D.V., Lepock, J.R. and Thompson, J.E. (1987) Temperature-induced changes in lipid fluidity alter the conformation of proteins in senescing plant membranes. *Plant Cell Physiol.* 28:787-797
- Lyons, J.M. (1973) Chilling injury in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24:445-466
- MacDonald, G. (1978) A dilatometric investigation of the effects of general anesthetic, alcohol and hydrostatic pressure on the phase transition in smectic mesophase of dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta* 507:28-37
- Mackinney, G. (1941) Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.* 140:315-322
- Mäenpää, P., Aro, E.M., Somersalo, S. and Tyystjärvi, E. (1988) Rearrangement of the chloroplast thylakoid at chilling temperature in the light. *Plant Physiol.* 87:762-766
- Mansourian, A.R. and Quinn, P.J. (1986) Phase properties of binary mixtures of monogalactosyldiacylglycerols differing in hydrocarbon chain substituents dispersed in aqueous systems. *Biochim. Biophys. Acta* 855:169-178
- Markwell, M.A.K., Haas, S.M., Tolbert, N.E. and Bieber, L.L. (1981) Protein Determination in Membrane and Lipoprotein Sample: Manual and Automated Procedures. *Methods in Enzymology* 72, Part D:296-303
- Marriage, P.B. and Warwick, S.I. (1980) Differential growth and response to atrazine between and within susceptible and resistant biotypes of *Chenopodium album*. *Weed Res.* 20:9-15
- McCourt, P., Kunst, L., Browse, J. and Somerville, C.R. (1987) The effects of reduced amounts of lipid unsaturation on chloroplast ultrastructure and photosynthesis in a mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 84:353-360
- McIntosh, T.J. (1980) Difference in hydrocarbon chain tilt between hydrated phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine bilayers. *Biophys. J.* 29:237-246
- McMahon, V. (1979) A proposed model for sudden fluidity changes. In: *Advances in the Biochemistry and Physiology of Plant Lipids*, Elsevier, Biomedical Press, pp 215-218, North-Holland: Appelqvist, L.A. and Lijenberg, C. (eds)

- Marsh, D. and Smith, I.C.P. (1973) An interaction spin label study of fluidizing and condensing effects of cholesterol on lecithin bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 29E:133-144
- Mathis, P. and Maveman, J. (1977) Analysis of absorption changes in the ultraviolet related to charge-accumulating electron carriers in photosystem II of chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 461:161-181
- Mattoo, A.K., St. John, J.B. and Wergin, W.P. (1984) Adaptive reorganization of protein and lipid components in chloroplast membranes associated with herbicide binding. *J. Cell. Biochem.* 24:163-175
- Melis, A. (1978) Oxidation-reduction potential dependence of the two kinetic components in chloroplast system II primary photochemistry. *FEBS Lett.* 95:202-206
- Milivojevic, D. and Markovic, D. (1989) Effects of linuron and monolinuron herbicides on pea chloroplasts. *Photosynthetica* 23:386-389
- Miller, M., Pedersen, J.Z. and Cox, R.P. (1988) Effect of growth temperature on membrane dynamics in thermophilic cyanobacterium: a spin label study. *Biochim. Biophys. Acta* 943:501-510
- Millner, P.A. and Barber, J. (1984) Plastoquinone as a mobile redox carrier in the photosynthetic membrane. *FEBS Lett.* 169:1-6
- Millner, P.A., Chapman, D.J. and Barber, J. (1984b) The effect of chloroplast coupling factor ATP synthetase (CF<sub>1</sub>CF<sub>0</sub>) reconstitution on fluidity properties of isolated thylakoid lipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 765:282-287
- Millner, P.A., Chapman, D.J., Mitchell, R.A.C. and Barber, J. (1984a) Modulation of membrane fluidity by chloroplast thylakoid lipid to protein ratio. In: *Structure, Function and Metabolism of Plant Lipids*, Elsevier Science, pp 433-436, Amsterdam: Siegenthaler, P.A. and Eichenberger, W. (eds)
- Millner, P.A., Grouzis, J.P., Chapman, D.J. and Barber, J. (1983) Lipid enrichment of thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 722:331-340
- Misr, A.N. and Meena, M. (1986) Effect of temperature on senescing detached rice leaves: I. Photoelectron transport activity of chloroplasts. *Plant Sci.* 46:1-4
- Montegut, J. (1984) Causalit de la r partition des mauvaises herbes, espèces indicatrices du biotope cultural. *Recherche Agronomique en Suisse* 23:15-46
- Morgan, C.G., Sandhu, S.S., Yianni, Y.P. and Dodd, N.J.F. (1987) The phase behaviour of dispersion of Bis-Azo PC: photoregulation of bilayer dynamics via lipid photochromism. *Biochim. Biophys. Acta* 903:495-503

- Murata, N. (1969) Control of excitation transfer in photosynthesis. II. Magnesium ion-dependant distribution of excitation energy between two pigment systems in spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 189:171-181
- Murata, N. (1983) Molecular species composition of phosphatidylglycerols from chloroplast-sensitive and chloroplast-resistant plants. *Plant Cell Physiol.* 24:81-86
- Murata, N. and Fork, D.C. (1977) Temperature dependence of chlorophyll a fluorescence in lettuce and spinach chloroplast at sub-zero temperatures. *Plant Cell Physiol.* 18:1265-1271
- Murata, N. and Sato, N. (1978) Studies on the absorption spectra of chlorophyll a in aqueous dispersion of lipids from the photosynthetic membranes. *Plant Cell Physiol.* 19:401-410
- Murata, N., Sato, N., Takahashi, N. and Hamazaki, Y. (1982) Composition and positional distributions of fatty acids in phospholipids from leaves of chilling-sensitive and chilling-resistant plants. *Plant Cell Physiol.* 23:1071-1079
- Murata, N., Troughton, J.M. and Fork, D.C. (1975) Relationship between the transition of the physical phase of membrane lipids and photosynthetic parameters in *Anacystis nidulans* and lettuce and spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* 56:508-517
- Mvé Akamba, L. and Siegenthaler, P.A. (1980) Effet de l'acide linoléique sur la photosynthèse de chloroplastes intacts de feuilles d'Épinard. V. Modification de la distribution des intermédiaires du cycle de réduction du CO<sub>2</sub> entre le stroma et le milieu extérieur. *Physiol. Veg.* 18:689-701
- Murphy, D.J. (1986a) Structural properties and molecular organization of the acyl lipids of photosynthetic membranes. In: *Encyclopedia of Plant Physiology (Photosynthesis III) 19 New Series*, Springer-Verlag, pp 713-725, Berlin: Staehelin, L.A. and Arntzen, C.J. (eds)
- Murphy, D.J. (1986b) The molecular organisation of the photosynthetic membranes of higher plants. *Biochim. Biophys. Acta* B64:33-94
- Murphy, D.J. and Woodrow, I.E. (1983a) The lateral segregation model. A new paradigm for acyl lipids in molecular organization of photosynthetic membranes. In: *Biosynthesis and Function of Plant Lipids*, Waverly Press, pp 104-125, Baltimore: Thompson, W.W., Mudd, J.B. and Gibbs, M. (eds)
- Murphy, D.J. and Woodrow, I.E. (1983b) Lateral heterogeneity in the distribution of thylakoid membrane lipid and protein components and its implications for the molecular organisation of photosynthetic membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 725:104-112

