

1417

UNIVERSITE DE NEUCHÂTEL
LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE

FACULTE DES SCIENCES
PROFESSEUR P.-A. SIEGENTHALER

**LES GLYCEROLIPIDES : ORGANISATION SPATIALE ET
FONCTIONS DANS LES MEMBRANES
PHOTOSYNTHÉTIQUES DE L'ÉPINARD**

ÉTUDE À L'AIDE DE VÉSICULES INVERSÉES ET DE CYCLODEXTRINES

THÈSE
présentée à la Faculté des Sciences
de l'Université de Neuchâtel
pour obtenir le grade de docteur ès Sciences
option Physiologie végétale
par

Sylvie Duchêne

1998

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Les glycérolipides: organisation spatiale et fonctions dans les membranes photosynthétiques de l'Épinard. Etude à l'aide de vésicules inversées et de cyclodextrines

de Mme Sylvie Duchêne

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

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

MM. P.-A. Siegenthaler (directeur de thèse), E. Martinoia, S. Claude, W. Eichenberger (Uni. Berne) et R. Strasser (Uni. Genève)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 7 septembre 1998

Le doyen:

F. Stoeckli
F. Stoeckli

TABLE DES MATIERES

RÉSUMÉ

ABRÉVIATIONS

CHAPITRE I

Introduction générale

A. Les chloroplastes: siège de la photosynthèse.....	1
B. Organisation structurelle des membranes photosynthétiques.....	2
C. Organisation fonctionnelle des membranes thylacoïdales.....	5
D. Les lipides thylacoïdaux: quelques caractéristiques uniques.....	7
E. Distribution transmembranaire des lipides dans les membranes thylacoïdales.....	9
F. Hétérogénéité latérale des lipides acylés dans les différents domaines des membranes thylacoïdales.....	10
G. Rôles des lipides acylés dans les membranes thylacoïdales.....	11
H. Les cyclodextrines : généralités.....	12

CHAPITRE II

<i>Problématique générale</i>	17
-------------------------------------	----

CHAPITRE III

<i>Matériel</i>	19
-----------------------	----

<i>Méthodes</i>	19
-----------------------	----

A. Préparation du matériel végétal I.....	19
1) Isolement des membranes thylacoïdales (fragmentation par la presse Yeda).....	19
2) Fragmentation mécanique des thylacoïdes (presse Yeda).....	20

3) Séparation et lavage de vésicules thylacoïdales	20
B. Préparation du matériel végétal II	21
1) Isolement des membranes thylacoïdales (fragmentation par ultrasons).....	21
2) Fragmentation des thylacoïdes par ultrasons, préparation des marges des grana.....	22
C. Préparation du matériel végétal III	24
D. Analyse du matériel végétal	25
1) Dosage des chlorophylles	25
2) Traitements enzymatiques	26
3) Traitements par les cyclodextrines	26
4) Détermination de l'activité de flux d'électrons	27
5) Mise en évidence de la pompe protonique	27
6) Spectres de fluorescence des chlorophylles à basse température ..	28
7) Cinétiques d'induction de fluorescence (test du JIP)	28
8) Mesure de l'intégrité des membranes	29
9) Dosage des protéines par la méthode de Lowry	29
10) Electrophorèse en présence de SDS (SDS-PAGE).....	29
11) Quantification relative des protéines par Bioimage	30
12) Analyse lipidique pour chromatographie en phase gazeuse (GC) ou en phase liquide (HPLC).....	30
a. Extraction et séparation des lipides.....	31
b. Analyse des lipides par GC	31
c. Analyse des espèces moléculaires de PG par HPLC	32
C1. Préparation des diacylglycérols à partir de PG	32
C2. Préparation des diacylglycérols-dinitrobenzoyles	33
E. Addendum aux méthodes.....	34

A. Les systèmes biphasiques aqueux.....	34
B. L'action des phospholipases	35
C. L'action des cyclodextrines	35

CHAPITRE IV

Etude de l'asymétrie transversale des phospholipides et de leurs fonctions dans les membranes thylacoïdales entières, les vésicules inside-out et right-side-out

<i>But</i>	38
<i>Résultats</i>	39
Caractérisation des domaines de la membrane thylacoïdale	39
Etude de la distribution transversale des phospholipides et de l'activité du flux d'électrons en fonction de la délipidation des membranes	44
<i>Discussion</i>	53
Caractérisation des domaines membranaires.....	53
Etude de l'asymétrie transversale des phospholipides.....	53
<i>Conclusion</i>	58

CHAPITRE V

Etude de l'asymétrie latérale des lipides dans les différents domaines de la membrane photosynthétique

<i>But</i>	59
<i>Résultats</i>	59
Caractérisation des domaines membranaires.....	59
Etude de la distribution latérale des lipides	62
<i>Discussion</i>	69
Caractérisation des domaines membranaires.....	69
Etude de la distribution latérale des lipides	69
<i>Conclusion</i>	72

CHAPITRE VI

Fonctions des galactolipides, sulfolipides et phospholipides dans les membranes thylacoïdales : investigations par l'intermédiaire des cyclodextrines

<i>But</i>	74
<i>Résultats</i>	75
Comparaison de la capacité de délipidation des membranes thylacoïdales par diverses cyclodextrines.....	75
Influence d'une incubation en présence d' α -cyclodextrine perméthylée sur la composition en acides gras des galactolipides, du sulfolipide et du phosphatidylglycérol de la membrane thylacoïdale.....	80
Influence d'une incubation en présence d' α -cyclodextrine perméthylée sur la composition en espèces moléculaires du phosphatidylglycérol de la membrane thylacoïdale.....	82
Intégrité de la membrane thylacoïdale au cours de la délipidation par l' α -cyclodextrine perméthylée.....	82
Influence de la délipidation par l' α -cyclodextrine perméthylée sur quelques paramètres photosynthétiques tels que le flux d'électrons et la fluorescence des photosystèmes.....	84
<i>Discussion</i>	91
Choix d'une cyclodextrine par comparaison de sa capacité de délipidation des membranes thylacoïdales.....	91
Pourquoi l' α -cyclodextrine perméthylée complexe-t-elle plutôt les sulfolipides et phospholipides que les galactolipides ? A-t-elle une préférence pour certains acides gras (parmi les quatre lipides étudiés) ou pour certaines espèces moléculaires du PG ?.....	91
Intégrité de la membrane thylacoïdale au cours de la délipidation par l' α -cyclodextrine perméthylée.....	95
Influence de la délipidation par l' α -cyclodextrine perméthylée sur le flux d'électrons linéaire découplé dans les membranes thylacoïdales.....	95
Influence de la délipidation par l' α -cyclodextrine perméthylée sur la fluorescence à basse température (77 K) des deux photosystèmes.....	99

Influence de la délipidation par l' α -cyclodextrine perméthylée sur la cinétique d'induction de fluorescence du PSII	100
<i>Conclusion</i>	104
CHAPITRE VII	
<i>Conclusion générale</i>	107
<i>Remerciements</i>	109
<i>Bibliographie</i>	111

RESUME

Etude de l'asymétrie transversale des phospholipides et de leurs fonctions dans les membranes et les vésicules « inside-out » et « right side-out » issues de thylacoïdes

L'asymétrie transversale et la fonction du phosphatidylglycérol (PG) dans les thylacoïdes entiers ont été étudiées précédemment par le groupe de Siegenthaler (Siegenthaler et al., 1989a). Dans cette partie, nous avons vérifié cette asymétrie et son rôle dans la fonction photosynthétique à l'aide de vésicules subthylacoïdales. Deux types de vésicules ont été obtenus par fractionnement mécanique (presse de Yeda) des thylacoïdes : des vésicules « right side-out », issues des lamelles stromatiques et des vésicules « inside-out » issues des grana. Ces vésicules sont séparées à l'aide d'un système biphasique aqueux constitué de dextrane T500 (5.7%) et de polyéthylène-glycol 4000 (5.7%). L'intéressante inversion des vésicules granaires nous permet de vérifier, d'une part, que la distribution transmembranaire du PG dans ces vésicules est bien l'inverse de celle déterminée dans les thylacoïdes entiers ou les vésicules stromatiques et, d'autre part, que la population de phospholipides de la monocouche interne des membranes thylacoïdales est essentielle dans le soutien du flux d'électrons linéaire découplé.

Ces expériences ont montré que la distribution transmembranaire du PG dans les vésicules granaires inside-out ($40/60 \pm 3$ mol%, externe/interne ; $n=5$) est l'inverse de celle que l'on observe dans les vésicules stromatiques right side-out ($70/30 \pm 5$, externe/interne ; $n=5$) ou dans les thylacoïdes non-fractionnés ($59/41 \pm 5$, externe/interne ; $n=5$). Ces valeurs nous permettent également de constater que les grana et les lamelles stromatiques ont une asymétrie transversale du PG différente. Finalement, par l'usage des vésicules inside-out, nous avons confirmé que ce sont principalement les populations de PG de la monocouche interne des membranes thylacoïdales qui sous-tendent l'activité du flux d'électrons non-cyclique à travers le photosystème II.

Etude de la distribution latérale des lipides dans les différents domaines de la membrane photosynthétique

Il est clairement établi que les complexes pigments-protéines sont distribués de façon hétérogène dans les domaines granaires ou stromatiques des membranes thylacoïdales (Murphy, 1986). Le but de cette partie était de déterminer si les glycérolipides présentent une hétérogénéité latérale comparable à celle des protéines de la membrane thylacoïdale. Pour répondre à cette question, nous avons fractionné mécaniquement (à l'aide d'ultrasons) les thylacoïdes en vésicules issues, (a) des lamelles stromatiques, (b) du corps central des grana et (c) des marges des grana (selon la méthode du groupe d'Albertsson ; voir une

revue par Albertsson, 1995). La composition en lipides et acides gras des différents domaines du thylacoïde a été analysée par chromatographie en phase gazeuse.

Cette étude a mis en évidence que les « lipides structuraux » (« bulk lipids ») sont répartis uniformément dans les divers domaines des membranes thylacoïdales, contrairement à ce que la plupart des auteurs affirment.

Fonctions des galactolipides, sulfolipides et phospholipides dans les membranes thylacoïdales : investigations à l'aide des cyclodextrines

Les fonctions des glycérolipides dans les membranes thylacoïdales peuvent être étudiées par diverses méthodes. Cependant, la plupart des techniques font appel à des solvants (voir par exemple, Krupa et Baszynski, 1975 ou Costes et al., 1978) qui ont le désavantage de ne solubiliser que les lipides très peu polaires, ou à des détergents (Eichenberger et al., 1977 ; Eckert et al., 1987 ; Siefertmann-Harms et al., 1987 ; Murata et al., 1990) qui dissolvent non seulement les lipides mais aussi les protéines et les pigments des membranes. C'est pourquoi Rawyler et Siegenthaler (1996) ont cherché une nouvelle méthode évitant ces inconvénients et ont porté leur choix sur les cyclodextrines (CD), des composés utilisés en pharmacologie et chromatographie. Ces molécules sont des oligosaccharides cycliques et forment un anneau dont la cavité est hydrophobe. Elles ont la propriété de former des complexes d'inclusion avec des molécules solubles dans l'eau. Il a été démontré (voir par exemple Okada et al., 1989) qu'elles peuvent même complexer une grande variété de lipides, tels que le cholestérol ou les glycérolipides. C'est ainsi que notre équipe a utilisé avec succès les cyclodextrines pour délipider les membranes thylacoïdales.

Nous avons testé la capacité de délipidation de plusieurs dérivés des cyclodextrines. Après avoir effectué de nombreux essais préliminaires, nous avons arrêté notre choix sur l' α -cyclodextrine perméthylée. En effet, cette CD a la propriété intéressante de complexer, dans une gamme de concentration de 0 à 5mM, uniquement les sulfolipides et phospholipides. Ainsi, en utilisant les connaissances que nous avons déjà de l'influence d'une délipidation du phosphatidylglycérol (PG) sur le flux d'électrons (en présence de phospholipase A_2), nous avons pu estimer le rôle que joue le sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG) et les galactolipides dans la fonction photochimique et confirmer le rôle essentiel du PG.

Le PG est essentiel dans le soutien du flux d'électrons linéaire découplé. Nous avons étudié séparément le flux d'électrons à travers les photosystèmes I ou II et avons observé, que le flux d'électrons à travers le PSII est principalement soutenu par le PG de la monocouche interne des MT mais que, par contre, en ce qui concerne le flux à travers le PSI, c'est le PG de la monocouche externe qui joue un rôle important. Il semblerait donc qu'il existe, latéralement, des sous-populations de PG, que l'on peut considérer comme faisant partie des « lipides

stratégiques », qui ont des influences diverses sur le flux d'électrons photosynthétique dans les membranes thylacoïdales. Les galactolipides, quant à eux, auraient pour fonction de maintenir une conformation spatiale adéquate des complexes pigments-protéines. Finalement, nous ne sommes pas parvenus à mettre en évidence un rôle spécifique des populations de sulfolipides (SQDG) dans les thylacoïdes car, les têtes polaires du PG et du SQDG ayant la même charge électrique, les cyclodextrines n'ont pas de spécificité pour l'un ou l'autre de ces deux lipides. Néanmoins, il serait peut-être possible d'étudier la fonction du SQDG en utilisant d'autres cyclodextrines dérivées ou des approches différentes.

1417

ABREVIATIONS

ATP	adénosine-triphosphate
B3	vésicules inside-out lavées 3x
BS	vésicules issues du corps central des grana
BSA	albumine de sérum de Bœuf
CaCl ₂	chlorure de calcium
CD	cyclodextrine
Chl	chlorophylle
CO ₂	dioxyde de carbone
CuSO ₄	sulfate de cuivre
DBMIB	dibromothymoquinone
DCMU	3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée
DCPIP	2,5-dichlorphénol-indophénol
DGDG	digalactosyldiacylglycérol
EDTA-Na ₂	acide éthylène-diamine-tétraacétique disodé
EGTA	éthylèneglycol-bis(β-aminoéthylether)-N,N,N',N'-tetraacétique acide
FCCP	carbonyl cyanide 4-trifluorométhoxyphénylhydrazone
GC	chromatographie en phase gazeuse
H ₂ O	eau
H ₃ BO ₃	acide borique
HPLC	chromatographie en phase liquide à haute performance
HR	humidité relative
IO	vésicules inside-out issues des grana ; idem à B3
KCl	chlorure de potassium
kDa	kilodalton
KOH	hydroxyde de potassium
Marg	vésicules issues des marges de grana
MgCl ₂	chlorure de magnésium
MGDG	monogalactosyldiacylglycérol
MOPS	morpholinopropane-sulfonate
MT	membranes thylacoïdales

Na ₂ CO ₃	carbonate de sodium
NaCl	chlorure de sodium
NaHCO ₃	hydrogénocarbonate de sodium
NaN ₃	azide
NaOH	hydroxyde de sodium
NH ₄ Cl	chlorure d'ammonium
PC	plastocyanine
PEG	polyéthylèneglycol
PG	phosphatidylglycérol
PLA ₂	phospholipase A ₂
PMS	N-méthylphénazonium methosulfate
PpBQ	phényl para-benzoquinone
PQH ₂	plastoquinones réduites
PSI	photosystème I
PSII	photosystème II
Q _{A,B}	quinones A ou B
RO	vésicules right-side-out issues des lamelles stromatiques ; idem à T3
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis
SQDG	sulfoquinovosyldiacylglycérol
T3	vésicules issues des lamelles stromatiques (lavées 3x)
TEMED	N,N,N,N-tetraéthylméthylènediamine
Tris-HCl	acide chlorhydrique pur
UV	lumière ultraviolette
ZnSO ₄	sulfate de zinc

GLOSSAIRE

Déplétion en lipides :	Manque d'une partie des lipides de la membrane
Délipidation :	Action d'enlever des lipides à la membrane
Dénervurer :	Enlever les nervures principales d'une feuille
Soniquer :	Soumettre à un traitement par des ultrasons

CHAPITRE I

INTRODUCTION GENERALE

A. Les chloroplastes : siège de la photosynthèse

Les réactions photosynthétiques ont leur siège dans des organites spécialisés des cellules végétales, les chloroplastes (Sachs, 1864). Ces chloroplastes, qui mesurent quelques micromètres, renferment un empilement de membranes allongées closes, les thylacoïdes (voir figures I.1 et I.2). Ces derniers contiennent les protéines, les pigments et les lipides nécessaires aux premières étapes de la photosynthèse.