- Needham, L., Whetton, A.D. and Nouslay, M.D. (1982) The local anesthetic and bilayer fluidising agent benzyl alcohol decreases the thermostability of the integral membrane protein adenylate cyclase. *FEBS Lett.* 140:85-88
- Neumann, W., Laasch, M. and Urbach, W. (1987) Mechanisms of herbicide sorption in microalgae and the influence of environmental factors. *Pestic. Biochem. Physiol.* 27:189-200
- Nicholls, P., West, J. and Bangham, A.D. (1974) Chlorophyll *b* containing liposomes: effect of thermal transitions on catalytic and spectral properties. *Biochim. Biophys. Acta* 363:190-201
- Nishimura, K., Kawata, T., Asada, K. and Nakajima, M. (1975) Effect of Hill reaction inhibitors on the photoreduction of ferricyanide and cyclic photophosphorylation by spinach chloroplasts. *Agr. Biol. Chem.* 39:867-872
- Nolan, W.G. (1988) Effects of temperature on electron transport activities of glutaraldehyde-fixed pea thylakoids. *Physiol. Plant.* 74:257-261
- Nolan, W.G. and Smillie, R.M. (1976) Multi-temperature effects on Hill reaction activity of barley chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 440:461-475
- Nolan, W.G. and Smillie, R.M. (1977) Temperature induced changes in Hill activity of chloroplasts isolated from chilling-sensitive and chilling-resistant plants. *Plant Physiol.* 59:1141-1145
- Norman, H.A. and St. John, J.B. (1986) Metabolism of unsaturated monogalactosyldiacylglycerol molecular species in *Arabidopsis thaliana* reveals different sites and substrates for linolenic acid synthesis. *Plant. Physiol.* 81:731-736
- Norman, H.A. and St. John, J.B. (1987) Differential effects on a substituted pyridazinone, BASF 13-338, on pathways of monogalactosyldiacylglycerol synthesis in *Arabidopsis*. *Plant. Physiol.* 85:684-688
- Nugent, J.H.A., Corrie, A.R., Demetriou, C., Evans, M.C.W. and Lockett, G.J. (1988) Bicarbonate binding and the properties of photosystem II electron acceptors. *FEBS Lett.* 235:71-75
- Oettmeier, W. and Masson, K. (1980) Synthesis and thylakoid membrane binding of the radioactively labeled herbicide dinoseb. *Pestic. Biochem. Physiol.* 14:86-97
- Oettmeier, W., Masson, K., Fedtke, C., Konze, J. and Schmidt, R.R. (1982) Effect of different photosystem II inhibitors on chloroplasts isolated from species either susceptible or resistant toward s-triazine herbicides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 18:357-367
- Ogg, A.G. jr. and Dawson, J.H. (1984) Time emergence of eight weed species. *Weed Sci.* 32:327-335

- Ogg, A.G.jr., Rogers, B.S. and Schilling, E.E. (1981) Characterization of black night shade (*Solanum nigrum*) and related species in the United States. *Weed Sci.* 29:27-32
- O'Leary, T.J., Ross, P.D. and Levin, I.W. (1986) Effects of anesthetic tetradecenols on phosphatidylcholine phase transitions. *Biophys. J.* 50:1053-1059
- Oldfield, E. and Chapman, D. (1972) Dynamics of lipids in membranes: heterogeneity and the role of cholesterol. *FEBS Lett.* 23:285-297
- Olsen, L.F. (1984) Electron transfer reactions involving plastoquinone in stacked and unstacked thylakoids. In: *Advances in Photosynthesis Research, Vol. III*, Nijhoff, M./Dr Junk, W., pp 71-74, The Hague: Sybesma, C. (ed.)
- Op den Kamp, J.A.F. (1979) Lipid asymmetry in membranes. *Ann. Rev. Biochem.* 48:47-71
- Öquist, G. (1982) Seasonally induced changes in acyl lipids and fatty acids of chloroplast thylakoids of *Pinus sylvestris*. *Plant Physiol.* 69:869-875
- Öquist, G. (1983) Effects of low temperature on photosynthesis. *Plant Cell Environ.* 6:281-300
- Öquist, G. and Hellgren, N.O. (1976) The photosynthetic electron transport capacity of chloroplasts prepared from needles of unhardened and hardened seedlings of *Pinus sylvestris*. *Plant Sci. Lett.* 7:359-369
- Orr, G.R. and Raison, J.K. (1987) Compositional and thermal properties of thylakoid polar lipids of *Nerium oleander* L. in relation to chilling sensitivity. *Plant Physiol.* 84:88-92
- Orr, G.R. and Raison, J.K. (1990) The effect of changing the composition of phosphatidylglycerol from thylakoid polar lipids of oleander and cucumber on the temperature of the transition related to chilling injury. *Planta* 181:137-143
- Ort, D.R. (1986) Energy transduction in Oxygenic photosynthesis: An overview of structure and mechanism. In: *Encyclopedia of Plant Physiology, Photosynthesis III, New Series, Vol. 19*, Springer-Verlag, pp 143-196, Berlin: Staehelin, L.A. and Arntzen, C.J. (eds)
- Ort, D.R., Ahrens, W.H., Martin, B. and Stoller, E.W. (1983) Comparison of photosynthetic performance in triazine-resistant and susceptible biotypes of *Amaranthus hybridus*. *Plant Physiol.* 72:925-930
- Ort, D.R. and Baker, N.R. (1988) Consideration of photosynthetic efficiency at low light as a major determinant of crop photosynthetic performance. *Plant Physiol. Biochem.* 26:555-565

- Packer, L. and Murakami, S. (1972) Methods for measurements of chloroplast volume and structure *in vitro* and *in vivo*. In: *Methods in Enzymology, Photosynthesis and nitrogen Fixation, Part B, Vol XXIV*, Academic Press, pp 181-205, New York: San Pietro, A. (ed.)
- Packer, L., Siegenthaler, P.A. and Nobel, P.S. (1965) Light-induced high-amplitude swelling of spinach chloroplasts. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 18:474-477
- Pak, Y., Joo, F., Vigh, L., Katho, A. and Thompson, G.A. jr. (1990) Action of a homogeneous hydrogenation catalyst on living *Tetrahymena mimbres* cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1023:230-238
- Papahadjopoulos, O., Hui, S., Vail, W.J. and Poste, G. (1976) Studies on membrane fusion. 1. Interaction of pure phospholipid membranes and the effect of myristic acid, lysolecithin, proteins and dimethylsulfoxide. *Biochim. Biophys. Acta* 448:245-264
- Pang, K.Y.Y. and Miller, K.W. (1978) Cholesterol modulates the effects of membrane perturbers in phospholipid vesicles and biomembranes. *Biochim. Biophys. Acta* 511:1-9
- Paterson, D.R. and Arntzen, C.J. (1982) Detection of altered inhibition of photosystem II reactions in herbicide-resistant plants. In: *Methods in Chloroplast Molecular Biology*, Elsevier, Biomedical Press, pp 109-118, North-Holland: Edelman (ed.)
- Pearcy, R.W. and Franceschi, V.R. (1986) Photosynthetic characteristics and chloroplast ultrastructure of  $C_3$  and  $C_4$  tree species grown in high- and low-light environments. *Photosynth. Res.* 9:317-331
- Pedersen, J.Z. and Cox, R.P. (1984) Relationship between thylakoid membrane fluidity and the kinetics of salt induced fluorescence changes: A spin label study. In: *Advances in Photosynthesis Research, Vol III*, Nijhoff, M./Dr Junk, W., pp 51-54, The Hague: Sybesma, C. (ed.)
- Penel, C., Gaspar, T. and Greppin, N. (1985) Rapid interorgan communication in higher plants with special reference to flowering. *Biologia Plantarum* 27:334-338
- Pfister, K. and Arntzen, C.J. (1979) The mode of action of photosystem II-specific inhibitors in herbicide-resistant weed biotypes. *Z. Naturforsch.* 34c:996-1009
- Pfister, K., Radosevich, S.R. and Arntzen, C.J. (1979) Modification of herbicide binding to photosystem II in two biotypes of *Senecio vulgaris* L. *Plant Physiol.* 64:995-999
- Pfister, K., Steinback, K.E., Gardner, G. and Arntzen, C.J. (1981) Photo-affinity labeling of an herbicide receptor in chloroplast membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:981-985

- Pfister, K. and Urbach, W. (1983) Effects of biocides and growth regulators: Physiological basis. In: *Encyclopedia of Plant Physiology (Physiological Plant Ecology IV), New Series, Volume 12D*, Springer-Verlag, pp 329-391, Berlin: Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B. and Ziegler, H. (eds).
- Pick, U., Gounaris, K., Admon, A. and Barber, J. (1984) Activation of the  $CF_0CF_1$  ATP synthetase from spinach chloroplasts by chloroplast lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 765:12-20
- Pick, U., Gounaris, K., Weiss, M. and Barber, J. (1985) Tightly bound sulfolipids in chloroplast  $CF_0CF_1$ . *Biochim. Biophys. Acta* 808:415-420
- Pillai, P. and St.John, J.B. (1981) Lipid composition of chloroplast membranes from weed biotypes differentially sensitive to triazine herbicides. *Plant. Physiol.* 68:585-587
- Powles, S.B. (1984) Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35:15-44
- Putwain, P.D., Scott, K.R. and Holliday, R.J. (1982) The nature of resistance to triazine herbicides: Case histories of phenology and population studies. In: *Herbicide Resistance in Plants*, Wiley-Interscience, John Wiley & sons, pp 99-115, New York: LeBaron, H.M. and Gressel, J. (eds)
- Quinn, P.J. (1984) Phases of membrane polar lipids in aqueous systems. *Natur. Prod. Rep.* 1:513-531
- Quinn, P.J. (1989) Membrane stability under thermal stress. In: *Biological Role of Plant Lipids*, Plenum Publishing Corporation, pp 511-515, New York: Biacs, P.A., Gruiz, K. and Kremmer, T. (eds)
- Quinn, P.J., Joo, F. and Vigh, L. (1989) The role of unsaturated lipids in membrane structure and stability. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 53:71-103
- Quinn, P.J. and Williams, W.P. (1983) The structural role of lipids in photosynthetic membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 737:223-266
- Quinn, P.J. and Williams, W.P. (1985) Environmentally induced changes in chloroplast membranes and their effects on photosynthesis function. In: *Photosynthetic Mechanisms and the Environment*, Elsevier Science B.V. (Biomedical Division), pp 1-47, : Barber, J. and Baker, N.R. (eds)
- Raison, J.K. and Orr, G.R. (1986a) Phase transition in thylakoid polar lipids of chilling-sensitive plants. *Plant Physiol.* 80:638-645
- Raison, J.K. and Orr, G.R. (1986b) Phase transitions in liposomes formed from polar lipids of mitochondria from chilling-sensitive plants. *Plant Physiol.* 81:807-811

- Raison, J.K., Roberts, J.K.M. and Berry, J.A. (1982) Correlations between the thermal stability of chloroplast (thylakoid) membranes and the composition and fluidity of their polar lipids upon acclimation of the higher plant, *Nerium oleander*, to growth temperature. *Biochim. Biophys. Acta* 68B:218-228
- Raison, J.K. and Wright, L.C. (1983) Thermal phase transition in the polar lipids of plant membranes. Their induction by disaturated phospholipids and their possible relation to chilling injury. *Biochim. Biophys. Acta* 731:69-78
- Rawlyer, A. (1980) Quelques aspects du rôle des lipides membranaires dans la fonction photosynthétique. Thèse, Université de Neuchâtel
- Rawlyer, A. and Siegenthaler, P.A. (1981a) Transmembrane distribution of phospholipid and their involvement in electron transport, as revealed by phospholipase A<sub>2</sub> treatment of spinach thylakoids. *Biochim. Biophys. Acta* 635:34B-358
- Rawlyer, A. and Siegenthaler, P.A. (1981b) Regulation of photosystem I electron flow activity by phosphatidylglycerol in thylakoid membranes as revealed by phospholipase treatment. *Biochim. Biophys. Acta* 63B:30-39
- Rawlyer, A. and Siegenthaler, P.A. (1985) Transversal localization of monogalactosyldiacylglycerol and digalactosyldiacylglycerol in spinach thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 815:2B7-29B
- Rawlyer, A. and Siegenthaler, P.A. (1989a) Change in the molecular organization of monogalactosyldiacylglycerol between resting and functioning thylakoid membranes. Involvement of the CF<sub>0</sub>/CF<sub>1</sub>-ATP synthetase. *Biochim. Biophys. Acta* 975:283-292
- Rawlyer, A. and Siegenthaler, P.A. (1989b) A single and continuous spectrophotometric assay for various lipolytic enzymes, using natural, non-labelled lipid substrates. *Biochim. Biophys. Acta* 1004:337-344
- Rawlyer, A., Unitt, M.D., Giroud, C., Davies, H., Mayor, J.P., Harwood, J.L. and Siegenthaler, P.A. (1987) The transmembrane distribution of galactolipids in chloroplast thylakoids is universal in a wide variety of temperate climate plant. *Photosynth. Res.* 11:3-13
- Rémy, R., Trémolières, A., Duval, J.C., Ambard-Bretteville, F. and Gubacq, J.P. (1982) Study of the supramolecular organization of light-harvesting chlorophyll protein (LHCP). *FEBS Lett.* 137:271-275
- Renger, G. (1973) The action of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea on the water-splitting enzyme system Y of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 314:113-116
- Renger, G. (1979) Studies about the mechanism of herbicidal interaction with photosystem II in isolated chloroplasts. *Z. Naturforsch.* 34c:1010-1014

- Renger, G. (1986) Herbicide interaction with photosystem II: Recent developments. *Physiol. Vég.* 24:509-521
- Renger, G., Fromme, R. and Hagemann, R. (1988) The modification of atrazine binding by the redox state of the endogenous high-spin iron by specific proteolytic enzymes in photosystem II membrane fragments and intact chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 935:173-183
- Renger, G., Hagemann, R. and Vermaas, W.F.J. (1984) Studies on the functional mechanism of system II herbicides in isolated chloroplasts. *Z. Naturforsch.* 39c: 362-367
- Restall, C.J., Williams, W.P., Percival, M.P., Quinn, P.J. and Chapman, D. (1979) The modulation of membrane fluidity by hydrogenation processes. III. The hydrogenation of biomembranes of spinach chloroplasts and a study of the effect of this on photosynthetic electron transport. *Biochim. Biophys. Acta* 555:119-130
- Reuveni, M., Colombo, R., Lerner, H.R., Pradet, A. and Poljakoff-Mayber, A. (1987) Osmotically induced proton extrusion from carrot cells in suspension culture. *Plant. Physiol.* 85:383-388
- Reyes, J. and Latorre, R. (1979) Effects of the anesthetic benzyl alcohol and chloroform on bilayers made from monolayers. *Biophys. J.* 28:259-280
- Ricroch, A., Mousseau, M., Darmency, H. and Pernès, J. (1987) Comparison of triazine-resistant and -susceptible cultivated *Setaria italica*: Growth and photosynthetic capacity. *Plant Physiol. Biochem.* 25:29-34
- Rivera, C.M. and Penner, D. (1979) Effect of herbicides on plant cell membrane lipids. *Residue Reviews* 70:45-76
- Roberts, H.A. and Boddrell, J. (1983) Field emergence and temperature requirements for germination in *Solanum sarrachoides* Sendt. *Weed Res.* 23:247-252
- Roberts, H.A. and Lockett, P.M. (1978) Seed dormancy and field emergence in *Solanum nigrum* L. *Weed Res.* 18:231-241
- Rochester, C.P. and Andersson, B. (1986) The interaction of thylakoid lipids with everted photosystem II membranes. *Physiol.Plant.* 68:136-140
- Roelofsen, B. (1982) Phospholipases as tools to study the localization of phospholipids in biological membranes. A critical review. *J. Toxicol. Toxin Rev.* 1:87-197
- Rogers, B.S. and Ogg, A.C.jr. (1981) . In: *Biology of Weeds of the Solanum nigrum* Complex in North America, Agric. Admin. Reviews and Manuals, pp 30, ARM-W-23 May: US Dept.Agric.Sci. (ed.)
- Roughan, P.G. (1985) Phosphatidylglycerol and chilling sensitivity in plants. *Plant Physiol.* 77:740-746

- Rouser, G., Fleischer, S. and Yamamoto, A. (1970) Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* 5:494-496
- Rutherford, A.W. (1989) Photosystem II, the water splitting enzyme. *TIBS* 14:227-232
- Rutherford, A.W., Crofts, A.R. and Inoue, I. (1982) Thermoluminescence as a probe of photosystem II photochemistry. The origin of the flash-induced glow peaks. *Biochim. Biophys. Acta* 682:457-465
- Ryan, C.F. (1970) Resistance of common groundsel to simazine and atrazine. *Weed Sci.* 18:614-616
- Salisbury, E. (1961) *Weeds and Alliens*, London, Collins, pp. 384.
- Satoh, K., Katoh, S., Dostatni, R. and Oettmeier, W. (1986) Herbicide and plastoquinone-binding proteins of photosystem II reaction center complexes from the thermophilic cyanobacterium, *Synechococcus* sp. *Biochim. Biophys. Acta* B51:202-208
- Scatchard, G., Scheinberg, I.H. and Armstrong, S.H. (1950) Physical chemistry of protein solutions. IV. The combination of human serum albumin with chloride ion. *J. Am. Chem. Soc.* 72:535-540
- Schreiber, U. and Armond, P.A. (1978) Heat-induced changes of chlorophyll fluorescence in isolated chloroplasts and related heat-damage at the pigment level. *Biochim. Biophys. Acta* 502:138-151
- Schreiber, U. and Pfister, K. (1982) Kinetic analysis of the light-induced chlorophyll fluorescence rise curve in the presence of dichlorophenyl dimethylurea. Dependence of the slow-rise component on the degree of chloroplast intactness. *Biochim. Biophys. Acta* 680:60-68
- Schreiber, U. (1983) Chlorophyll fluorescence yield changes as a tool in plant physiology. I. The measuring system. *Photosynth. Res.* 4:361-373
- Scoufflaire, C., Chow, W.S., Barber, J. and Lannoye, R. (1981) Further studies of the relationship between thylakoid stacking and salt induced chlorophyll fluorescence changes. In: *Photosynthesis I, Photophysical Processes-Membrane Energization*, Balaban International Science Services, pp 605-615, Philadelphia: Akoyunoglou, G. (ed.)
- Scoufflaire, C., Lannoye, R. and Barber, J. (1985) Influence of structural and physical properties of the thylakoid membrane on  $Q_A$  oxidation. *Photosynth. Res.* 6:133-145
- Shavit, N. and Avron, M. (1967) The relation of electron transport and photophosphorylation to conformational changes in chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 131:516-525
- Shepherd, J.C.W. and Büldt, G. (1979) The influence of cholesterol on head group mobility in phospholipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 558:41-47