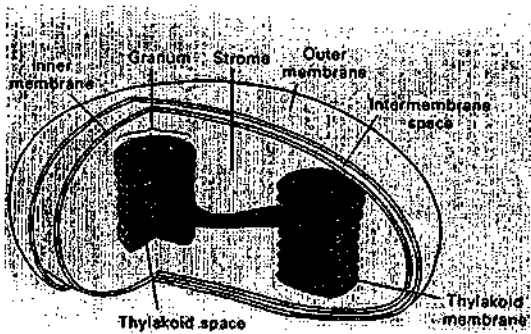


FIG. I.1 : Schéma d'un chloroplaste (d'après Wolfe, S.L. (1972) In : *Biology of the Cell*, p. 130, Wadsworth Publishing Company, Inc., adapté par Stryer, L. (1988) In : *Biochemistry*, p. 518, Freeman W.H. and Company, New York.)

Fondamentalement, la photosynthèse consiste en deux ensembles de réactions (Hill, 1937) :

- la photolyse de l'eau (sous l'action de la lumière visible), qui conduit à un dégagement d'oxygène et à la libération de quatre protons et quatre électrons [$2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4 \text{ électrons}$]. Cette réaction a lieu dans les thylacoïdes.
- la réduction du gaz carbonique par ces quatre protons et quatre électrons qui permet la production de glucides [$\text{CO}_2 + 4\text{H}^+ + 4 \text{ électrons} \rightarrow (\text{CHOH})_n$]. Cette phase se passe dans le stroma des chloroplastes.

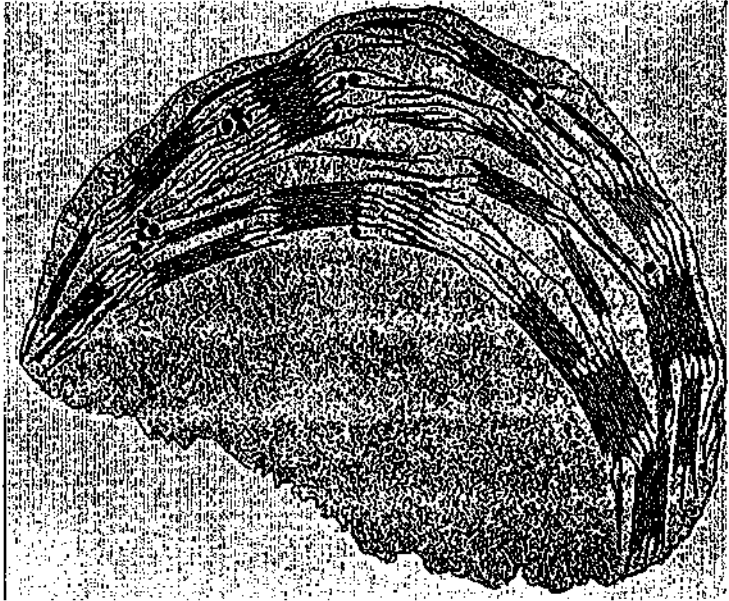


FIG. 1.2 : Photographie au microscope électronique d'un chloroplaste entier d'une feuille d'Epinard (par le Dr. Kenneth Miller, publiée par Stryer, L. (1988) In : Biochemistry, p. 283, Freeman W.H. and Company, New York.). Les vésicules noires sont des grains d'amidon.

B. Organisation structurelle des membranes photosynthétiques de l'Epinard

Les membranes thylacoïdales des chloroplastes de l'Epinard, ou membranes photosynthétiques, sont un assemblage complexe de protéines, pigments et lipides acylés. Elles sont le site de la réaction primordiale de la conversion photosynthétique de la lumière en énergie chimique.

La structure de ces membranes est hautement asymétrique. On peut distinguer non seulement une asymétrie transversale des divers composés (protéines, pigments [Murphy, 1986], lipides [Rawlyer et Siegenthaler, 1985 ; Siegenthaler

et al., 1989a]) mais aussi une asymétrie latérale, c'est-à-dire des domaines membranaires différenciés et spécialisés.

Les membranes photosynthétiques se trouvent à l'intérieur des chloroplastes, dans le stroma (figures I.1 et I.2). Elles consistent en un empilement de membranes appariées closes en forme de saccules allongés, les thylacoïdes. La membrane des thylacoïdes délimite un espace interne, appelé lumen.

Les membranes thylacoïdales peuvent être divisées en deux compartiments principaux : les grana (lamelles accolées) et les lamelles stromatiques (non-accolées). On distingue trois domaines dans les grana : le corps central fait de saccules fortement accolés les uns aux autres, un domaine périphérique, les marges des saccules, et les membranes de fin, parties supérieures et inférieures de l'empilement, faisant face au stroma. Les lamelles stromatiques sont des saccules qui dépassent de l'empilement des grana et baignent dans le stroma ; elles consistent en un domaine de connection avec les grana, en un saccule non-accolé et en un domaine périphérique, marges des lamelles.

La composition en lipides, protéines et pigments est bien différente selon que l'on considère les grana ou les lamelles stromatiques. Les grana contiennent environ 86% de protéines et pigments associés et 14% de lipides acylés (rapport massique) tandis que les lamelles stromatiques sont constituées de seulement 61% de protéines et pigments et 39% de lipides acylés. Il faut noter que l'aire relative occupée par les lipides est un peu plus grande que leur masse relative dans la membrane du fait de leur densité assez faible (par rapport aux protéines). Ainsi, dans les grana, cette aire lipidique est de 24% contre 51% dans les lamelles stromatiques (voir revue par Murphy, 1986).

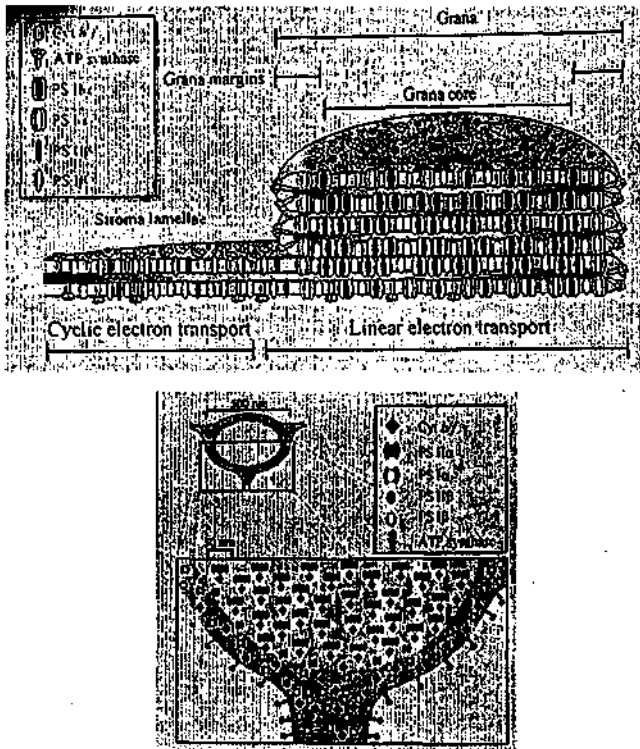
La composition des complexes de protéines associées à des pigments (principalement des chlorophylles mais aussi, de façon libre ou associée, des carotènes, de la lutéine, violaxanthine et néoxanthine) est maintenant bien connue (voir par exemple la revue de Staehelin, 1986). Leur disposition spatiale dans les différents domaines thylacoïdaux et les diverses fonctions photosynthétiques remplies par ces complexes ont été récemment décrits en détail par Albertsson (1995).

Les grana sont le siège du transport photosynthétique d'électron linéaire (ou non cyclique) qui s'effectue grâce à la coopération du photosystème II α , des cytochromes b_6 et f , des plastoquinones et plastocyanines localisés dans le corps central des grana ainsi que du photosystème I α dans les marges granaires. Les marges contiennent aussi le complexe protéinique ATP-synthétase.

Le transport cyclique d'électrons se fait, quant à lui, uniquement dans les lamelles stromatiques où l'on trouve principalement le photosystème I β , de plus petite taille que le PSI α , les cytochromes b_6 et f , le complexe ATP-synthétase et

un peu de PSII β , plus petit que le complexe PSII α (voir la revue d'Albertsson, 1995 et les figures I.3 et I.4).

Ces complexes chlorophylle-protéines sont maintenus en place par une bicouche de lipides acylés, les seconds composants majeurs des thylacoïdes. Comme les protéines, ils montrent une très grande hétérogénéité et semblent interagir avec les complexes protéiniques. Ils pourraient jouer un rôle dynamique, et non pas seulement structural, dans la fonction photosynthétique (Siegenthaler et Trémolières, 1998).



FIGS. I.3 et I.4 : Modèles en trois dimensions de l'organisation spatiale des complexes protéiniques dans la membrane thylacoïdale (d'après Stefansson, H. (1996) The molecular architecture of the chloroplast thylakoid membrane, Thèse, pp. 5 et 39, Département de Biochimie, Université de Lund, Suède)

C. Organisation fonctionnelle des membranes thylacoïdales

Deux ensembles moléculaires très complexes, les photosystèmes I et II, sont impliqués dans les réactions lumineuses de la photosynthèse, réactions qui ont lieu dans les membranes thylacoïdales. Chaque photosystème est constitué (a) d'une antenne collectrice de lumière qui consiste en divers pigments (chlorophylles et caroténoïdes) liés à des polypeptides et (b) d'un complexe central qui porte le centre réactionnel. Ce dernier est composé d'une paire de molécules de chlorophylle *a* liées, elles aussi, à des polypeptides. Le centre réactionnel du photosystème II (PSII) est appelé P680 tandis que celui du PSI se nomme P700. En effet, les chlorophylles *a* spéciales qui les composent absorbent la lumière respectivement à 680 nm et 700 nm.

Les pigments accessoires des antennes des photosystèmes collectent les photons et conduisent l'énergie lumineuse au centre réactionnel ce qui provoque l'excitation électronique des chlorophylles P680 et P700 et déclenche un transfert d'électrons et de protons qui génère la formation de NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, sous forme réduite) et d'ATP (adénosine triphosphate).

Le transport d'électrons d'un système rédox à l'autre peut se faire selon deux voies : non cyclique ou cyclique. Le chemin des électrons est dicté par le potentiel rédox des systèmes transporteurs membranaires. La représentation du trajet des électrons est figurée par le schéma en zigzag ou schéma Z (FIG. I.5). L'organisation spatiale des complexes qui participent aux réactions rédox est représentée par le modèle de la figure I.6.

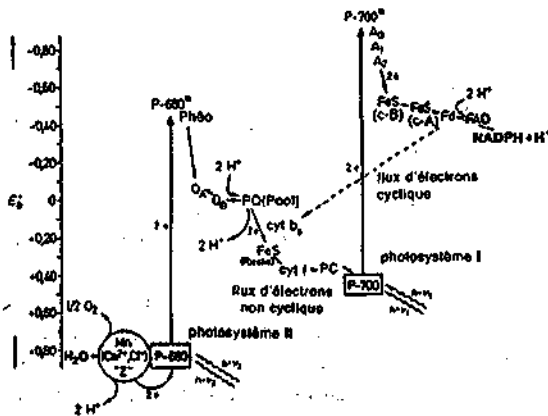


FIG. I.5 : Schéma Z du transport photosynthétique de l'eau au NADP ; les systèmes rédox sont ordonnés selon leur potentiel moyen d'oxydo-réduction ; cyl : cytochrome, Fd : ferrédoxine, FeS : centra fer-soufre, PQ : plastoquinone, PC : plastoquinone, Phéo : phéophytine (d'après Richter, G. (1993) In : Métabolisme des végétaux, p.109, Presses Polytechniques et Universitaires Romandes).

Au cours du transport non-cyclique des électrons, la lumière, absorbée par les pigments accessoires (chlorophylles a, b et caroténoïdes) de l'antenne collectrice du photosystème II, est acheminée vers le centre réactionnel P680. L'énergie lumineuse provoque l'excitation électronique du centre P680 ce qui engendre une séparation de charge. Un électron est alors transféré de P680 à une phéophytine (chlorophylle sans magnésium). Le $P680^+$ photo-oxydé est réduit par Z, un système rédox au potentiel positif élevé ($E_0 = +1.0V$). La réduction de $P680^+$ par Z déclenche une chaîne de réactions du complexe producteur d'oxygène qui est lié au centre réactionnel. Ces réactions libèrent des électrons et des protons et conduisent à la formation d'oxygène moléculaire à partir de l'eau. Les électrons sont acceptés par Z tandis que les protons sont libérés dans l'espace intrathylacoïdal.

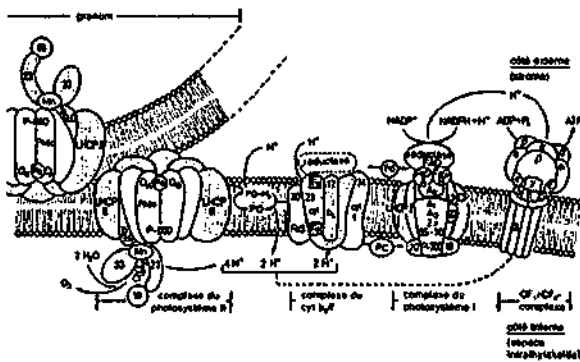


FIG. 1.6: Modèle représentant la topologie des complexes pigments-protéines de la membrane thylacoïdale. Les chiffres donnent les masses moléculaires apparentes des polypeptides (d'après Richter, G. (1993) In : Métabolisme des végétaux, p.112, Presses Polytechniques et Universitaires Romandes).

De la phéophytine, les électrons sont transférés à des plastoquinones primaire et secondaire, Q_A et Q_B puis à un collectif de plastoquinones et, de là, à un complexe protéinique, le cytochrome b_6/f pour passer ensuite par des plastocyanines avant d'arriver dans le photosystème I. De même que dans le PSII, l'énergie lumineuse est collectée par l'antenne du PSI et acheminée vers le centre réactionnel P700. L'excitation électronique provoque une séparation de charge et $P700^+$ photo-oxydé est en mesure d'accepter les électrons libérés par les plastocyanines. De P700, les électrons sont acceptés par A_0 (une forme spéciale de chlorophylle) puis A_1 (vitamine K) puis transitent par des centres fer-soufre pour arriver à la ferredoxine qui est un puissant réducteur. Finalement, une enzyme située du côté stromatique de la membrane

thylacoïdale (le stroma est le milieu dans lequel se trouvent les thylacoïdes), la ferredoxine - NADPH réductase, catalyse la formation du NADPH.

Tandis que les électrons passent de l'eau au NADP via les divers complexes pigments-protéines, des protons (provenant de la photolyse de l'eau) s'accumulent dans le lumen thylacoïdal. Ceci engendre une force proton-motrice qui permet la synthèse d'ATP via un complexe protéinique appelé ATP-synthétase. Cette production d'ATP au cours du transport non cyclique d'électrons est nommée photophosphorylation non cyclique.