- Shier, W.T. (1982) Cytolytic mechanisms: Self-destruction of mammalian cells by activation of endogenous hydrolytic enzymes. *J. Toxicol. Toxin Rev.* 1:1-32
- Shinitzky, M.Y., Skornick, N. and Hazan-Chera, N. (1979) Effective tumor immunization induced by cells of elevated membrane-lipid microviscosity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5313-5316
- Shneyour, A., Raison, J.K. and Smillie, R.M. (1973) The effect of temperature of the rate of photosynthetic electron transfer in chloroplast of chillingsensitive and chilling-resistant plants. *Biochim. Biophys. Acta* 292:152-161
- Siefermann-Harms, D., Ninnemann, M. and Yamamoto, H. (1987) Reassembly of solubilized chlorophyll-protein complexes in proteolipid particles - comparison of monogalactosyldiacyl-glycerol and two phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta* 892:303-313
- Siegel, G.O., Jordan, A.E. and Hiller, K.R. (1981) Addition of lipid to the photosynthetic membrane: Effects on membrane structure and energy transfer. *J. Cell Biol.* 91:113-125
- Siegenthaler, P.A. (1968) La méthode hématocrite appliquée à la mesure des changements de volume de chloroplaste isolés d'Épinard. *Bullet. Soc. Bot. Sui.* 78:201-209
- Siegenthaler, P.A. (1982) Transmembrane distribution and function of lipids in spinach thylakoid membrane: Rationale of the enzymatic modification method. In: *Biochemistry and Metabolism of Plant Lipids*, Elsevier, Biomedical Press, pp 351-358, B.V.: Wintermans, J.F.G.M. and Kuiper, P.J.C. (eds)
- Siegenthaler, P.A. and Giroud, C. (1986) Transversal distribution of phospholipids in prothylakoid and thylakoid membranes from oat. *FEBS Lett.* 201:215-220
- Siegenthaler, P.A. and Horakova, J. (1975) Control of the photosynthetic electron transport by free fatty acids and  $Mn^{2+}$  salts. In: *Proceedings of the Third International Congress on Photosynthesis. Volume I*, Elsevier Scientific Publishing Company, pp 655-664, Amsterdam: Avron, M. (ed.)
- Siegenthaler, P.A. and Rawlyer, A. (1986) Acyl lipids in thylakoid membranes: Distribution and involvement in photosynthetic functions. In: *Encyclopedia of Plant Physiology (Photosynthesis III) 19 New Series*, Springer-Verlag, pp 693-705, Berlin: Staehelin, L.A. and Arntzen, C.J. (eds)
- Siegenthaler, P.A., Rawlyer, A. and Smutny, J. (1989a) The phospholipid population which sustains the uncoupled non-cyclic electron flow activity is localized in the inner monolayer of the thylakoid membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 975:104-111

- Siegenthaler, P.A., Rawlyer, A. and Mayor, J.P. (1989b) Structural and functional aspects of acyl lipids in thylakoid membranes from higher plants. In: *Biological Role of Plant Lipids*, Akademiai Kiado & Plenum, pp 171-180, Budapest & New York: Biacs, P.A., Gruiz, K. and Kremmer, T. (eds)
- Siegenthaler, P.A., Smutny, J. and Rawlyer, A. (1987) Involvement of distinct populations of phosphatidylglycerol and phosphatidylcholine molecules in photosynthetic electron flow activities. *Biochim. Biophys. Acta* 891:85-93
- Siegenthaler, P.A., Sutter, J. and Rawlyer, A. (1988) The transmembrane distribution of galactolipids in spinach thylakoid inside-out vesicles is opposite to that found in intact thylakoids. *PESS Lett.* 228:94-98
- Sigematsu, Y., Sato, F. and Yamada, Y. (1989) The mechanism of herbicide resistance in tobacco cells with a new mutation in the Qb protein: *Plant Physiol.* 89:986-992
- Sigrist, M., Zwillenberg, C., Giroud, C., Eichenberger, W. and Boschetti, A. (1988) Sulfolipid associated with the light-harvesting complex associated with photosystem II apoproteins of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci.* 58:15-23
- Singh, M. (1970) Studies on seed germination of two varieties (black berried and red berried) of *Solanum nigrum* L. *Trop. Ecol.* 11:194-200
- Singh, M. (1971) Influence of shade on the growth performance of *Solanum nigrum* L. *J. Indian bot. Soc.* 50:157-161
- Smillie, R.M. (1979) The useful chloroplast: A new approach for investigating chilling stress in plants. In: *Low Temperatura Stress in Crop Plants: The Role of the Membrane*, Academic Press, pp 187-202, New York: Lyons, J.M., Graham, D. and Raison, J.K. (eds)
- Smith, G. and Stein, J. (1982) Estimation of neutral lipids. *Tech. Lip. Memb. Biochem.* 8405:1-6
- Soll, H.J. and Oettmeier, W. (1984) Inhibitor binding and displacement in plastoquinone depleted chloroplasts. In: *Advances in Photosynthesis Research IV*, Nijhoff, M./Dr Junk, W., pp 5-8, The Hague: Sybesma, C. (ed.)
- Souza Machado, V., Bandeen, J.D., Stephenson, G.R. and Jensen, K.I.N. (1977) Differential atrazine interference with the Hill reaction of isolated chloroplasts from *Chenopodium album* L. biotypes. *Weed Res.* 17:407-413
- Sprague, S.G. and Staehelin, L.A. (1984) Effects of reconstitution method on the structural organization of isolated chloroplast multilamellar lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 777:306-322

- Stachellin, L.A. and Arntzen, C.J. (1983) Regulation of chloroplast membrane function: Protein phosphorylation changes the spatial organization of membrane components. *J. Cell. Biol.* 97:1327-1337
- Steinbauer, G.P., Grigsby, B., Correa, L. and Frank, P. (1955) A study of methods for obtaining laboratory germination of certain weed seeds. *Proceedings of the A.O.S.A.* 45:48-52
- Stidham, M.A., Uribe, E.G. and Williams III, G.J. (1982) Temperature dependance of photosynthesis in *Agropyron smithii* Rydb. II. Contribution from electron transport and photophosphorylation. *Plant. Physiol.* 69:929-934
- Stubbs, C.D. (1983) Membrane fluidity: Structure and dynamics of membrane lipids. *Essays Biochem.* 19:1-39
- Sundby, C. and Larsson, C. (1985) Transbilayer organization of the thylakoid galactolipids. *Biochim. Biophys. Acta* 813:61-67
- Sundby, C., Melis, A., Mäenpää, P. and Andersson, B. (1986) Temperature-dependant changes in the antenna size of Photosystem II. Reversible conversion of Photosystem II<sub>a</sub> to Photosystem II<sub>β</sub>. *Biochim. Biophys. Acta* 851:475-483
- Takano, M., Takahashi, M.A. and Asada, K. (1982) Reduction of photosystem I reaction center, P700, by plastocyanin in stroma thylakoids from spinach: Lateral diffusion of plastocyanin. *Arch. Biochem. Biophys.* 218:369-375
- Tandon, S.L. and Rao, G.R. (1966) Interrelationships within the *Solanum nigrum* complex. *Indian J. Genet. Plant Breed.* 26:130-141
- Tanford, C. (1979) Hydrostatic pressure in small phospholipid vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:3318-3319
- Tellenbach, M., Gerber, A. and Boschetti, A. (1984) Competitive binding of atrazine and DCMU to thylakoids membranes of DCMU-resistant and DCMU-sensitive strains of *Chlamydomonas*. In: *Advances in Photosynthesis Research IV*, Nijhoff, M./Dr Junk, W., pp 9-12, The Hague: Sybesma, C. (ed.)
- Thiel, A. and Böger, P. (1984) Comparative herbicide binding by photosynthetic membranes from resistant mutants. *Pestic. Biochem. Physiol.* 22:232-242
- Tischer, W. and Strotmann, M. (1977) Relation between inhibitor binding by chloroplasts and inhibition of photosynthetic electron transport. *Biochim. Biophys. Acta* 460:113-125
- Thomas, P.G., Brain, P.R., Quinn, P.J. and Williams, W.P. (1985) Low pH and phospholipase A2 treatment induce the phase-separation of non-bilayer lipid within pea chloroplast membranes. *PEBS Lett.* 183:161-166