Le transport cyclique d'électrons, quant à lui, ne fait intervenir que le photosystème I et le complexe cyt b_6/f et n'engendre que de l'ATP (photophosphorylation cyclique) ; il ne produit ni NADPH ni oxygène (voir le schéma Z représenté dans la figure 1.5). Cette voie a pour départ la ferredoxine. Au lieu d'être transmis au NADP, les électrons aboutissent au complexe cytochrome b_6/f puis retournent vers le photosystème I. Ce transport d'électrons a pour résultat le transfert transmembranaire de protons vers l'espace intrathylacoïdal via le collectif de plastoquinones qui est à proximité du complexe cytochromique. La synthèse de l'ATP se fait grâce à cette accumulation de protons.

L'ATP et le NADPH, formés lors de la phase lumineuse des réactions de la photosynthèse, sont utilisés pour convertir le CO_2 en hexoses et autres composés organiques. La formation des hexoses constitue la phase obscure de la photosynthèse, appelée cycle de Calvin. Ce cycle se déroule dans le stroma des chloroplastes.

Finalement, on peut se demander pourquoi la membrane thylacoïdale a recours à deux flux d'électrons. La raison en est que le cycle de Calvin nécessite plus d'ATP que de NADPH. Or, le transport non cyclique d'électrons produit des quantités à peu près égales d'ATP et de NADPH ; la photophosphorylation cyclique comble la différence en produisant de l'ATP mais pas de NADPH.

D. Les lipides thylacoïdaux : quelques caractéristiques uniques

Le rôle le plus évident de la bicouche lipidique dans les membranes photosynthétiques est de maintenir en place les complexes de protéines tout en leur permettant une certaine diffusion et des changements de conformation, mais en empêchant des agrégations non-spécifiques entre les complexes protéiniques. Il semble que n'importe quel lipide pourrait jouer ce rôle et pourtant, les thylacoïdes, au contraire des autres types de membranes, ont une composition en lipides extrêmement diversifiée. Ces lipides présentent en outre

certaines caractéristiques uniques (Gounaris et al., 1986 ;Siegenthaler, Chap.7, 1998). Communément, les membranes contiennent principalement des phospholipides. Au contraire, les thylacoïdes contiennent une majorité de galactolipides ; ils sont non-chargés et de deux types : 50% de monogalactosyldiacylglycéról (MGDG) et 30% de digalactosyldiacylglycéról (DGDG) (Block et al., 1983). Les thylacoïdes contiennent, en outre, un sulfolipide (~8%), le sulfoquinovosyldiacylglycéról (SQDG), lipide acylé qui semble être présent principalement dans les membranes photosynthétiques. Finalement, le seul phospholipide des thylacoïdes est le phosphatidylglycéról (PG) (~12%) (voir figure I.7).

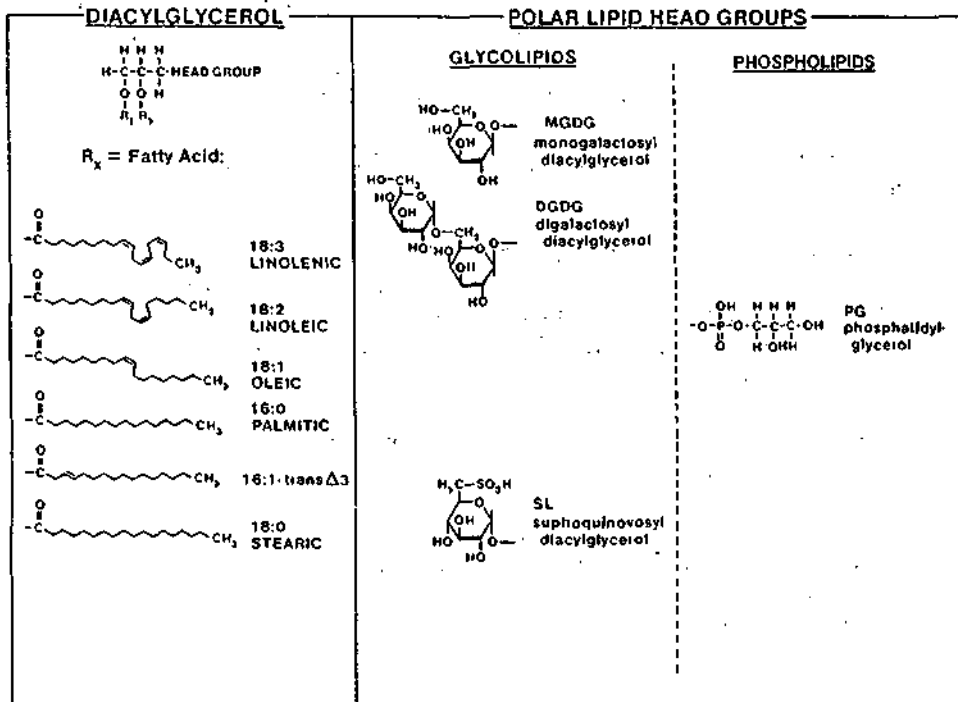


FIG. I.7 : Les lipides thylacoïdaux (d'après Ohlrogge J. et Browse, J. (1995) Lipid Biosynthesis, The Plant Cell, 7, 957-970)

Les deux galactolipides sont caractérisés par une teneur exceptionnellement élevée en acide α -linoléique (C18 : 3). On peut trouver jusqu'à 95% de cet acide gras dans le MGDG. De plus, dans certaines plantes (comme l'Épinard), appelées plantes en 16 : 3, on trouve également ledit acide gras dans le MGDG. Le sulfolipide (SQDG) et le phospholipide (PG) sont également riches en acide linoléique (C18 : 3) mais le SQDG contient aussi 35% d'acide palmitique (C16 : 0) tandis que le PG contient non seulement du palmitate mais aussi un acide gras très spécial que l'on ne trouve que dans le PG des membranes thylacoïdales, l'acide trans- Δ^3 -hexadécénoïque (C16 : 1(3t)) (Dubacq et Trémolières, 1983 ; Xu et Siegenthaler, 1996b). Ainsi, la composition en acides gras des lipides thylacoïdaux est unique et donne lieu à un grand nombre d'espèces moléculaires (Nishiara et al., 1980 ; Xu et Siegenthaler, 1996a).

Du point de vue de l'arrangement spatial des lipides, il est probable que la haute teneur en MGDG dans les thylacoïdes peut modifier la configuration en bicouche des membranes. En effet, ce galactolipide peut adopter, dans certaines conditions, une configuration de type hexagonal II au lieu d'une structure lamellaire (Quinn et Williams, 1983). Finalement, nous l'avons dit, la composition en lipides des thylacoïdes est dominée par les galactolipides (80%) et il semblerait (Bishop et al., 1980) qu'un mélange de MGDG et DGDG forme des monocouches beaucoup plus condensées que celles formées par des phospholipides contenant des acides gras du même type. Les très fortes interactions qui existent entre les groupes galactoses de ces molécules augmentent probablement la stabilité et l'imperméabilité des membranes. Cependant, la membrane garderait sa fluidité grâce à la teneur très élevée en acide linoléique (acide gras insaturé) de ces galactolipides (Ford et Barber, 1983).

E. Distribution transmembranaire des lipides dans les membranes thylacoïdales

La détermination de la distribution transmembranaire des lipides n'est pas aussi aisée que celle des protéines à cause de la taille relativement petite des lipides acylés ; ainsi, les techniques utilisées pour cette détermination altèrent considérablement les propriétés des lipides ciblés et, par conséquent, toute l'organisation de la membrane ; ceci expliquerait l'obtention de résultats parfois contradictoires selon la méthode employée (Siegenthaler, Chap.7, 1998).

Il existe trois techniques principales pour étudier l'asymétrie lipidique transversale : le marquage des lipides par des anticorps, leur digestion par des lipases spécifiques (galactolipases et phospholipases) ou une modification chimique des lipides (oxydation par exemple).

Les études menées à l'aide d'anticorps spécifiques (Radunz et Berzborn, 1970 ; Radunz, 1971, 1972 et 1976) ont fait ressortir une prépondérance du phosphatidylglycérol dans la monocouche externe de la membrane thylacoïdale et une teneur supérieure en monogalactosyldiacylglycérol et en sulfoquinovosyldiacylglycérol dans la monocouche interne. Cependant, étant donné que les anticorps ne reconnaissent qu'une petite partie du lipide, la tête polaire, il peut y avoir un problème d'accessibilité des lipides qui empêcherait une détermination exacte de leur distribution transmembranaire.

Utilisant la méthode lipolytique, le groupe de Siegenthaler (Rawyler et Siegenthaler, 1984 et 1985 ; Siegenthaler et al., 1988; Siegenthaler et al., 1989a) a mis en évidence que la plupart du phosphatidylglycérol (70%) et du monogalactosyldiacylglycérol (65%) se trouve dans la monocouche externe tandis que la plus grande part du digalactosyldiacylglycérol (85%) est localisé dans la monocouche interne. La distribution transmembranaire des galactolipides a été vérifiée et confirmée par l'utilisation de vésicules inversées dans lesquelles l'asymétrie transversale est l'opposée de celle rencontrée dans les thylacoïdes entiers (Siegenthaler et al., 1988). Siegenthaler et al. (1989b) ont aussi déterminé que l'activité de flux d'électrons non-cyclique est soutenue par une population de phospholipides localisée dans la monocouche interne. Unitt et Harwood (1985) ont rapporté que la plupart du phosphatidylglycérol se trouve dans la monocouche externe (66% dans le pois et 75% dans l'orge et la laitue).

La procédure de modification chimique (par une oxydation) des galactolipides accessibles, dans les thylacoïdes et les vésicules inside-out dérivées de ceux-ci, a permis de déduire que 60% des galactolipides se trouvent dans la monocouche externe (Sundby et Larsson, 1985). Cependant, cette technique est sujette à controverse du fait que seuls 0.2-0.5% des galactolipides accessibles sont marqués.

En résumé, on peut dire que l'asymétrie transversale des lipides est maintenant largement reconnue comme étant un phénomène commun à toutes les membranes biologiques (Israelachvili et al., 1977).

F. Hétérogénéité latérale des lipides acylés dans les différents domaines des membranes thylacoïdales

L'étude de l'organisation spatiale des complexes pigments-protéines dans les membranes thylacoïdales a permis d'établir de façon indiscutable que ces composés présentent une distribution latérale hétérogène. Par contre, la

disposition des lipides acylés dans l'axe longitudinal des thylacoïdes est le sujet de nombreuses controverses.

Les glycérolipides thylacoïdaux peuvent être séparés en deux catégories : les lipides stratégiques, c'est-à-dire les lipides accolés aux complexes pigments-protéines, et les lipides structurels qui constituent la majorité des glycérolipides.

Les lipides stratégiques ont été étudiés par le biais de diverses méthodes telles (a) une extraction de certains complexes membranaires à l'aide de solvants (Costes et al., 1972, 1978), (b) l'isolement à l'aide de détergents de particules subchloroplastiques enrichies en PSII ou PSI (Eichenberger et al., 1977 ; Henry et al., 1983 ; Bednarz et al., 1988 ; Ouijja et al., 1988), (c) la purification de certains complexes protéiniques des membranes thylacoïdales (Rawlyer et al., 1980 ; Heinz et Siefertmann-Harms, 1981 ; Trémolières et al., 1981 ; Rémy et al., 1982 ; Doyle et Yu, 1985 ; Gounaris et Barber, 1985 ; Pick et al., 1985 ; Sigrist et al., 1988 ; Murata et al., 1990 ; Trémolières et al., 1994), (d) la détection des lipides à l'aide d'anticorps spécifiques (Radunz, 1981 ; Voss et al., 1992 ; Kruse et Schmid, 1995 ; Makewicz et al., 1995). Ces travaux ont mis en évidence une disposition très spécifique des lipides accolés aux complexes pigments-protéines.

Les lipides structurels ont été étudiés en fractionnant les membranes thylacoïdales en domaines d'origine spatiale différente (Tuquet et al., 1977 ; Gounaris et al., 1983 ; Henry et al., 1983 ; Murphy et Woodrow, 1983 ; Chapman et al., 1984 ; Bednarz et al., 1988). Or, les résultats de ces divers travaux étant contradictoires, il est difficile de savoir s'il existe une hétérogénéité latérale des lipides structurels.

G. Rôle des lipides acylés dans les membranes thylacoïdales

Indiscutablement, la fonction première des lipides thylacoïdaux est d'assurer l'imperméabilité de la membrane. D'autre part, les lipides acylés forment une sorte de tapis dans lequel sont insérés les complexes de pigments et de polypeptides. Cette matrice est considérée comme très fluide car les acides gras des glycérolipides sont hautement insaturés. Ainsi, les galactolipides, qui représentent 70 à 80 % des lipides totaux, contiennent 80-90 % de l'acide gras C18:3. Ce dernier compte trois doubles liaisons qui provoquent des courbures de la chaîne carbonée ce qui entraîne que cet acide gras occupe plus d'espace dans la membrane qu'une chaîne saturée rectiligne. Cela implique que la membrane n'est pas trop compacte ce qui permet aux complexes chlorophylle-protéines de diffuser légèrement dans l'axe longitudinal.

Cependant, les lipides n'ont pas qu'un rôle structurel. Il existe des interactions entre les lipides et les protéines. Mattoo et al. (1987) ont démontré que, chez *Spirodela* (une plante aquatique), la protéine D1, qui fait partie du centre réactionnel du PSII, doit impérativement être liée covalamment à l'acide palmitique (C16:0; sous forme d'acide gras libre) pour pouvoir s'insérer à la bonne place dans le photosystème. D'autres interactions, plus faibles, jouent néanmoins un rôle crucial. Par exemple, la présence du PG, qui contient l'acide trans- Δ^3 -hexadécénoïque (C16:1(3t)), est nécessaire à l'organisation correcte de l'antenne collectrice de lumière du PSII (Dubacq et Trémolières, 1983 ; Nussberger et al, 1993 ; Hobe et al, 1994, 1995 ; Trémolières et Siegenthaler, Chap.9, 1998). En résumé, les lipides permettent de maintenir les complexes chlorophylle-protéines dans une conformation appropriée afin que ces derniers puissent fonctionner normalement.

H. Les cyclodextrines : généralités

Nous présentons ici les cyclodextrines car ces molécules ont constitué, au cours de notre thèse, un moyen très original de complexer les lipides thylacoïdaux et d'étudier l'influence d'une telle délipidation sur la fonction photosynthétique.

Historique

Villiers fut le premier, en 1891, à isoler une substance cristalline à partir d'un milieu de culture de *Bacillus amylobacter*, milieu qui contenait de l'amidon. Il nomma cette substance cristalline « cellulose » à cause de sa ressemblance avec la cellulose. Un peu plus tard, Schardinger (1903 et 1911) progressa dans la chimie des cyclodextrines (CD) en caractérisant la substance cristalline comme un mélange de deux oligosaccharides qu'il nomma dextrines cristallines α et β . Il publia aussi les premières descriptions détaillées de la préparation et de l'isolement de ces oligosaccharides cycliques. Ainsi, les CD sont aussi connues sous les noms de dextrines de Schardinger, cycloamyloses ou cycloglucanes.

Production des cyclodextrines

Les CD sont formées par dégradation de l'amidon par une enzyme, la cyclodextrine-trans-glycosidase (CTG) ou cyclodextrine-glycosyltransférase (Bergsma et al., 1988 ; Szejtli, 1988). Les molécules d'amidon ayant une structure en hélice constituée d'unités α -(1,4)-glucose, les composés formés lors du processus enzymatique sont aussi des produits cycliques faits d'unités α -1,4- de glucopyranose. Les CD sont désignées par une lettre grecque qui

indique le nombre d'unités de glucopyranose : α - pour 6 unités, β - pour 7, γ - pour 8 unités et ainsi de suite (voir figure 1.8). Les homologues de 9 unités ou plus existent mais il est difficile de les purifier et leur capacité à complexer des substances est pauvre (Clarke et al., 1988). Pour des raisons stériques, on ne peut former des CD de moins de 6 unités.

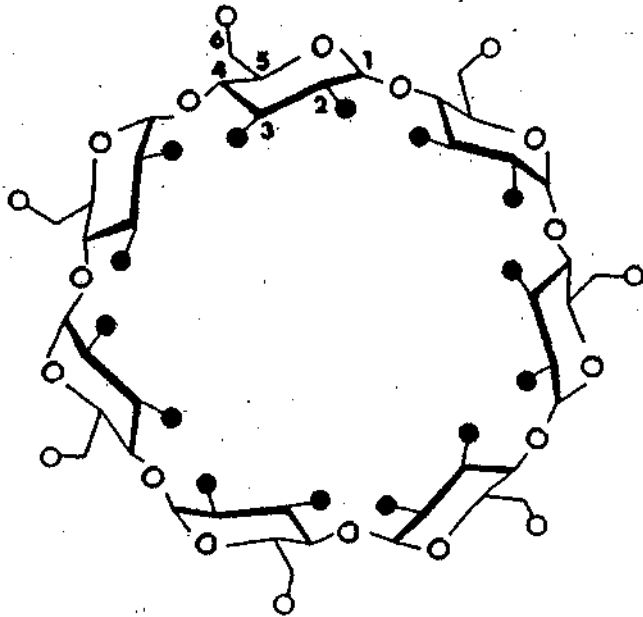


FIG. 1.8 : Structure de la β -cyclodextrine (les cercles blancs représentent les groupes hydroxyles primaires, les noirs les secondaires ; d'après Bekers et al. (1991)).

La source de l'enzyme CTG est usuellement *Bacillus macerans* mais on peut aussi utiliser *Klebsiella pneumoniae* et *Alkalophilic bacterium* n° 38-2. Le rapport entre les formes α -, β - et γ - dépend du type de bactérie. La proportion des différentes formes de CD dépend aussi du temps d'incubation de l'enzyme dans le milieu contenant l'amidon. En effet, la plupart des enzymes CTG forment d'abord des α -CD puis, beaucoup plus lentement, des CD contenant un nombre plus élevé d'unités.

Structure et propriétés physiques des cyclodextrines

Du fait de la conformation du carbone 1 et de celle des résidus α -D-glucopyranosyl ainsi que de l'impossibilité d'une rotation libre autour des liaisons glycosidiques, les CD ne sont pas des molécules parfaitement cylindriques mais ont plutôt une forme légèrement cônica. Il y a trois groupes hydroxyls par glucopyranose (sur les carbones 2, 3 et 6), dirigés vers l'extérieur de l'anneau. Les hydroxyls primaires (sur le C6) sont sur une des faces de l'anneau tandis que les secondaires (sur les C2 et C3) sont sur l'autre face (voir figures 1.8 et 1.9). Ces groupes rendent l'extérieur de la CD hydrophile (Clarke et al., 1988 ; Brewster et al., 1989). La cavité de l'anneau consiste en groupes CH et en oxygènes (liens entre les glucopyranoses) ; cette cavité est par conséquent relativement peu polaire. Le diamètre de la cavité, en angström, est de 5 pour l' α -CD, 6 pour la β - et 8 pour la γ . La hauteur du cône est la même pour toutes : 7.9Å. Le diamètre interne de l'anneau conditionne la capacité de complexation des CD (Bender et Komiyama, 1978). C'est pourquoi cette capacité est différente d'une cyclodextrine à l'autre.

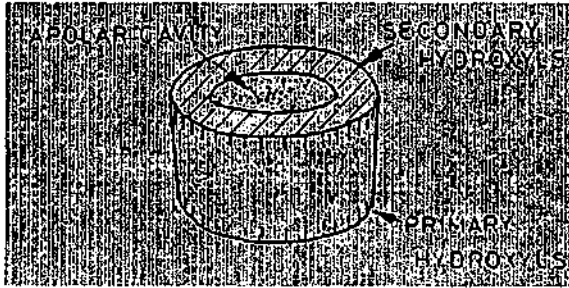


FIG. 1.9 : Représentation schématique d'un anneau de CD (d'après Szejtli, J. (1990) *The cyclodextrins and their applications in Biotechnology. Carbohydrate Polymers*, 12, 375-392)

La solubilité des CD varie aussi de l'une à l'autre : la β -CD est peu soluble (1.85g/100ml d'eau) en comparaison de l' α -CD (14.5) ou de la γ -CD (23.2) (Bekers et al., 1991). Il semble que la basse solubilité de la β -CD s'expliquerait par le fait qu'il existe de nombreuses liaisons hydrogène intramoléculaires entre les groupes hydroxyles secondaires ce qui stabiliserait et rigidifierait la structure de la CD, empêchant son hydratation (Szejtli, 1988 ; Uekama et Otagiri, 1987 ; Brewster et al., 1989). La γ -CD a une structure plus flexible, ce qui la rend plus soluble. Les principales caractéristiques et propriétés des

cyclodextrines α , β et γ sont présentées dans le tableau I.1 (les valeurs sont issues du travail de Bekers et al., 1991).

Il est possible de modifier les CD pour améliorer leur solubilité, diminuer leur toxicité ou modifier leur sélectivité. Les groupes hydroxyles sont dérivables, c'est pourquoi des groupes fonctionnels très variés ont été incorporés dans les CD. On a préparé, par exemple, des CD méthylées, alkylées ou hydroxyalkylées mais aussi des CD ramifiées ou polymérisées (pour une revue plus complète, on se référera au travail de Bekers et al. (1991)). Cependant, il faut être attentif au fait que les dérivés de cyclodextrines commercialisés sont souvent instables, la dérivation n'étant pas complète. C'est pourquoi nous avons employé, pour ce travail, des dérivés qui avaient été synthétisés spécialement pour nous par le laboratoire de Chimie Organique de l'Université de Neuchâtel (Suisse).

TABLEAU I.1 : Caractéristiques de quelques cyclodextrines

Type de CD	Nb. d'unités glucosyl	Diamètre de la cavité interne (Å)	Solubilité aqueuse (g/100ml)	Poids moléculaire (kD)
α -CD	6	5	14.5	973
β -CD	7	6	1.85	1135
γ -CD	8	8	23.2	1297

1417

CHAPITRE II

PROBLEMATIQUE GENERALE

La photosynthèse est un phénomène aussi crucial que complexe. Elle a pour siège les chloroplastes qui contiennent eux-mêmes des membranes empilées, les thylacoïdes, dans lesquels ont lieu les premières étapes (dépendantes de la lumière) de la photosynthèse. Ces membranes sont formées d'une bicouche lipidique dans laquelle sont insérés des complexes protéiniques associés à des pigments. Ce sont ces complexes qui captent la lumière, permettant ainsi la photolyse de l'eau et la formation d'un gradient de protons et d'un flux d'électrons associés à la production d'ATP et de NADPH. Ces premiers phénomènes induisent la synthèse de glucides à partir du CO₂ atmosphérique qui est capté par les stomates des feuilles de la plante.

Les réactions dépendantes de la lumière requièrent un haut degré d'organisation des complexes pigments-protéines. Leur distribution transversale et latérale asymétriques leur confère des propriétés vectorielles nécessaires à la conversion de l'énergie.

Quant aux lipides acylés, ils ont, eux aussi, un rôle très important à jouer dans le maintien de la perméabilité sélective des membranes et de la conformation spatiale correcte des complexes protéiniques. Cependant, une question se pose : si les lipides thylacoïdaux n'ont qu'un rôle de maintien, pourquoi leur composition est-elle si différente de celle des autres membranes cellulaires. Au lieu d'être composées principalement de phospholipides, les membranes thylacoïdales sont constituées d'une majorité de galactolipides et contiennent deux lipides plutôt rares dans les membranes, le sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG) et le phosphatidylglycérol (PG) contenant un acide gras inhabituel, l'acide trans- Δ^3 -hexadécénoïque (C16 : 1 (3t)). Des études ont montré qu'aussi bien les galactolipides que les phospholipides sont distribués asymétriquement de part et d'autre de la bicouche lipidique (Rawlyer et Siegenthaler, 1985 ; Siegenthaler et al., 1989a). Nous savons également qu'il existe certaines interactions entre les lipides et les protéines. Mattoo et al. (1987) ont démontré dans des plantes de *Spirodela* que la protéine D₁, un des premiers accepteurs du photosystème II, doit être acylée de façon covalente à l'acide palmitique pour trouver sa place correcte dans le complexe du photosystème II. Quant au PG, il joue un rôle important dans la biogenèse de la membrane photosynthétique, permettant l'organisation spatiale de l'antenne collectrice de lumière (LHCII) (Dubacq et Trémolières, 1983 ; Nussberger et al., 1993 ; Hobe et al., 1994, 1995 ; Trémolières et Siegenthaler, Chap.9, 1998).

Dans le présent travail, nous tenterons de répondre aux questions suivantes :

- (1) L'asymétrie transversale du PG est-elle identique dans les différents domaines thylacoïdaux ?
- (2) Y-a-t-il une asymétrie latérale des glycérolipides dans les membranes thylacoïdales?
- (3) Quels sont les fonctions des galactolipides, du phosphatidylglycerol et du sulfolipide dans les membranes thylacoïdales ?

Pour répondre à ces questions, nous avons eu recours à des méthodes nouvelles et originales. Pour résoudre les deux premiers problèmes, nous avons, d'une part, fractionné mécaniquement (par une presse de Yeda ou par des ultrasons) des membranes thylacoïdales et, d'autre part, isolé les vésicules engendrées par le fractionnement (ces vésicules sont issues de domaines thylacoïdaux différents) au moyen de systèmes biphasiques aqueux. Cette méthode a le grand avantage de ne pas exposer les membranes à des détergents qui pourraient déplacer les lipides. Pour répondre à la troisième question, nous avons délipidé les membranes thylacoïdales à l'aide de cyclodextrines, des oligosaccharides cycliques, qui ont la propriété d'encapsuler des molécules hydrophobes dans la cavité délimitée par leur anneau. Ces molécules n'avaient jamais été utilisées comme agent délipidant. Les cyclodextrines sont généralement employées comme transporteurs de médicaments à travers les membranes. Elles permettent une meilleure solubilisation des composants à usage pharmaceutique et réduisent leur toxicité. Elles sont aussi utilisées dans les colonnes de chromatographie notamment parce qu'elles ont la capacité de séparer des molécules chirales.

CHAPITRE III

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL

Les feuilles d'Épinard (*Spinacia oleracea* L.) proviennent du marché local. Le Dextran T500 et le Percoll sont distribués par Pharmacia Diotech (Dübendorf, Suisse), le polyéthylène glycol 4'000 (Carbowax PEG 3350) par Christ Chemie (Aesch, Suisse). La phospholipase A₂ de pancréas de porc et la phospholipase C de *Bacillus cereus* sont fournies par Sigma (Bâle, Suisse) ou Doehringer Mannheim (Rotkreuz, Suisse). L'albumine de sérum de boeuf (BSA) vient de chez Fluka (Buchs, Suisse). Quatre cyclodextrines dérivées (β-carboxylée, β-quaternaire, β-amphotère, β-sulfatée) proviennent de Supelco (Buchs, Suisse). Les autres cyclodextrines dérivées (α-perméthylée, β-perméthylée, β-peracétylée) ont été produites et fournies gracieusement par le Dr. S. Claude, du département de Chimie Organique de l'Université de Neuchâtel (Suisse).

METHODES

A. PREPARATION DU MATERIEL VEGETAL I

Nous n'avons pas utilisé la même méthode de préparation des thylacoïdes et vésicules pour toutes les parties expérimentales. La méthode relatée ci-dessous fait référence au chapitre IV.

1) Isolement des membranes thylacoïdales (fragmentation par la presse de Yeda)

Les opérations d'isolement des thylacoïdes sont effectuées à 4°C. Nous avons utilisé une méthode proche de celle décrite par Andreasson et al. (1988).

Les feuilles d'Épinard (environ 300g), achetées la veille dans les marchés locaux, sont entreposées à l'obscurité à 4°C afin d'épuiser leurs réserves d'amidon. Elles sont « dénervurées » et broyées dans un mélangeur de type Waring-Blender pendant 10 secondes (à vitesse maximale) dans 750 ml de milieu de broyage (300 mM saccharose, 50 mM tampon sodium-phosphate (pH 7,4), 5 mM MgCl₂, 0,1% BSA). L'homogénat est filtré à travers quatre couches de gaze et deux couches de toile à bluter et centrifugé à 3'000 x g pendant 10 minutes (4'500 rpm, rotor GSA). Le culot est resuspendu dans du milieu de broyage et centrifugé à 1'500 x g pendant 5 minutes (3'500 rpm, rotor SS-34).

Le culot de chloroplastes est remis en suspension et lysé osmotiquement dans un milieu hypotonique contenant 5 mM $MgCl_2$ puis centrifugé à 1'500 x g pendant 5 minutes (3'500 rpm, rotor SS-34). Les culots de membranes thylacoïdales sont lavés deux fois dans un milieu composé de 300 mM saccharose, 10 mM tricine (pH 7,4), 5 mM $MgCl_2$. Les thylacoïdes sont ensuite lavés (1'500 x g, 5 minutes, rotor SS-34) une fois dans un milieu constitué de 300 mM saccharose, 10 mM tampon sodium-phosphate (pH 7,4), 5 mM NaCl et remis en suspension dans un milieu composé de 100 mM saccharose, 10 mM tampon sodium-phosphate (pH 7,4), 5 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$ à une concentration de 4 mg Chl/ml.

2) Fragmentation mécanique des thylacoïdes (presse Yeda)

Ces opérations sont effectuées selon la méthode décrite par Akerlund et Andersson (1983).

Les thylacoïdes isolés (4 mg Chl/ml) sont désintégrés par un double passage à travers une presse Yeda à une pression de gaz de 100 kg/cm². Après addition de Na-EDTA (concentration finale de 5mM) pour chélater le magnésium afin de désaccoler les membranes encore intactes, les thylacoïdes sont passés deux fois à travers la presse Yeda. L'amidon et le matériel non-fragmenté sont éliminés par une centrifugation à 1'000 x g pendant 10 minutes (3'000 rpm, rotor SS-34).

3) Séparation et lavage des vésicules thylacoïdales

Le mélange de vésicules inside-out et right-side-out qui constitue le surnageant est séparé à l'aide d'un système biphasique aqueux de la manière suivante : 1 ml de vésicules (4 mg Chl/ml) est ajouté à 24g d'un mélange de polymères de façon à obtenir un système de phases de la composition suivante : 5.7 % (g/g) de dextrane T500, 5.7 % (g/g) de polyéthylène-glycol 4'000, 10 mM de tampon sodium-phosphate (pH 7.4), 5 mM NaCl et 20 mM saccharose. Ce mélange est préparé à l'avance en mélangeant 7.13g de 20 % (g/g) dextrane, 3.56g de 40 % (g/g) PEG 3'350, 1.2g de 0.1M NaCl, 1.2g de 0.2M tampon sodium-phosphate (pH 7.4), 4g de 0.1M saccharose et H₂O déionisée jusqu'à 24g.