- Thomas, P.G., Dominy, P.J., Vigh, L., Mansourian, A.R., Quinn, P.J. and Williams, W.P. (1986b) Increased thermal stability of pigment-protein complexes of pea thylakoids following catalytic hydrogenation membrane lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 849:131-140
- Thomas, P.G., Quinn, P.J. and Williams, W.P. (1986a) The origin of photosystem-I-mediated transport stimulation in heat-stressed chloroplasts. *Planta* 167:133-139
- Thornber, J.P., Peter, G.F. and Nechushtai, R. (1987) Biochemical composition and structure of photosynthetic pigment-proteins from higher plants. *Physiol. Plant.* 71:236-240
- Tilcock, C.P.S. (1986) Lipid polymorphism. *Chem. Phys. Lipids* 40:109-125
- Tolberg, A.B. and Macey, R.I. (1965) Osmotic behavior of spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 109:424-430
- Toole, E.H. and Brown, E. (1946) Final results of the Duvel buried seed experiment. *J. Agric. Res.* 72:201-210
- Toole, E.H., Toole, V.K., Borthwick, H.A. and Hendricks (1955) Interaction of temperature and light in germination of seeds. *Plant. Physiol.* 30:473-478
- Trebst, A. (1980) Inhibitors in electron flow: tools for the functional and structural localization of carriers and energy conservation sites. In: *Methods in Enzymology. Photosynthesis and Nitrogen Fixation. Volume 69. Part C*, Academic Press, pp 675-715, New York: San Pietro, A. (ed.)
- Trebst, A. (1985) The topology of plastoquinone and herbicide binding peptides of photosystem II in the thylakoid membrane. *Z. Naturforsch.* 41c:240-245
- Trebst, A. (1987) The three-dimensional structure of the herbicide binding niche on the reaction center polypeptides of photosystem II. *Z. Naturforsch.* 42c:742-750
- Trebst, A., Depka, B., Kraft, B. and Johanningmeier, U. (1988) The Q<sub>b</sub> site modulates the conformation of the photosystem II reaction center polypeptides. *Photosynth. Res.* 18:163-177
- Trosper, T., Raveed, D. and Ke, S. (1970) Chlorophyll a-containing liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 223:460-462
- Turner, G.L. and Dldfield E. (1979) Effect of a local anaesthetic on hydrocarbon chain order in membranes. *Nature* 277:669-670
- Turner, J.C., Parker, M.L., Temple, S.J. and Lea, P.L. (1987) Characterization of two chlorophyll b-deficient, azide-derived mutants of *Hordeum vulgare* cv. Maris Mink. *Photosynth. Res.* 12:95-103
- Unitt, M.D. and Harwood, J.L. (1985) Sidedness studies of thylakoid phosphatidylglycerol in higher plants. *Biochem. J.* 228:707-711

- Van Deenen, L.L.M. (1981) Topology and dynamics of phospholipids in membranes. *FEBS Lett.* 123:3-15
- Van Dijk, P.W.M., Kruijff de, B., Aarts, P.A.M.M., Verkleij, A.J. and Gier de, J. (1978) Phase transition in phospholipid model membranes of different curvature. *Biochim. Biophys. Acta* 506:183-191
- van Rensen, J.S. (1982) Molecular mechanisms of herbicide action near photosystem II. *Physiol.Plant.* 54:515-521
- van Rensen, J.S. (1984) Interaction of photosystem II herbicides with bicarbonate and formate in their effects on photosynthetic electron flow. *Z. Naturforsch.* 39c:374-377
- van Rensen, J.S. and Spätjens, E.E.M. (1987) Photosystem II heterogeneity in triazine-resistant and susceptible biotypes of *Chenopodium album*. *Z. Naturforsch.* 42c:794-797
- van Rensen, J.S. and Vermaas, W.F.J. (1981) Action of bicarbonate and photosystem 2 inhibiting herbicides on electron transport in pea grana and in thylakoids of blue-green alga. *Physiol.Plant.* 51:106-110
- Vasil'ev, I.R., Matorin, D.N., Lyadsky, V.V. and Venediktov, P.S. (1988) Multiple action sites for photosystem II herbicides as revealed by delayed fluorescence. *Photosynth. Res.* 15:33-39
- Vaughn, K.C. and Duke, S.O. (1984) Ultrastructural alterations to chloroplast in triazine-resistant weed biotypes. *Physiol. Plant.* 62:510-520
- Vaughn, K.C. (1986) Characterization of triazine-resistant and susceptible isolines of canola (*Brassica campestris* L.). *Plant. Physiol.* 82:859-863
- Velthuys, B.R. (1981) Electron-dependant competition between plastoquinone and inhibitors for binding to photosystem II. *FEBS Lett.* 126:277-281
- Velthuys, B.R. (1982) The function of plastoquinone in electron transfer. In: *Function of Quinones in Energy conserving Systems*, Academic Press, pp 401-408, New York: Trunpower, B.L. (ed.)
- Velthuys, B.R. and Amesz, J. (1974) Charge accumulation at the reducing side of system 2 of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 333:85-94
- Vermaas, W.F.J., Arntzen, C.J., Gu, L.Q. and Yu, C.A. (1983) Interaction of herbicides and azidoquinones at a photosystem II binding site in the thylakoid membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 723:266-275
- Vermaas, W.F.J., Renger, G. and Arntzen, C.J. (1984) Herbicide/quinone binding interactions in photosystem II. *Z. Naturforsch.* 39c:368-373

- Vermaas, W.F.J., Van Rensen, J.J.S. and Govindjee (1982) The interaction between bicarbonate and the herbicide ioxynil in the thylakoid membrane and the effect of amino acid modification on bicarbonate action. *Biochim. Biophys. Acta* 681:242-247
- Vigh, L. (1987) Lipid saturation by catalytic hydrogenation. In: *The Metabolism, Structure, and Function of Plant Lipids*, Plenum Press, pp 153-159, New York: Stumpf, P.K., Mudd, J.B. and Nes, W.O. (eds)
- Vigh, L. and Joo, F. (1983) Modulation of membrane fluidity by catalytic hydrogenation affects the chilling susceptibility of the blue-green alga *Anacystis nidulans*. *FEBS Lett.* 162:423-427
- Vigh, L., Gombos, Z. and Joo, F. (1985a) Selective modification of cytoplasmic membrane fluidity by catalytic hydrogenation provides evidence on its primary role in chilling susceptibility of the blue-green alga *Anacystis nidulans*. *FEBS Lett.* 191:200-204
- Vigh, L., Horvath, I., Joo, F. and Thompson, G.A.jr. (1987) The hydrogenation of phospholipid-bound unsaturated fatty acids by homogeneous, water-soluble, palladium catalyst. *Biochim. Biophys. Acta* 921:167-174
- Vigh, L., Horvath, I. and Thompson, G.A.jr. (1988) Recovery of *Dunaliella salina* cells following hydrogenation of lipids in specific membranes by homogeneous palladium catalyst. *Biochim. Biophys. Acta* 937:42-50
- Vigh, L., Joo, F., Oroppa, M., Horvath, L.I. and Horvath, G. (1985b) Modulation of chloroplast membrane lipids by homogeneous catalytic hydrogenation. *Eur. J. Biochem.* 147:477-481
- Vigh, L., Joo, F., van Hasselt, P.R. and Kuiper, P.J.C. (1983) Hydrogenation of model and biomembranes using a water-soluble ruthenium phosphine catalyst. *J. Mol. Catalys.* 22:15-19
- Vigh, L., Horvath, I., van Hasselt, P.R. and Kuiper, P.J.C. (1985c) Effect of frost hardening on lipid and fatty acid composition of chloroplast thylakoid membranes in two wheat varieties of contrasting hardiness. *Plant Physiol.* 79:756-759
- Wakhloo, J.L. (1964) Ecological and physiological studies on two species of solanum: I. Germination and development of *S. xanthocarpum* Schrad & Wendl. and *S. nigrum* L. *Flore*, Bd. 155:237-249
- Warden, J.T. and Csatorday, K. (1987) On the mechanism of linolenic acid inhibition in photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 890:215-223
- Weller, R.F. and Phipps, R.H. (1979) A review of black nightshade (*Solanum nigrum* L.). *Prot. Ecol.* 1:121-139
- White, S.H. (1980) Small phospholipid vesicles: Internal pressure, surface tension, and surface free energy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4048-4050
- Wettern, M. (1986) Localization of 32 000 Dalton chloroplast protein pools in thylakoids: Significance in atrazine binding. *Plant Sci.* 43:173-177