Il est crucial que le système de phases soit à 2-3°C durant la séparation des vésicules.

Après l'addition des vésicules thylacoïdales, le système de phases est soigneusement mélangé par inversion et centrifugé à 1'500 x g pendant 3 minutes dans un rotor swinging-bucket. La phase supérieure (T1), constituée des vésicules right-side-out, et la phase inférieure (B1), faite des vésicules inside-out, sont collectées et lavées séparément (1'500 x g, 3 min., rotor

swinging-bucket) avec, respectivement, des phases inférieure (B0 ; 10ml) et supérieure (T0 ; 10ml) pures de façon à obtenir des fractions T2 et B2. Celles-ci sont à nouveau lavées avec les phases B0 et T0 de manière à obtenir des fractions T3 et B3. Les figures III.1 et III.2 (partie supérieure de la figure) représentent les différents domaines thylacoïdaux et la méthode de préparation des fractions subthylacoïdales.

Les phases T0 et B0 sont issues d'un système de phase de 500g préparé en mélangeant dans une bouteille à double entrée 142.5g de 20 % dextrane T500, 71.2g de 40 % polyéthylène-glycol 4'000, 25g de 0.1M NaCl, 25g de 0.2M tampon sodium-phosphate (pH 7.4), 100g de 0.1M saccharose et H₂O déionisée jusqu'à 500g. Le mélange froid (4°C) est secoué vigoureusement et on le laisse se séparer toute une nuit à 4°C. La phase supérieure (T0) et la phase inférieure (B0) sont collectées et stockées séparément jusqu'à leur utilisation.

La concentration de polymère requise pour une séparation optimale peut varier en fonction de fluctuations des poids moléculaires des différents lots commerciaux de polymères; il est donc judicieux de l'ajuster par un test visuel préalable : on doit obtenir idéalement 40 % de T1 et 60 % de B1 si la concentration de polymère est correcte.

Les vésicules thylacoïdales sont extraites des polymères par une dilution de 4 à 5x dans une solution de 10mM NaCl ou 40mM KCl (si l'on veut tester la pompe protonique) ou dans un milieu d'incubation composé de 300mM sorbitol, 25mM tricine (pH 7.8), 10mM NaCl, 5mM MgCl₂ et 1mM CaCl₂ (pour les délipidations avec la phospholipase A₂). Elles sont ultracentrifugées deux fois à 100'000 x g pendant 30 min. (rotor Ti 70). Les culots sont remis en suspension dans le milieu requis pour les tests d'activité.

B. PREPARATION DU MATERIEL VEGETAL II

La méthode relatée ci-dessous fait référence au chapitre V.

1) Isolement des membranes thylacoïdales (fragmentation par ultrasons)

Les opérations d'isolement des thylacoïdes sont effectuées à 4°C. Nous avons utilisé la méthode décrite par Andreasson et al. (1988).

Les feuilles d'Epinard (environ 70-100g) sont achetées la veille dans les marchés locaux et entreposées à l'obscurité à 4°C afin d'épuiser leurs réserves d'amidon. Elles sont dénervurées et broyées dans un mélangeur de type Waring-Blender pendant 10 secondes (à vitesse maximale) dans 250 ml de milieu de broyage (300 mM saccharose, 50 mM tampon sodium-phosphate (pH 7,4), 5 mM MgCl₂, 0,1% BSA). L'homogénat est filtré à travers quatre couches de gaze et deux couches de toile à bluter et centrifugé à 3000 x g pendant 10

minutes (4'500 rpm, rotor GSA). Le culot est remis en suspension dans du milieu de broyage et centrifugé à 1'500 x g pendant 5 minutes (3'500 rpm, rotor SS-34). Le culot de chloroplastes est remis en suspension et lysé osmotiquement dans un milieu hypotonique fait de 5 mM $MgCl_2$ puis centrifugé à 1'500 x g pendant 5 minutes (3'500 rpm, rotor SS-34). Les culots de membranes thylacoïdales sont lavés deux fois dans un milieu composé de 300 mM saccharose, 10 mM tricine (pH 7,4), 5 mM $MgCl_2$. Les thylacoïdes sont ensuite lavés (1'500 x g, 5 minutes, rotor SS-34) une fois dans un milieu contenant 100 mM saccharose, 10 mM tampon sodium-phosphate (pH 7,4), 5 mM NaCl et 1 mM $MgCl_2$. Les membranes sont remises en suspension dans le même milieu à une concentration en chlorophylles de 4 mg/ml.

2) Fragmentation des thylacoïdes par ultrasons, préparation des marges de grana

Les thylacoïdes sont incubés 45 minutes en présence du $MgCl_2$ (1mM) contenu dans le milieu de suspension afin de permettre aux membranes d'être correctement accolées ce qui garantit une bonne fragmentation. Après ce temps d'incubation, 2g de thylacoïdes (8 mg de chlorophylle) sont ajoutés à 9.66g d'un mélange de polymères de façon à obtenir un système de phases de la composition suivante : 5.6 % (g/g) de dextrane T500, 5.6 % (g/g) de polyéthylène-glycol 4'000, 10 mM de tampon sodium-phosphate (pH 7.4), 3 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$ et 20 mM saccharose. Ce mélange est préparé à l'avance en mélangeant 3.26g de 20 % (g/g) dextrane T 500, 1.63g de 40 % (g/g) PEG 4'000, 0.48g de 0.2 M tampon sodium-phosphate (pH 7.4), 0.25g de 0.1 M NaCl, 0.33g de 0.1 M saccharose, 69 μ l de 0.141 M $MgCl_2$ et H_2O déionisée jusqu'à 9.66g.

Le mélange est transféré dans un récipient en aluminium entouré de glace (les figures III.1 et III.2 illustrent la méthode décrite ci-dessous). Le système est soumis aux ultrasons (soniqué) 6 x 30 secondes (avec des arrêts d'1 minute entre 2 sonications) à une amplitude de 52 % à l'aide d'un sonicateur Vibra-Cell, modèle VC 400W, équipé d'une sonde d'un demi-pouce de diamètre. Au système « soniqué » sont ajoutés 6.5 ml de phase inférieure pure et 5 ml de phase supérieure pure. Les phases inférieures (B1) et supérieures (T1) sont lavées 3x de façon à obtenir des fractions T3 et B3 (pour la préparation de ces systèmes de phases et la technique de séparation des vésicules, se référer au paragraphe A.3 « Séparation et lavage des vésicules thylacoïdales »).

Les fractions T3 et B3 constituent respectivement les vésicules right-side-out et les vésicules inside-out. Pour obtenir des marges de grana (Wollenberger et al., 1994), 1 ml de T0 est ajouté aux B3 qui sont alors « soniquées » 14 x 30 secondes à une amplitude de 40 %. 9 ml de T0 sont ajoutés au système

« soniqué » qui est lavé 3x. La nouvelle phase T3 (M) constitue les marges des grana et la nouvelle B3 (BS), le corps central des grana (voir figures III.1 et III.2).

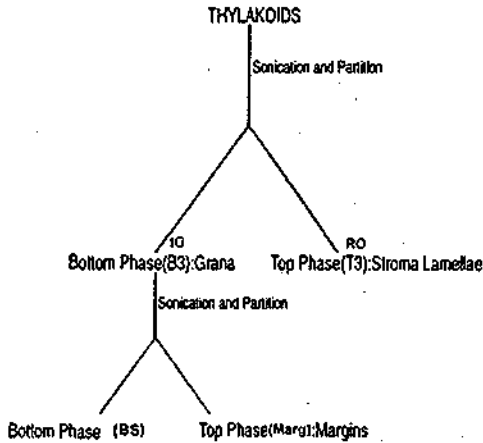
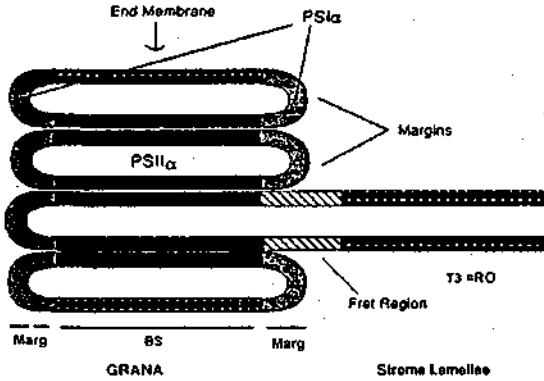


FIG. III.1 : Diagramme illustrant les différents domaines thylacoïdaux et la méthode de préparation des vésicules subthylacoïdales (d'après Wollenberger L, Siefansson H, Yu S-G and Albertsson P-A [1994] BBA 1184, 93-102). La fraction IO est aussi appelée B3 parce que les vésicules issues des grana sont lavées 3x et se trouvent dans la phase inférieure (« Bottom phase »). Il en est de même pour la fraction RO également appelée T3 car les vésicules issues des lamelles stromatiques sont lavées 3x et se trouvent dans la phase supérieure (« Top phase »).

Les vésicules thylacoïdales (T3, M et BS) sont extraites des polymères par une dilution de 4 à 5x dans un milieu contenant 100 mM saccharose, 10 mM tampon sodium-phosphate (pH 7.4), 5 mM NaCl et 1 mM MgCl₂. Les vésicules sont ultracentrifugées 2x à 100'000 x g pendant 30 minutes (rotor Ti 70). Les culots sont remis en suspension dans le même milieu et la concentration en chlorophylles est ajustée à 1 mg/ml.

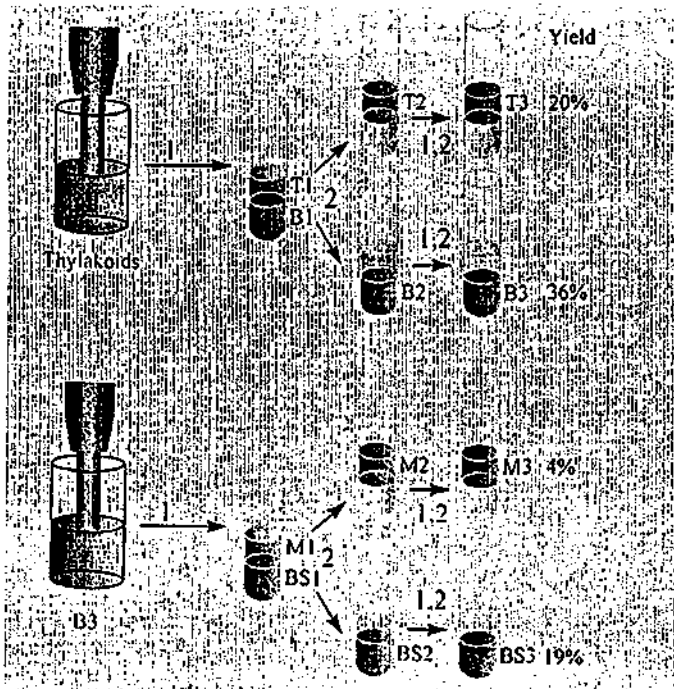


FIG. III.2 : Illustration de la méthode de préparation des vésicules thylacoïdales (d'après Stefansson H. (1996) Thèse, p.22, Département de Biochimie, Université de Lund, Suède). Les symboles des différentes fractions obtenues sont données dans la figure III.1. M1, M2 et M3 = Marges lavées 1, 2 ou 3 fois.

C. PREPARATION DU MATERIEL VEGETAL III

La méthode relatée ci-dessous fait référence au chapitre VI.

Isolement de membranes thylacoïdales purifiées (pour les traitements par les cyclodextrines)

Les opérations d'isolement des thylacoïdes sont effectuées à 4°C. Nous avons utilisé la méthode décrite par Rawyler et Siegenthaler (1989).

Les feuilles d'Épinard (100-150g), achetées la veille dans les marchés locaux sont entreposées à l'obscurité à 4°C afin d'épuiser leurs réserves d'amidon. Elles sont dénervurées et broyées dans un mélangeur de type Waring Blender pendant 10 secondes (à vitesse maximale) dans 250-375 ml de milieu de broyage (330 mM sorbitol, 30 mM MOPS (pH 7.8 avec KOH), 2 mM EDTA-Na₂, 0.15% BSA). L'homogénat est filtré à travers quatre couches de gaze et deux couches de toile à bluter et centrifugé à 1'500 x g pendant 2 minutes (3'000 rpm, rotor GSA). Le culot de chloroplastes est remis en suspension dans 20 ml de milieu de broyage et 2 x 10 ml de la suspension sont déposés sur une couche de 20 ml de milieu Percoll 40 (40% Percoll, 330 mM sorbitol, 30 mM MOPS (pH 7.8 avec KOH)). Les tubes sont centrifugés 10 minutes à 2'500 x g (3'500 rpm avec accélération lente, rotor HL-4 «swinging-bucket», centrifugeuse Sorvall GLC-1) et les culots de chloroplastes intacts sont remis en suspension et lysés osmotiquement 1-2 minutes dans 36 ml d'un milieu hypotonique contenant 10 mM tricine (pH 7.8 avec KOH) et 2 mM EDTA-Na₂. L'isotonie est restaurée par l'ajout de 4 ml de 3 M sorbitol. Les tubes sont centrifugés à 13'400 x g pendant 5 minutes (9'000 rpm, rotor HB-4) et les culots de membranes thylacoïdales sont remis en suspension dans du milieu de lavage (300 mM sorbitol et 10 mM tricine (pH 7.8 avec KOH)). Quinze millilitres de milieu Percoll 5 (5% Percoll, 300 mM sorbitol, 10 mM tricine (pH 7.8 avec KOH)) sont injectés lentement sous la suspension (20 ml) et les tubes sont centrifugés à 20'000 x g pendant 10 minutes (11'000 rpm, rotor HB-4 avec accélération lente). Les culots de thylacoïdes sont lavés dans le milieu de lavage à 13'500 x g pendant 5 minutes (9'000 rpm, rotor HB-4) et remis en suspension dans le même milieu à une concentration de 2 mg Chl/ml.

D. ANALYSE DU MATERIEL VEGETAL

1) Dosage des chlorophylles

La méthode relatée ci-dessous fait référence aux chapitres IV, V et VI.

Les chlorophylles totales sont estimées par la méthode de Bruinsma (1961).

A 5 ml d'une solution d'acétone 80 % sont ajoutés 25 µl de la suspension de thylacoïdes ou de vésicules sub-thylacoïdales. La solution est vigoureusement agitée et centrifugée 1 min. à 3'000 x g (centrifugeuse de table). L'absorbance

du sumageant (le culot est fait de protéines dénaturées) est lue à 647, 652 et 663 nm par comparaison avec une référence faite d'acétone 80 %.

La concentration totale en chlorophylles totales (mg/ml) est obtenue en multipliant l'absorbance à 652 nm par un facteur de 5.55. Les concentrations en chlorophylles a et b sont estimées par la méthode de Lichtenthaler (1987) et exprimées en $\mu\text{g/ml}$:

$$[\text{Chla}] = (12.25 \times A_{663} - 2.79 \times A_{647}) \times \text{facteur de dilution}$$

$$[\text{Chlb}] = (-5.10 \times A_{663} + 21.5 \times A_{647}) \times \text{facteur de dilution}$$

2) Traitements enzymatiques

La méthode relatée ci-dessous fait référence au chapitre IV.

Préalablement à ces traitements enzymatiques, les vésicules sont lavées (par ultracentrifugation) et les thylacoïdes remis en suspension dans un milieu d'incubation (300 mM sorbitol, 25 mM tricine (pH 7.8), 10 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 et 1 mM CaCl_2) à une concentration de 1 mg de Chl/ml.

Les thylacoïdes et les vésicules thylacoïdales sont mis à incuber en présence ou en absence (contrôle sans enzyme) de phospholipase A_2 (4 unités/mg Chl) à l'obscurité et à 2°C (dans la glace) pendant 80 min., puis elles sont placées à 20°C pendant 40 min. Des parties aliquotes du mélange (240 μl) sont prélevées à des temps prédéterminés. On ajoute à ces prélèvements de l'EGTA (2 mM, pH 7.8), afin d'arrêter la réaction enzymatique (par chélatage du calcium indispensable à la phospholipase), et de l'albumine de sérum de boeuf (20 mg/ml), afin de lier les acides gras libres et les lysophospholipides formés au cours de la délipidation. Les échantillons sont laissés 10 min. dans la glace (afin de permettre l'arrêt de la réaction de la PLA_2 et la liaison des produits de la délipidation) avant d'être dilués dans 5 ml de milieu de lavage (300 mM sorbitol, 25 mM tricine (pH 7.8), 5 mM MgCl_2 et 2 mM EGTA pour les thylacoïdes ; 100 mM saccharose, 10 mM tampon sodium-phosphate (pH 7.4) et 5 mM NaCl pour les vésicules) et centrifugés à 10'000 x g pendant 6 min. Le culot est remis en suspension dans 240 μl de milieu (100 mM KCl, 10 mM tricine (pH 7.8), 1 mM EGTA pour les thylacoïdes ; 100 mM saccharose, 5 mM NaCl pour les vésicules) et utilisé pour la détermination de l'activité de transport d'électrons et du contenu en phospholipides.

3) Traitements par les cyclodextrines

La méthode relatée ci-dessous fait référence au chapitre VI.

Les membranes thylacoïdales (75 μg Chl/ml dans le milieu de lavage, cf paragraphe C « Isolement des membranes thylacoïdales purifiées ») sont incubées pendant 20 minutes à 0°C en présence d'une cyclodextrine en suspension dans du milieu de lavage (à diverses concentrations : 0-10 mM) et centrifugées à 14'500 x g pendant 10 minutes pour arrêter la réaction (les complexes de CD et de lipides restent dans le surnageant). Les culots de membranes sont lavés dans le milieu de lavage et remis en suspension à la concentration requise pour la suite des expériences (1-2 mg Chl/ml).

4) Détermination de l'activité de flux d'électrons

La méthode relatée ci-dessous fait référence aux chapitres IV et VI.

L'activité du flux d'électrons basal ou découplé non-cyclique dans l'un ou l'autre des photosystèmes est mesurée à 20°C à l'aide d'une électrode à oxygène de type Clark. L'intensité de la lumière actinique après filtration à travers un filtre anti-chaueur (Calflex) et un filtre rouge (DT-red) est d'environ 29 mW/cm² au niveau de la cuvette.

Le transport d'électrons à travers le photosystème I, du DCPIP réduit (par l'ascorbate) jusqu'au méthylviologène/O₂, est mesuré dans un milieu contenant 40 mM tampon sodium-phosphate (pH 7.4), 1 mM NaCl, 0.6 mM NaN₃, 0.12 mM méthylviologène, 0.3 mM DCPIP, 32 mM ascorbate, 10 μM DCMU, 2 mM NH₄Cl et des thylacoïdes ou vésicules à une concentration en chlorophylles de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Par cette méthode, nous mesurons une consommation d'oxygène. Le transport d'électrons à travers le photosystème II de H₂O à PpBQ est mesuré en présence de 30 mM tampon sodium-phosphate (pH 6.5), 3 mM NaCl, 60 mM saccharose, 0.2 mM PpBQ, 2 mM NH₄Cl et des thylacoïdes ou vésicules à une concentration en chlorophylles de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. En revanche, par cette méthode, nous mesurons un dégagement d'oxygène.

5) Mise en évidence de la pompe protonique

La méthode relatée ci-dessous fait référence au chapitre IV.

L'activité de pompage des protons est mesurée à l'aide d'un pH-mètre (électrode de verre combinée) dans une mini-cuvette (0.5 ml) contenant 10 mM NaCl, 20 mM PMS et des thylacoïdes ou vésicules à une concentration de chlorophylles de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (pour un volume final de 333 μl). Le pH est ajusté à l'obscurité entre 6.5 et 7.0 puis la lampe (équipée d'un filtre anti-chaueur Calflex et d'un filtre rouge DT-red) est allumée et le nouveau pH est mesuré; le pH est titré en retour par l'adjonction de 1 mM HCl. L'augmentation ou la diminution du pH du milieu externe aux membranes permet de déduire

l'orientation du flux de protons à travers la membrane des thylacoïdes et leur degré de diffusion membranaire.

6) Spectres de fluorescence des chlorophylles à basse température (77K)

La méthode relatée ci-dessous fait référence aux chapitres IV, V et VI.

L'absorption spectroscopique à 77°K est mesurée sur un spectrofluorimètre fabriqué dans le laboratoire et équipé d'un dispositif refroidi par l'azote liquide et de fibres optiques. La lumière d'excitation, réglée par un monochromateur (Bausch and Lomb), est de 480 nm \pm 10 nm; la lumière d'émission est mesurée entre 630 et 780 nm \pm 5 nm (monochromateur Bausch and Lomb).

L'échantillon (50 μ l) de thylacoïdes ou de vésicules, ajusté à 1 mg Chl/ml, est dilué 10 x dans du glycérol 80 % (450 μ l). De ce mélange, sont prélevés 50 μ l (correspondant à 5 μ g Chl) qui sont déposés sur un filtre en cellulose dans un cylindre en acier que l'on plonge dans l'azote liquide. La lumière de fluorescence de l'échantillon est recueillie par une fibre optique et envoyée vers un monochromateur.

7) Cinétiques d'induction de fluorescence (test du JIP)

La méthode relatée ci-dessous fait référence au chapitre VI.

Ces expériences ont été conduites dans le laboratoire de Bioénergétique de l'Université de Genève (dirigé par le Professeur R. Strasser).

Les cinétiques d'induction de fluorescence sont enregistrées par une boîte de contrôle appelée « Plant Efficiency Analyser » (PEA, Hansatech Ltd., King's Lynn, Norfolk, Grande-Bretagne). Une lumière rouge, servant de lumière actinique et de lumière d'excitation (650 \pm 50 nm), issue de 6 diodes (LED, modèle LH-36), illumine le flacon qui contient la solution de thylacoïdes. La fluorescence des chlorophylles, issue uniquement des chlorophylles a du PSII (à 20°C), passe à travers un filtre (730 nm, 50 % de transmission) et est recueillie par un détecteur (PIN photocell). La fluorescence est mesurée dans un flacon de 4 ml contenant 400 mM saccharose, 5 mM MgCl₂, 15 mM NaCl, 20 mM MOPS (pH 7.6) et des membranes thylacoïdales (40 μ g Chl/ml).

La lumière des diodes, pilotée par la boîte de contrôle PEA, est allumée (100% d'irradiance) et le signal de fluorescence est enregistré durant 1 seconde. La fluorescence est enregistrée toutes les 10 μ s. Le cinquième point (50 μ s) représente une valeur sûre qui est désignée comme l'intensité de fluorescence initiale, F₀.

8) Mesure de l'intégrité des membranes

La méthode relatée ci-dessous fait référence au chapitre VI.

L'intégrité des membranes thylacoïdales au cours de la délipidation par les cyclodextrines est évaluée par un test d'osmolarité (Siegenthaler et al., 1989). Le volume des membranes est mesuré avant et après adjonction de saccharose à diverses concentrations. Si la membrane est intègre, l'adjonction de sucre provoque une extrusion d'eau qui se manifeste par une diminution du volume des thylacoïdes.

Les membranes thylacoïdales sont lavées et mises en suspension à une concentration de 2 mg Chl/ml dans un milieu sans osmoticum (40 mM tricine (pH 8), 3 mM $MgCl_2$). Des parties aliquotes de cette suspension sont mélangées à une solution de 200 mM saccharose de manière à obtenir diverses concentrations de saccharose (40, 51 et 60 mM). On permet à la réaction d'équilibre osmotique de se produire pendant 5 minutes avant de transférer la suspension dans des tubes capillaires (volume : 75 μ l). Les capillaires sont centrifugés 5 minutes à 23'000 x g (microcentrifugeuse Christ) puis le volume des thylacoïdes est estimé par le calcul du rapport de la hauteur du sédiment de thylacoïdes et de la hauteur totale de la solution dans le tube capillaire.

9) Dosage des protéines par la méthode de Lowry

La méthode relatée ci-dessous fait référence aux chapitres IV, V et VI.

Afin d'éviter toute interférence entre les pigments chlorophylliens et le colorant utilisé pour le dosage, il est préférable d'estimer la concentration en protéines membranaires avec la méthode de Lowry (Lowry et al., 1951) modifiée par Markwell et al. (1981), plutôt qu'avec la méthode de Bradford (Spector, 1978). La BSA est utilisée comme protéine de référence. Un échantillon contenant moins de 100 μ g de protéines membranaires est ajusté à 1 ml avec de l'eau. Un réactif (3 ml) constitué de 100 volumes de la solution A (2 % Na_2CO_3 , 0.4 % NaOH, 0.16 % tartrate de sodium et 1 % (p/v) SDS) et d'un volume de la solution B (4% $CuSO_4 \times 5H_2O$) est ajouté à l'échantillon. Après agitation et incubation pendant 10 min., 0.3 ml de réactif de Folin dilué 2x avec de l'eau sont ajoutés. Après 45 min. à l'obscurité, l'absorbance est lue à 500, 660 et 750 nm par comparaison avec un contrôle constitué par l'ensemble des réactifs à l'exception des protéines.

10) Electrophorèse en présence de SDS (SDS-PAGE)

La méthode relatée ci-dessous fait référence aux chapitres IV, V et VI.

Les échantillons protéiques, contenant 15 µg de protéines, sont dilués dans un rapport 1:1 avec du tampon pour échantillon SDS-PAGE (0.125 M Tris-HCl (pH 6.8), 0.01 % (p/v) bleu de bromophénol, 4 % (p/v) SDS, 12.5 % (v/v) glycérol et 10 % (v/v) mercaptoéthanol) et sont ensuite dénaturés à 100°C pendant 3 min. Les polypeptides sont séparés par électrophorèse par la méthode de Laemmli (1970). Le gel de concentration (0.8 ou 1.5 mm d'épaisseur) contient 5 % (p/v) d'acrylamide (le rapport acrylamide/bisacrylamide est de 30:0.8), 0.125 M Tris-HCl (pH 6.8), 0.1 % (p/v) SDS, 0.5 % (v/v) TEMED et 0.025 % (p/v) de persulfate d'ammonium. Le gel de séparation contient 13 % (p/v) d'acrylamide (acrylamide/bisacrylamide 30:0.8), 0.375 M Tris-HCl (pH 8.8), 0.1 % (p/v) SDS, 0.04 % (v/v) TEMED et 0.015 % (p/v) de persulfate d'ammonium. Certains gels sont constitués par un gradient linéaire de 13 à 17 % d'acrylamide. Le tampon d'électrophorèse est fait de 25 mM Tris-HCl (pH 8.3), 192 mM glycine et 0.1 % (p/v) SDS. Après la migration des protéines, les gels sont fixés pendant 15 min. dans une solution contenant 25 % d'alcool dénaturé et 8 % d'acide acétique, colorés au bleu de Coomassie R-250 (Weber et Osborn, 1969) environ 1 heure et décolorés dans la solution de fixation.

Les poids moléculaires apparents sont estimés en calculant la mobilité relative des polypeptides par rapport aux protéines de référence suivantes : phosphorylase b (94 kDa), albumine sérique de boeuf (67 kDa), ovalbumine (43 kDa), anhydrase carbonique (30 kDa), inhibiteur trypsique du soja (20.1 kDa) et α -albumine du lait (14.4 kDa).

11) Quantification relative des protéines par Bioimage

La méthode relatée ci-dessous fait référence au chapitre V.

La quantification relative des protéines sur un gel d'électrophorèse non-séché se fait grâce au système BIOIMAGE (Millipore, Le Mont-sur-Lausanne, Suisse) qui est constitué d'un scanner et d'un ordinateur pour le traitement de l'image. Le gel, coloré mais non-séché, est scanné et la densité optique de chaque bande de polypeptides est mesurée.

12) Analyse lipidique par chromatographie en phase gazeuse (GC) ou en phase liquide (HPLC)

La méthode relatée ci-dessous fait référence aux chapitres IV, V et VI.

Pour les points *a* et *b*, nous avons employé la méthode décrite, notamment, dans les travaux de Siegenthaler et al. (1989a), Rawyler et Siegenthaler (1996), Xu et Siegenthaler (1996b).

a. Extraction et séparation des lipides

Les lipides sont extraits de la suspension de thylacoïdes ou de vésicules (200 µg de Chl pour les études d'asymétrie transversale et 150-300 µg de Chl pour étudier l'asymétrie latérale) dans un système biphasique constitué de 4 ml de chloroforme/méthanol (53:37) et de 2 ml de 0.5 M KCl. Le mélange est vigoureusement agité et centrifugé 5 min. à 3'000 x g. La phase inférieure est filtrée à travers de la fibre de verre et le chloroforme est évaporé sous flux d'azote. L'extrait lipidique est remis en suspension dans 300 µl de chloroforme/méthanol (dans un rapport de 8:2, v/v) et déposé sur une plaque de verre (20 x 10 cm pour un développement en une seule dimension afin de séparer les phospholipides ; 20 x 20 cm pour un développement en deux dimensions et une séparation de tous les lipides des vésicules issues des marges des grana, des lamelles stromatiques et du corps central des grana) recouverte d'une couche mince de gel de silice (Silicagel type 60 sans indicateur fluorescent, MERCK). L'application se fait sous forme d'une mince bande (30 x 2 mm pour un développement en une dimension; 10 x 2 mm pour deux dimensions) à l'aide d'une seringue par un appareil conçu pour le dépôt automatique, le Linomat IV (CAMAG, Mutenz, Suisse). La plaque est placée dans une cuve de développement horizontal (une dimension) ou vertical (deux dimensions) et développée dans le mélange acétone/toluène/eau (91:30:8) pour une dimension. Pour séparer tous les lipides en deux dimensions, le système de solvants varie en fonction de la quantité de chlorophylle déposée sur la plaque :

- Pour une quantité de chlorophylle inférieure à 150 µg, on utilise un mélange constitué de chloroforme/ méthanol/ eau (65:25:4) puis du chloroforme/ méthanol/ acide acétique/ eau (85:15:10:3).
- Pour une quantité de chlorophylle comprise entre 250 et 300 µg, on utilise un mélange de chloroforme/ méthanol/ ammoniac 25%/ eau (65:35:3:2) puis du chloroforme/ méthanol/ eau (65:25:4).

Après le développement, la plaque est séchée et les lipides sont identifiés par pulvérisation d'une solution de primuline (0.1 % dans acétone/eau, 80:20, v/v; Wright, 1971) qui permet l'identification des lipides sous UV (323 nm). Les zones de silices contenant les lipides sont grattées à l'aide d'une lame de rasoir.

b. Analyse des lipides par GC

La silice contenant les lipides à analyser par GC (dans notre cas PG pour l'étude de l'asymétrie transversale et MGDG, DGDG, SQDG et PG pour l'étude de l'asymétrie latérale) est récupérée dans un tube contenant une quantité connue (30 à 50µg) d'acide arachidique (C20:0) qui sert de standard interne. Du méthanol contenant 5 % d'acide sulfurique (1 ml) est ajouté et le tube est fermé sous azote et placé 1h dans un bloc chauffant à 85°C.