- Whitaker, B.D. (1986) Fatty-acid composition of polar lipids in fruit and leaf chloroplasts of "16:3"- and "18:3"-plant species. *Planta* 169:313-319
- Whitmarsh, J. (1986) Mobile electron carriers in thylakoids. In: *Encyclopedia of Plant Physiology, Photosynthesis III, New Series*, Vol. 19, Springer Verlag, pp 509-527, Berlin: Staehelin, L.A. and Arntzen, C.J. (eds)
- Wiener, M.C., Tristram-Nagle, S., Wilkinson, D.A., Campbell, L.E. and Nagle, J.F. (1988) Specific volumes of lipids in fully hydrated bilayer dispersions. *Biochim. Biophys. Acta* 938:135-142
- Williams, W.P. and Quinn, P.J. (1987) The phase behavior of lipids in photosynthetic membranes. *J. Bioenerg. Biomemb.* 19:605-624
- Wilschut, J. and Hoekstra, O. (1986) Membrane fusion: lipid vesicles as a model system. *Chem. Phys. Lipids* 40:145-166
- Wolfe, J. (1978) Chilling injury in plants - the role of membrane lipid fluidity. *Plant Cell Environ.* 1:241-247
- Wolfe, J. (1979) Statistical tests to decide between straight line segment and curve as suitable fits to Arrhenius plots or other data. In: *Low Temperature Stress in Crop Plants: The Role of the Membrane*, Academic Press, pp 527-533, New York: Lyons, J.M., Graham, D. and Raison, J.K. (eds)
- Wright, R.S. (1971) A reagent for the non-destructive location of steroids and some other lipophilic materials on silica gel thin-layer chromatography. *J. Chromatogr.* 59:220-221
- Wydrzynski, T. and Inoue, Y. (1987) Modified photosystem II acceptor side properties upon replacement of the quinone at the Q<sub>b</sub> site with 2,5-dimethyl-p-benzoquinone and phenyl-p-benzoquinone. *Biochim. Biophys. Acta* 893:33-42
- Yamamoto, Y., Ford, R.C. and Barber, J. (1981) Relationship between thylakoid membrane fluidity and the functioning of pea chloroplasts. *Plant Physiol.* 67:1069-1072
- Yamamoto, Y. and Ke, B. (1979) A temperature-dependent conformational change in photosystem-II thylakoid membrane. *FEBS Lett.* 107:137-140

## ANNEXES

annexe 1:

```

VAR
    pente : Real ;
    tab : PACKED ARRAY [1..16,1..13] OF Real ;
    choix,pause : CHAR ;
    ind1,ind2,cont : Integer ;
    nbre,nbdon,genre: Integer ;
    chloro : Real ;

PROCEDURE Miss_A_zéro ;
BEGIN
    IF choix = 'f' THEN
    BEGIN
        ind2 := 0 ;
        ind1 := 0 ;
        nbre := 0 ;
        While ind1 < 16 DO
        BEGIN
            ind1 := ind1 + 1 ;
            While ind2 < 13 DO
            BEGIN
                ind2 := ind2 + 1 ;
                tab[ind1,ind2] := 0000.00000
            END ;
            ind2 := 0
        END ;
        END ;
    END ;
    IF choix = 'o' THEN
    BEGIN
        ind1 := 0 ;
        While ind1 < 16 DO
        BEGIN
            ind1 := ind1 + 1 ;
            FOR ind2 := 3 TO 6 DO
            BEGIN
                tab[ind1,ind2] := 0000.00000
            END ;
        END ;
        ind1 := 0 ;
        While ind1 < 16 DO ;
        BEGIN
            ind1 := ind1 + 1 ;
            FOR ind2 := 8 TO 13 DO
            BEGIN
                tab[ind1,ind2] := 0000.00000
            END ;
        END ;
        END ;
    END ;
END ;
END ;

PROCEDURE Présentation ;
BEGIN
    (*----- présentation tableau 1 -----*)
    clrscr ;
    ind1 := 0 ;
    cont := nbdon + 2 ;
    FOR ind2 := 1 TO nbdon DO
        Write ('          Ech ',ind2,' ');
    Write (' Etalon ');
    Write (' Moy ');
    Write (' Cpminc ');
    WriteLn ;
    While ind1 < nbre DO
    BEGIN
        ind1 := ind1 + 1 ;
        IF genre = 1 THEN Write(tab[ind1,1]:8:4,' ');
        IF genre = 2 THEN Write(tab[ind1,2]:8:4,' ');
        FOR ind2 := 3 TO cont DO
            Write (tab[ind1,ind2]:5:0,' ');
        FOR ind2 := 7 to 9 DO
            Write (tab[ind1,ind2]:5:0,' ');
        WriteLn ;
    END ;
    ReadLn (pause) ;

```

```

(* ----- présentation tableau 2 ----- *)
clrscr ;
Writeln(LST) ; Writeln(LST) ; Writeln(LST) ;
Writeln (LST, ' Moy Cpminc 1/frac Chl/bound bound/Chl (bound/Chl)/frac ' ) ;
Writeln(LST) ;
FOR ind1 := 1 TO nbre DO
BEGIN
  Write (LST,tab[ind1,8]:5:0,' ',tab[ind1,9]:5:0,' ');
  Write (LST,tab[ind1,10]:9:4,' ',tab[ind1,11]:7:4,' ');
  Write (LST,tab[ind1,12]:8:4,' ',tab[ind1,13]:8:4);
  Writeln(LST) ;
END ;
END ;

PROCEDURE Début ;
BEGIN
  clrscr ;
  Writeln ; Writeln ; Writeln ;
  Writeln ( ' HERBICIDE BINDING ');
  Writeln ( ' ');
  Writeln ; Writeln ; Writeln ;
  genre := 1 ;
  Writeln ;
  Write ( ' Entrer la pente (C.étalon) ==> ' ) ;
  Readln(pente) ;
  Writeln ;
  Write ( ' Nb mesures par échantillon ==> ' ) ;
  Readln (nbdon) ;
  Writeln ;
  Write ( ' Concentration chlorophyllies (mg/ml) ==> ' ) ;
  Readln (chloro) ;
End ;

Procédure entrée_données ;
Begin
  Writeln ;
  cont := nbdon*2 ;
  FOR ind2 := 3 TO cont DO
  BEGIN
    clrscr ;
    Writeln ('Colonne No :',(ind2 - 2),'(cpm)') ;
    Writeln ;
    FOR ind1:= 1 TO nbre DO
    BEGIN
      Write ('Valeur ',ind1,' ==>') ;
      Readln (tab[ind1,ind2]) ;
    END ;
  END ;
END ;

Procédure Entrée_conc ;
BEGIN
  clrscr ;
  Writeln ; Writeln ; Writeln ;
  Writeln ( ' Introduction de la concentration de la courbe étalon (µM) ');
  Writeln ;
  ind1 := 1 ;
  nbre := 16 ;
  WHILE ind1 < 17 DO
  BEGIN
    Write ('Valeur ',ind1,' ==>') ;
    Readln (tab[ind1,1]) ;
    if tab[ind1,1] = 0 then
    BEGIN
      nbre := (ind1 - 1) ;
      ind1 := 16 ;
    END ;
    ind1 := ind1 + 1 ;
  END ;
END ;

```

```

PROCEDURE Entrée_étalon ;
BEGIN
  clrscr ;
  Writeln ; Writeln ; Writeln ;
  Writeln (' Introduction de la courbe étalon (cpm) ' ) ;
  Writeln ;
  FOR ind1 := 1 TO nbre DO
  BEGIN
    Write ('Valeur ', ind1, ' ==>' ) ;
    Readln (tab[ind1,7]) ;
  END ;
END ;

PROCEDURE Calc_moy_cpminc ;
BEGIN
  FOR ind1 := 1 to nbre DO
  BEGIN
    tab[ind1,8] := (tab[ind1,3] + tab[ind1,4] + tab[ind1,5] + tab[ind1,6]) / nbden ;
    tab[ind1,9] := tab[ind1,7] - tab[ind1,8] ;
    tab[ind1,10] := 1 / (tab[ind1,8] / pente ) ;
    tab[ind1,12] := (tab[ind1,genre] - (tab[ind1,8] / pente )) / chloro ;
    tab[ind1,11] := 1 / tab[ind1,12] ;
    tab[ind1,13] := tab[ind1,12] * tab[ind1,10] ;
  END ;
END ;

BEGIN
  choix := 'f' ;

  Mise_à_zéro ;

  Début ;

  WHILE choix <> 'n' DO
  BEGIN
    IF choix = 'f' THEN
    BEGIN
      Entrée_conc ;

      Entrée_étalon ;

    END;

    Entrée_données ;

    Calc_moy_cpminc ;

    Présentation ;

    clrscr ;
    Writeln ; Writeln ; Writeln ;
    Write (' Voulez-vous continuer ce programme ? (o/n) ' ) ;
    Readln (choix) ;

    Mise_à_zéro ;
  END ;
END.

```

HERBICIDE BINDING

Entrer la pente (C.étalon) => 31635  
 Nb mesures par échantillon => 1  
 Concentration chlorophylles (µg/ml) => 0.05

Introduction de la concentration de la courbe étalon (µM)

Valeur 1 =>.01264  
 Valeur 2 =>.01394  
 Valeur 3 =>.01530  
 Valeur 4 =>.01606  
 Valeur 5 =>.01878  
 Valeur 6 =>.02222  
 Valeur 7 =>.02564  
 Valeur 8 =>.02886  
 Valeur 9 =>.03303  
 Valeur 10 =>.03661  
 Valeur 11 =>.04280  
 Valeur 12 =>.05127  
 Valeur 13 =>.07937  
 Valeur 14 =>.10175  
 Valeur 15 =>.16633  
 Valeur 16 =>.22070

Introduction de la courbe étalon (cpm)

Valeur 1 =>381  
 Valeur 2 =>441  
 Valeur 3 =>484  
 Valeur 4 =>508  
 Valeur 5 =>594  
 Valeur 6 =>763  
 Valeur 7 =>811  
 Valeur 8 =>911  
 Valeur 9 =>1045  
 Valeur 10 =>1158  
 Valeur 11 =>1354  
 Valeur 12 =>1622  
 Valeur 13 =>2511  
 Valeur 14 =>3282  
 Valeur 15 =>5262  
 Valeur 16 =>6582

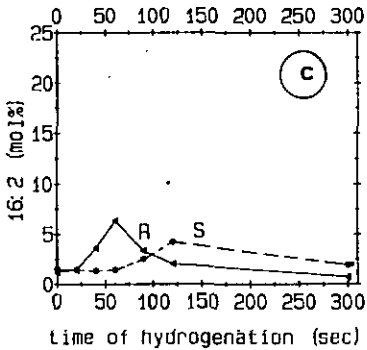
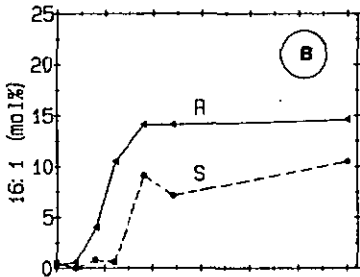
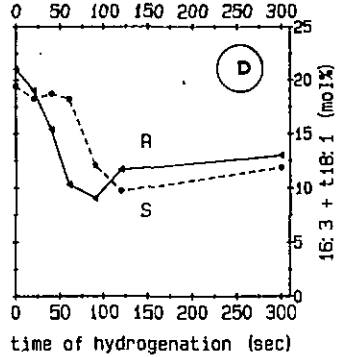
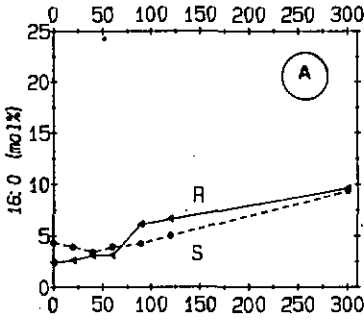
Colonne No : i (cpm)

Valeur 1 =>43  
 Valeur 2 =>48  
 Valeur 3 =>60  
 Valeur 4 =>58  
 Valeur 5 =>63  
 Valeur 6 =>73  
 Valeur 7 =>93  
 Valeur 8 =>86  
 Valeur 9 =>99  
 Valeur 10 =>116  
 Valeur 11 =>122  
 Valeur 12 =>159  
 Valeur 13 =>302  
 Valeur 14 =>497  
 Valeur 15 =>1638  
 Valeur 16 =>31641

	Ech	l	Etalon	Moy	Cpminc
0.0120	43		381	43	338
0.0139	48		441	48	393
0.0153	60		454	60	424
0.0161	56		508	56	450
0.0188	63		554	63	511
0.0222	73		703	73	630
0.0256	93		811	93	718
0.0289	86		913	86	827
0.0330	99		1045	99	946
0.0366	116		1156	116	1042
0.0426	122		1354	122	1232
0.0513	159		1622	159	1461
0.0794	302		2511	302	2209
0.1037	497		3282	497	2785
0.1661	1638		5262	1638	3624
0.2207	3041		6982	3041	3941

Moy	Cpminc	1/free	Chl/bound	bound/Chl	(bound/Chl)/free
43	338	735.6977	4.6813	0.2136	157.1560
48	393	659.0625	4.0249	0.2485	163.7466
60	424	527.2500	3.7304	0.2661	141.3185
58	450	545.4310	3.5145	0.2845	155.1924
63	511	502.1429	2.9782	0.3358	168.6049
73	630	433.3562	2.5110	0.3962	172.5635
91	718	340.1613	2.2626	0.4540	154.4347
86	827	367.8483	1.9127	0.5228	192.3223
99	946	319.5455	1.6722	0.5960	191.0917
116	1042	272.7155	1.5178	0.6589	179.6823
122	1232	259.3033	1.2833	0.7769	201.9636
159	1463	195.9623	1.0812	0.9249	164.0159
302	2209	104.7517	0.7161	1.3965	146.2628
497	2785	67.6519	0.5679	1.7608	112.0777
1638	3624	19.3132	0.4365	2.2910	44.2472
3041	3941	16.4028	0.4014	2.4914	25.9181

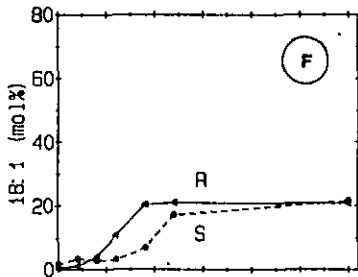
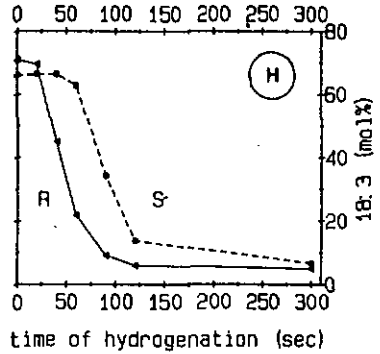
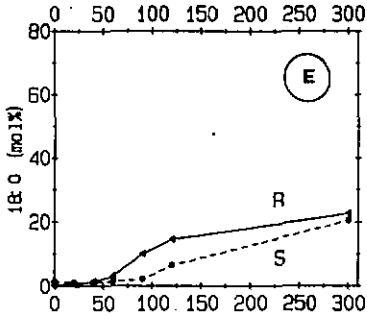
## Annexe 2.1 (MGDG)



Evolution des différents acides gras en 16 carbones pour le monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) des membranes thylacoïdales de *S. nigrum* sensible (S, ●) et résistante (R, ▲) à l'atrazine.

- (A) acide palmitique  
 (B) acide palmitoléique  
 (C) acide hétéradécadiénoïque  
 (D) acides hétéradécatriénoïque (16:3) et *trans*-9-octadécénoïque (t18:1)

## Annexe 2.1 (MGDG)



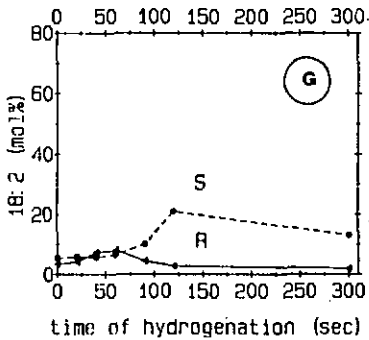
Evolution des différents acides gras en 18 carbones pour le monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) des membranes thylacoïdales de *S. nigrum* sensible (S, -) et résistante (R, +) à l'atrazine.