Après refroidissement, 2 ml de pentane et 1 ml d'eau sont ajoutés; les tubes sont agités 30 secondes et centrifugés 5 minutes à 3'000 x g pour séparer les deux phases. L'épiphase contenant les méthylesters est prélevée et séchée sous azote. Les échantillons sont resuspendus dans 120 µl d'hexane et sont injectés dans le chromatographe en phase gazeuse afin de déterminer l'identité et quantifier les lipides et leurs acides gras.

Le chromatographe est un appareil de marque Hewlett-Packard (modèle 5890, série II) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et d'une colonne capillaire de 30 m de longueur et 0.53 mm de diamètre intérieur renfermant un film de 1 µm de polyéthylène-glycol-TPA modifié (HP-FFAP). La température du four est de 190°C, celles du détecteur et de l'injecteur de 230°C. Les méthylesters sont élués par un flux d'hélium (vitesse : 15 ml/min.). L'identité des méthylesters est obtenue en comparant leurs temps de rétention avec ceux des substances de référence. La quantification se fait par comparaison de la surface des pics avec celle du standard interne, la surface des pics étant calculée automatiquement par l'ordinateur qui pilote le chromatographe Hewlett-Packard.

c. Analyse des espèces moléculaires de PG par HPLC

cl. Préparation des diacylglycérols à partir de PG

Dans le cadre de l'étude de l'asymétrie latérale des lipides, nous avons déterminé les espèces moléculaires dont est constitué le PG dans les fractions suivantes : membranes thylacoïdales entières (MT), lamelles stromatiques (T3) et corps central des grana (BS). La fraction des marges de grana n'est pas assez abondante pour permettre une détection en HPLC (il faut déposer sur la plaque de silice au minimum 250-300 µg). Pour mémoire, les différents domaines thylacoïdaux sont représentés sur la figure III.1.

Nous avons utilisé la méthode décrite par Kito et al. (1985) et améliorée par Xu et Siegenthaler (1996a). Les zones de silice contenant le PG sont grattées à l'aide d'une lame de rasoir et récupérées dans une pipette Pasteur contenant de la fibre de verre (filtration). Douze µg (6 µl) de phosphatidylcholine - 18:0/18:0 (standard interne, stock 2 µg/µl dans du chloroforme/méthanol 1:1, v/v) sont ajoutés dans la pipette et le PG est élué ml par ml avec 4 ml de chloroforme/méthanol (1:1) dans un tube à pas-de-vis de 7 ml. 1,8 ml de 500 mM KCl sont ajoutés au filtrat qui est vortexé puis centrifugé 3 min. à 3'000 x g. La phase inférieure est transférée dans un autre tube et séchée sous azote (N₂). Les lipides sont dissous dans 1,25 ml de milieu d'incubation (30 mM H₃BO₃, 1 mM ZnSO₄, 5 mM CaCl₂ et 10 mM Tris-HCl (pH 7,5)) et le tube est soniqué 30 sec. On ajoute alors 20 unités (10 µl) de phospholipase C de *Bacillus cereus* et 2 ml d'éther saturé en eau. L'incubation se fait sous agitation

rotative (30 tours/min.) à 35°C pendant 1h. La phospholipase C scinde la tête polaire du PG libérant des diacylglycérols. Après l'incubation, les tubes sont centrifugés 3 min. à 3'000 x g ; la phase supérieure est transférée dans un autre tube et la phase inférieure est lavée par 2 ml d'éther. La nouvelle phase supérieure est ajoutée à l'épiphase précédente et le solvant est évaporé sous N₂.

c2. Préparation des diacylglycérols-dinitrobenzoyles

Aux diacylglycérols sont ajoutés 25 mg de chlorure de dinitrobenzoyl (DNBC) et 0,5 ml de pyridine. Le tube est chauffé 10 min. à 60°C afin que le DNBC se fixe à l'endroit où se trouvait la tête polaire du PG. Le tube est refroidi dans la glace, 2 ml de 0,1N HCl et 1,5 ml d'hexane y sont ajoutés puis il est vigoureusement agité et centrifugé 3 min. à 3'000 x g. L'épiphase est transférée dans un autre tube et l'hypophase est lavée par 1,5 ml d'hexane. Les épiphases réunies sont séchées sous azote pour éliminer la pyridine. Deux millilitres d'hexane sont ajoutés afin de remettre en suspension les lipides puis l'on procède à une série de lavages avec les solutions suivantes (entre chaque lavage, le tube est agité puis centrifugé 2 min. à 2'000 x g et la phase inférieure est aspirée et jetée) : 3x avec 2 ml de 0,1N HCl, 1x avec 2 ml de 0,1M de NaHCO₃, 1x avec 2 ml de 1N NaCl et 1x avec 2 ml d'eau distillée. La phase d'hexane (phase supérieure) est transférée dans un tube à pas-de-vis de 7 ml et séchée sous azote. Les lipides sont remis en suspension dans 100-200 µl d'acétonitrile/isopropanol (80:20, v/v). Le tube est chauffé 1 min. à 30°C avant l'injection (20 µl) dans la HPLC.

L'identification des pics représentés sur les spectres de chromatographie se fait de la manière suivante (Xu et Siegenthaler, 1996a) :

- Tout d'abord, on récupère la partie aliquote de solvant qui correspond au pic représenté sur le spectre
- Puis le prélèvement, constitué de deux acides gras lié à du DNBC, est méthylé et analysé par chromatographie gazeuse (se référer au paragraphe 12b ci-dessus).

Le chromatographe est un appareil de marque Kontron (modèle HPLC-system 400) équipé d'un détecteur UV (détection à 254 nm pour le PG), d'une précolonne de type Nucleosil 120-7 C18 (Macherey-Nagel, Oensingen, Suisse) dont les dimensions sont de 11 x 6 x 4 mm et d'une colonne de 250 x 6 x 4 mm de type Nucleosil 100-5 C18 (Macherey-Nagel, Oensingen, Suisse). L'éluant est constitué d'acétonitrile et d'isopropanol (80:20, v/v) et son débit est de 1ml/min.

E. ADDENDUM THEORIQUE

1) Mode d'action des cyclodextrines

Les cyclodextrines ont la particularité de former des complexes d'inclusion avec un grand nombre de composés en les piégeant à l'intérieur de la cavité de l'anneau. Les molécules hydrophobes sont incorporées dans la cavité des CD par déplacement de l'eau. Cette réaction est favorisée par la répulsion de la molécule envers l'eau. La molécule-hôte encapsulée est rendue soluble par cette complexation. Lorsque le complexe soluble est dilué dans un volume de solvant aqueux beaucoup plus important, le processus est inversé et la molécule-hôte est relâchée dans la solution (voir la figure III.3).

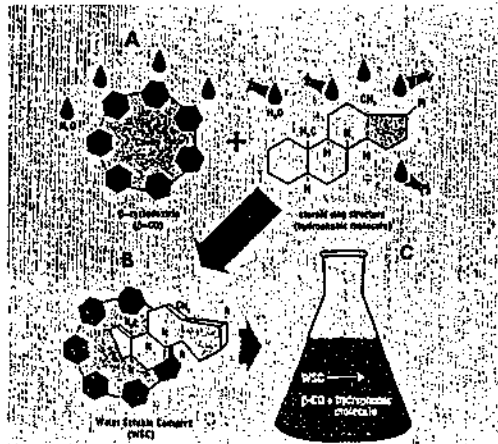


FIG. III.3: Mode d'action des cyclodextrines (CD) : A. mise en présence de la CD et de la molécule-hôte, B. complexation, C. libération de la molécule-hôte par ajout d'une grande quantité d'eau (d'après le journal de SIGMA, The Source, 1991).

La condition minimale requise pour que la complexation ait lieu est que la molécule-hôte doit s'ajuster entièrement ou au moins partiellement dans la cavité de la cyclodextrine. Le complexe sera instable si la molécule-hôte est trop petite car elle glissera hors de l'anneau. La formation d'un complexe sera également impossible si la molécule-hôte est trop volumineuse pour la cavité. Cependant, si certains groupes ou certaines chaînes latérales de la molécule-hôte peuvent pénétrer dans la CD, la formation du complexe est possible (Bekers et al., 1991).

Etant donné que le diamètre de la cavité de la CD se situe entre 5 et 8 Å (selon le type de CD) et que le diamètre approximatif d'une chaîne d'acide gras est de 5 Å, la formation d'un complexe lipide acylé-CD semble tout à fait possible. D'ailleurs, Siegenthaler (1998) a montré à l'aide d'un modèle qu'une des chaînes d'acides gras du galactolipide MGDG pouvait parfaitement s'insérer dans la cavité de la β -cyclodextrine.

Il semblerait que les complexes soient stabilisés par divers types de forces intermoléculaires telles que : (1) des interactions de Van der Waals entre la molécule-hôte et l'anneau (Lukovits, 1988 ; Saenger, 1980), et (2) des liaisons hydrogène. Il y a en outre des changements d'enthalpie très favorables lors du remplacement des molécules d'eau qui se trouvent dans la cavité par des molécules-hôtes. En effet, les molécules d'eau peuvent former beaucoup plus de liaisons hydrogène en-dehors de la cavité (Bergeron et Rowan, 1976 ; Duchêne, 1988).

Les phospholipases

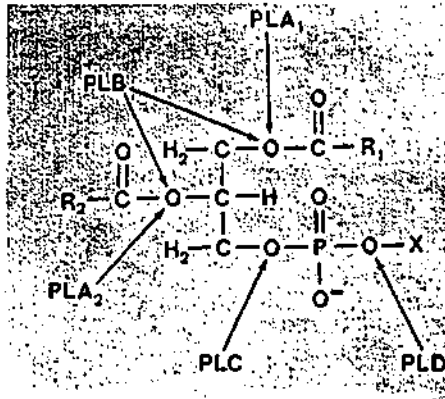
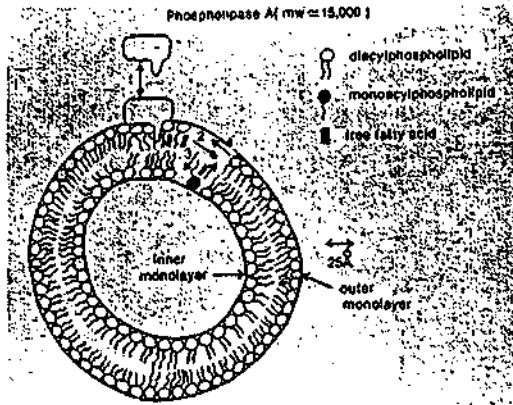
Les phospholipases représentent un groupe d'enzymes qui ont en commun leur substrat et le fait qu'elles sont toutes des estérases. De façon plus détaillée, elles forment un groupe d'enzymes variées que l'on peut classer en deux catégories larges : les acylhydrolases et les phosphodiesterases. Les phospholipases A₁, A₂, et B et les lysophospholipases font partie du premier groupe tandis que les phospholipases C et D font partie du second.

La phospholipase A₂ de pancréas de porc, que nous avons utilisée dans la première partie de notre travail, attaque la liaison ester de la chaîne d'acide gras en position 2, tandis que la phospholipase C, utilisée pour préparer le phosphatidylglycérol pour la HPLC, attaque la liaison entre le groupe phosphate et le glycérol (voir figures III.4 et III.5).

Partition dans les systèmes biphasiques aqueux

Dans le milieu des années 50, Albertsson observa que si l'on mettait en présence deux polymères immiscibles et solubles dans l'eau, par exemple le

polyéthylène glycol (PEG) et le dextrane, il y avait formation d'un système biphasique aqueux (Albertsson, 1956, 1958).



FIGS III.4 et III.5 :

Mode d'action des phospholipases [d'après Waite, M. (1987) *The phospholipases*, in: *Handbook of Lipid Research*, Plenum Press, London]. Dans la figure III.5, une flèche pointée à gauche d'un oxygène signifie que la scission a lieu entre l'oxygène et le carbone qui est placé à sa gauche et vice-versa si la flèche est pointée à droite d'un oxygène. Dans le cas de la PLA₁, la flèche devrait être orientée à droite de l'oxygène et non pas au milieu.

Ce système est assez sensible et doux pour permettre la séparation de mélanges de composés biologiques. En effet, ces systèmes présentent des propriétés protectrices contre la dénaturation des échantillons biologiques grâce, d'une part, à la basse tension interfaciale, d'autre part, à la haute teneur en eau dans les deux phases (90%) et, finalement, grâce à la nature elle-même des polymères.

Les systèmes biphasiques aqueux sont généralement faits de deux polymères hydrophiles structurellement distincts mais ils peuvent aussi être constitués d'un polymère et d'un sel. La composition et la concentration des polymères ainsi que des ions qui se trouvent dans la solution aqueuse déterminent les propriétés physiques des phases et gouvernent la séparation des échantillons.

Le système le plus utilisé pour séparer des cellules viables, des particules sub-cellulaires ou des membranes est le système PEG/Dextrane (voir figure III.6).

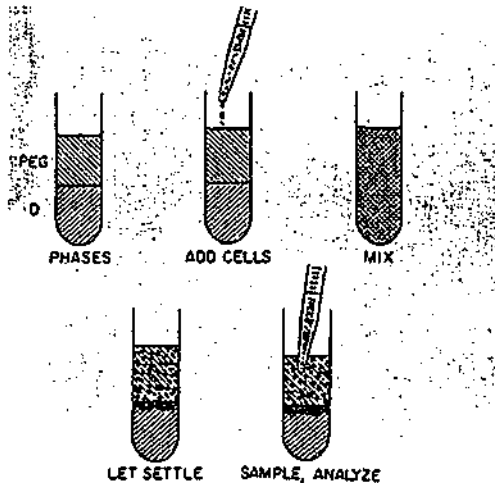


FIG. III.6 : Procédé de partition de cellules dans un système biphasique aqueux [d'après Walter, H. et Johansson, G. (1986) Partitioning in aqueous two-phase systems : an overview. *Anal. Biochem.*, 155, 215-242]
D : dextrane ; PEG : polyéthylèneglycol.

CHAPITRE IV

ETUDE DE L'ASYMETRIE TRANSVERSALE DES PHOSPHOLIPIDES ET DE LEURS FONCTIONS DANS LES MEMBRANES ET LES VESICULES « INSIDE-OUT » ET « RIGHT SIDE-OUT » ISSUES DE THYLACOIDES

BUTS

La distribution transmembranaire des phospholipides dans les thylacoïdes entiers, de même que le rôle que jouent ces lipides dans la fonction photosynthétique, ont été étudiés précédemment par le groupe de Siegenthaler (Siegenthaler et al., 1989a).

Le but de cette partie est de vérifier cette asymétrie transversale et son rôle dans la fonction photosynthétique à l'aide de vésicules subthylacoïdales. La distribution transmembranaire du monogalactosyldiacylglycérol et du digalactosyldiacylglycérol a déjà été démontrée à l'aide de vésicules inside-out issues de thylacoïdes (Siegenthaler et al., 1988). Dans ce chapitre, nous porterons donc notre attention sur la distribution du phosphatidylglycérol et sur sa fonction.