(E) acide stéarique

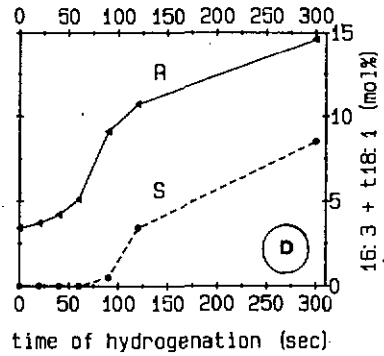
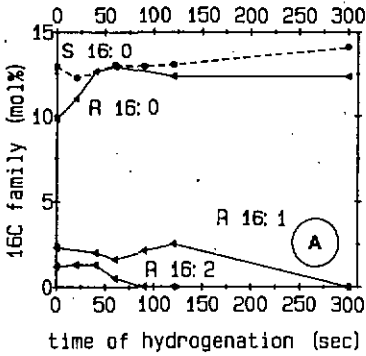
(F) acide oléique

(G) acide linoléique

(H) acide linoléique



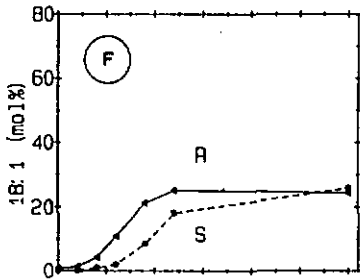
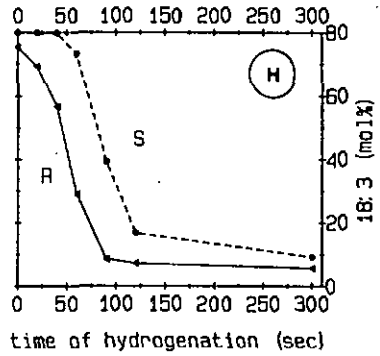
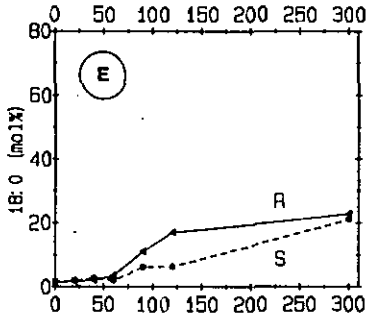
Annexe 2.2 (DGDG)



Evolution des différents acides gras en 16 carbones pour le digalactosyldiacylglycérol (DGDG) des membranes thylacoïdales de *S. nigrum* sensible (S, -) et résistante (R, <math>\blacktriangleleft</math>) à l'atrazine.

- (A) acides palmitique (16:0) et palmitoléique (16:1)
- (D) acides hexadécatriénique (16:3) et trans-9-octadécénoïque (t18:1)

Annexe 2.2 (DGDG)



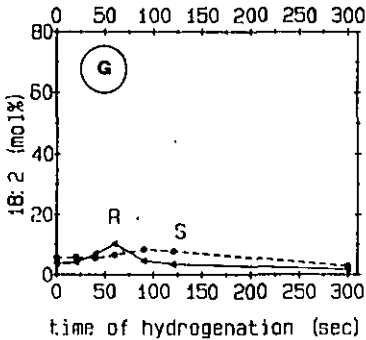
Evolution des différents acides gras en 18 carbones pour le digalactosyldiglycérol (DGDG) des membranes thylacoïdales de *S. nigrum* sensible (S, -) et résistante (R, +) à l'atrazine.

(E) acide stéarique

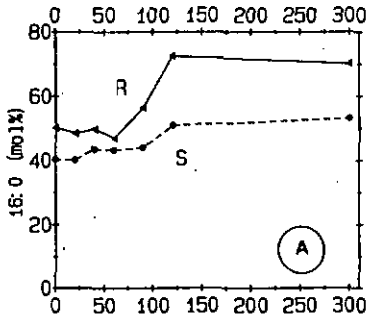
(F) acide oléique

(G) acide linoléique

(H) acide linoléique



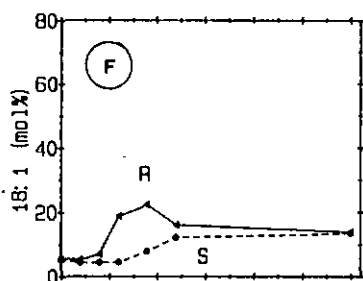
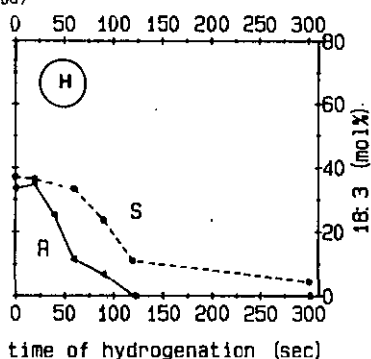
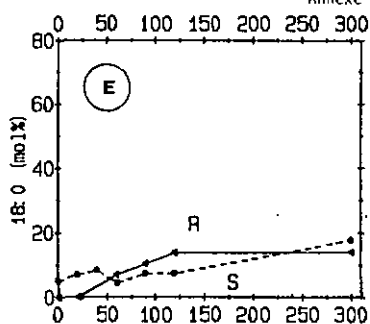
Annexe 2.3 (SQDG)



Evolution des différents acides gras en 16 carbones pour le sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG) des membranes thylacoïdales de *S. nigra* sensible (S, -) et résistante (R, •) à l'atrazine.

(A) acide palmitique

Annexe 2.3 (SQDG)



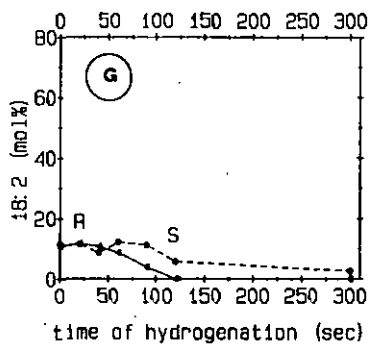
Evolution des différents acides gras en 18 carbones pour le sulfoquinovosyl-diacylglycérol (SQDG) des membranes thylacoïdales de *S. nigrum* sensible (S, -) et résistante (R, +) à l'atrazine.

(E) acide stéarique

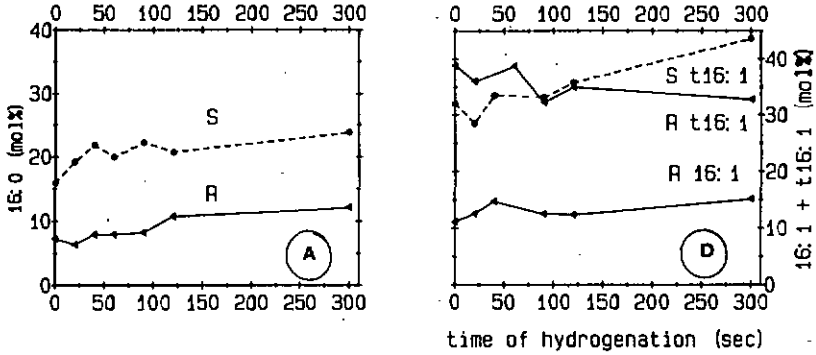
(F) acide oléique

(G) acide linoléique

(H) acide linoléique



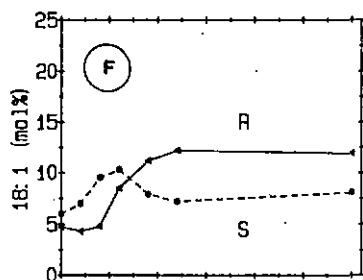
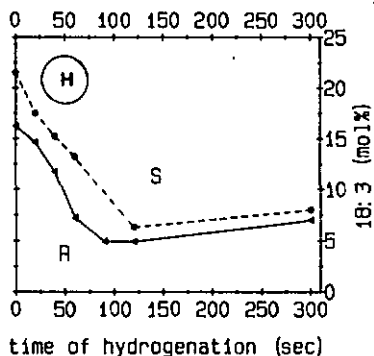
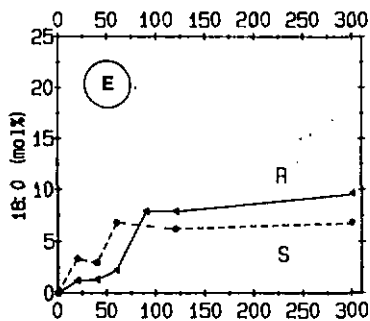
Annexe 2.4 (PG)



Evolution des différents acides gras en 16 carbones pour le phosphatidylglycérol (PG) des membranes thylacoïdales de *S. nigrum* sensible (S, -) et résistante (R, +) à l'atrazine.

- (A) acide palmitique (16:0)
- (D) acides hétéradeca- (3*trans*)-énoïque (t16:1) et palmitoléique (16:1)

Annexe 2.4 (PG)



Evolution des différents acides gras en 18 carbones pour le phosphatidylglycérol (PG) des membranes thylacoïdales de *S. nigrum* sensible (S, -) et résistante (R, +) à l'atrazine.

(E) acide stéarique

(F) acide oléique

(G) acide linoléique

(H) acide linoléique