Les thylacoïdes sont fractionnés mécaniquement (presse Yeda) en deux types de vésicules : les vésicules « right side-out », issues des lamelles stromatiques et les vésicules « inside-out », issues des grana. L'intéressante inversion des vésicules granaires nous permet de vérifier que la distribution transmembranaire des phospholipides dans ces vésicules est bien l'inverse de celle déterminée dans les thylacoïdes entiers ou les vésicules stromatiques (right side-out). Si la théorie selon laquelle le flux d'électrons photosynthétique linéaire dépend de la population de phospholipides localisée dans la monocouche interne des thylacoïdes (Siegenthaler et al., 1987, 1989a) est exacte, on devrait alors constater que ce sont les phospholipides de la monocouche externe des vésicules inside-out (correspondant à la monocouche interne des thylacoïdes et vésicules stromatiques, right side-out) qui sous-tendent cette activité.

NB : Nous avons décidé d'employer les termes anglais pour désigner les vésicules orientées comme les membranes thylacoïdales (right side-out) et celles qui sont inversées (inside-out). Il nous a, en effet, semblé plus simple d'utiliser ces expressions plutôt que des périphrases en français.

RESULTATS

Caractérisation des domaines de la membrane thylacoïdale

Le tableau IV.1 présente une synthèse des analyses auxquelles sont soumises les diverses fractions de thylacoïdes. Ces valeurs permettent de caractériser les différents domaines des membranes thylacoïdales. A titre de comparaison, nous avons également inclus dans ce tableau les résultats obtenus par d'autres groupes.

- Les membranes thylacoïdales (MT) et les vésicules stromatiques (RO) ont un rapport des Chl a/b à peu près équivalent (2.6 ± 0.3 pour MT, $n=8$ et 2.4 ± 0.2 pour RO, $n=7$) tandis que ce rapport est un peu plus bas pour les vésicules granaires (IO 1.9 ± 0.2 , $n=10$). La variation du contenu en Chlb est responsable de ces différences. Il y a plus de Chlb dans les grana que dans les lamelles stromatiques. Les autres groupes (références a, b, e du tableau IV.1) ont également mis en évidence un rapport de Chl a/b plus bas dans les IO que dans les MT ou RO. Ils ont en outre constaté un rapport des Chl a/b nettement plus élevé dans les RO que dans les MT.
- Les mesures de fluorescence à basse température (77K) permettent d'estimer et de comparer les teneurs relatives des photosystèmes I et II associés à des chlorophylles dans les domaines thylacoïdaux. Le PSII fluoresce à environ 695nm, le PSI à environ 740nm. Les spectres de la figure IV.1 correspondent

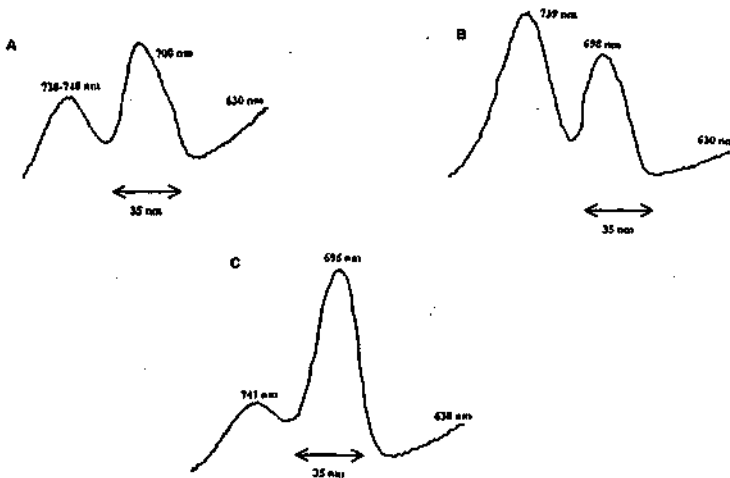


FIG. IV.1 : Spectres d'émission de fluorescence à basse température (77 K) des thylacoïdes entiers (A), des vésicules issues de lamelles stromatiques (B) et de lamelles granaires (C).

TABLEAU IV.1
Caractéristiques physiologiques des membranes et des vésicules thylacoïdales.
Comparaison avec les résultats obtenus par d'autres groupes.

Référence	Fractions*	Chl a/b (mg/mg)	Fluo. à basse T°C PSII / PSI F ₆₈₂ /F ₇₁₅ (mm/mm)	Proton pumping (nmol H ⁺ /mg Chl)	Protein (mg prot/mg Chl)	Activité PSII basale (H ₂ O à PpBO) (μ mol O ₂ /mg Chl/h)	Activité PSI découplée (Asc. à MV) (μ mol O ₂ /mg Chl/h)
		n=8	n=7	n=7	n=10	n=9	n=3
a) Akerlund et Andersson 1983, BBA, 725, 34-40	MT	3.2		-16		117	71
	RO	4.3-4.9		94		40	129
	IO	2.3		-150		167	39
b) Andersson et al., 1986 BBA, 936, 339-350	MT	3.1			5.7	135	
	RO	5			6.5	80	1127
	IO	2.3			5.5	257	604
c) Siegenthaler et al., 1988 FEBS Lett., 228, 1, 94-98	RO	2.5	0.98	109			
	IO	1.5	2.06	-138			
d) Smutny et Siegenthaler, 1980 LPV, non-publié, Université de Neuchâtel	MT	2.75		1200		130	
	RO	1					
	IO	2.1		-216		130	
e) Juhler et al., 1993 Photos. Res. 35, 171-178	MT	2.71					
	RO	4.04					
	IO	2.41					
f) Sylvie Duchêne, 1994-1995 Lab. de Physiologie vég. Université de Neuchâtel	MT	2.6	2	303	3.15	54	483
	RO	2.4	1	150	2.6	44	479
	IO	1.9	3.9	0	2.6	37	180

* MT= membranes thylacoïdales; RO= vésicules stromatiques right side-out; IO= vésicules granulaires inside-out.
n ne concerne que notre référence (f).

à une expérience typiquement représentative de l'ensemble des résultats obtenus. Nos données, résumées dans le tableau IV.1 (référence f) montrent très clairement un enrichissement de la teneur en PS II dans les vésicules granaires (IO) ($PSII/PSI=3.9\pm 0.5$ pour IO mais seulement 2 ± 0.8 ou 1 ± 0.2 pour MT et RO respectivement, $n=7$). Ces résultats mettent également en évidence un enrichissement en PSI dans les vésicules stromatiques.

- L'activité de la pompe protonique est mise en évidence par la mesure du pH dans le milieu de resuspension des thylacoïdes lors de transitions obscurité-lumière-obscurité. Sous l'effet de la lumière, et en présence des cofacteurs (dans notre cas, il s'agit du méthylphénazonium méthosulfate ou PMS) nécessaires au transport cyclique des électrons, le flux d'électrons se met en route (voir schéma en Z, figure I.5). Or, ce flux est associé à des transports de protons qui s'accumulent dans le lumen thylacoïdal. Ces protons seront ultérieurement expulsés hors du lumen via le facteur de couplage et serviront à la synthèse d'ATP.

Dans notre expérience, seule la formation du gradient transmembranaire de protons se produit. En effet, la synthèse d'ATP via l'expulsion des protons nécessite l'adjonction de phosphate inorganique et d'ADP dans le milieu expérimental.

A la lumière, les protons pénètrent dans les thylacoïdes. Par conséquent, le pH du milieu externe s'acidifie. On constate en effet une hausse du pH externe aussi bien pour les membranes thylacoïdales entières (MT) que pour les vésicules stromatiques (RO). Mais la pompe protonique est moins active dans les RO que dans les MT (voir les valeurs dans le tableau IV.1 et une expérience typique représentée dans la figure IV.2). Par contre, comme les vésicules granaires (IO) sont inversées, on devrait mesurer une acidification du milieu externe aux membranes. Ce n'est pas le cas mais on observe que

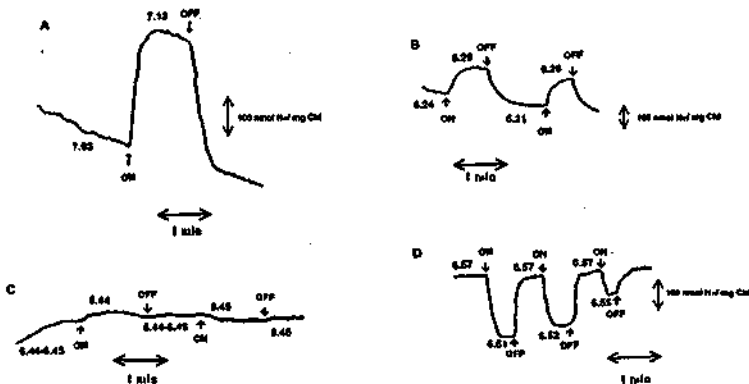


FIG. IV.2 : Translocation de protons mesurée à la lumière dans les thylacoïdes entières (A), les vésicules issues de lamelles stromatiques (B) et de lamelles granaires en 1995 (C) et 1990 (D).

l'activité protonique correspondant à une extrusion de protons est extrêmement faible pour ce type de vésicules. Le groupe d'Albertsson (référence a, tableau IV.I) enregistre une entrée de protons dans les RO et une extrusion très marquée hors des IO.

- Finalement, le tableau IV.I montre que l'activité basale du flux d'électrons à travers le photosystème II est assez faible, aussi bien pour les thylacoïdes entiers que pour les fractions vésiculaires. Le groupe d'Albertsson (réf. a, b) a enregistré, dans les vésicules stromatiques, une activité du PSII inférieure à celle des grana. En ce qui concerne le PSI, nous constatons que les vésicules granaires, moins riches en PSI que les vésicules stromatiques, présentent une activité plus faible que celle des MT et RO. Le groupe d'Albertsson observe également que l'activité PSI est supérieure dans les RO.

Il peut sembler étrange que nous ayons présenté, dans le tableau IV.I, l'activité basale pour le PSII tandis que nous parlons de l'activité découplée pour le PSI. Nous l'avons fait afin de pouvoir comparer nos résultats avec ceux des autres groupes qui ont toujours mesuré les activités susmentionnées.

Nous aimerions également souligner que nous avons enregistré très peu de différence entre l'activité basale du PSII (Tableau IV.I) et l'activité découplée (Figs. IV.5, IV.7 et IV.9). Cela pourrait signifier que les membranes et vésicules sont légèrement détériorées pendant leur préparation.

- La figure IV.3 représente un gel SDS-PAGE typique des extraits protéiniques issus des différentes fractions membranaires thylacoïdales. La région 1 est faite de 2 bandes protéiques pour les MT et les RO. La première bande correspond à un mélange des polypeptides du centre réactionnel du PSI (CPI) et de la sous-unité α de l'ATP-synthétase. La deuxième bande consiste en la sous-unité β du même complexe. Dans la fraction granaire (IO), on observe trois bandes ce qui indique que CPI et la sous-unité α de l'ATPase sont séparés, dans ce cas. Or, les polypeptides migrent d'autant mieux qu'il sont présents en faible quantité dans l'extrait. On peut donc en conclure qu'il y a moins de CPI et de sous-unité α dans la fraction granaire IO que dans les RO et MT. On observe également un enrichissement en la sous-unité β dans les RO et MT par rapport aux IO. La région 2 représente la protéine extrinsèque de 33 kD qui appartient au complexe oxydant de l'eau associé au PSII. Il semble que les IO en contiennent plus que les RO. La région 3, constituée de trois bandes, correspond aux diverses protéines de l'antenne collectrice du PSII. La première bande est beaucoup plus colorée dans la fraction granaire (IO). La région 4 représente trois protéines de l'antenne collectrice du PSI.

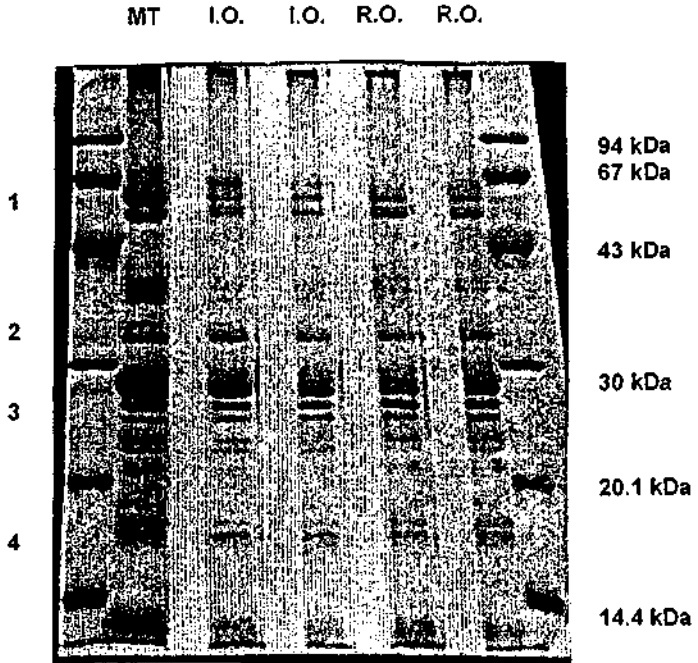


FIG. IV.3 : Profil électrophorétique (gel SDS-PAGE) des protéines thylacoïdales révélées au Bleu de Coomassie ; on a chargé 30 μg de protéines issues des membranes thylacoïdales (MT) et 15 μg de protéines issues des vésicules granaires (I.O.) et des vésicules stromatiques (R.O.)

Elles sont plus abondantes dans la fraction stromatique (RO) que dans la fraction granaire (IO).

- La figure IV.4 représente l'immunodétection du complexe d'ATPase et du LHCPH (antennes collectrices de lumière du PSII) dans les MT, RO et IO. Les deux bandes supérieures, qui représentent le complexe ATPase, sont plus marquées dans la fraction stromatique (T4) et les thylacoïdes (T) que

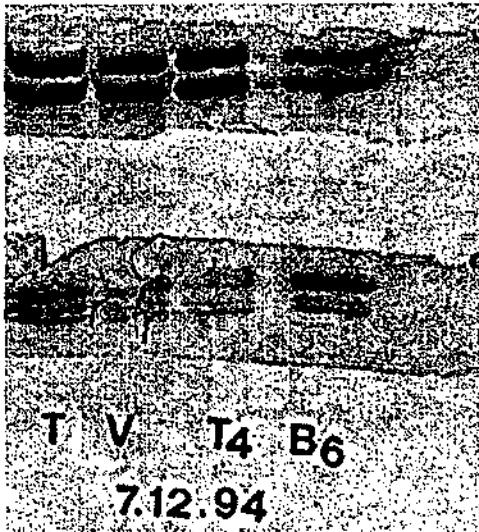


FIG. IV.4 : Immunodétection du complexe ATP-synthétase (représenté par les 2 bandes supérieures) et du LHCPH (représenté par les 2 bandes inférieures) dans les thylacoïdes entiers (T), un mélange de vésicules sub-thylacoïdales (V), les vésicules issues des lamelles stromatiques (T4) et les lamelles granaires (B6).

dans la fraction granaire (B6). Cela indique un enrichissement en ATPase dans les RO. Les deux bandes inférieures, qui représentent le LHCPH, permettent d'observer un enrichissement de ce complexe dans la fraction granaire. Cette expérience n'ayant été conduite qu'une seule fois, ces résultats sont seulement indicatifs.

Etude de la distribution transversale des phospholipides et de l'activité du flux d'électrons en fonction de la délipidation des membranes

- Afin de déterminer le rôle du phosphatidylglycérol (PG) dans les membranes thylacoïdales, nous avons décidé d'étudier le comportement du flux d'électrons linéaire à travers le PSII au cours de la déplétion en PG par une

phospholipase. Les figures IV.5, IV.7 et IV.9 représentent l'activité du flux d'électrons photosynthétique découplé à travers le PS II dans les diverses fractions membranaires. Ce flux est mesuré au cours du temps dans des membranes traitées ou non par l'enzyme phospholipase A₂ de pancréas de porc (PLA₂).

Dans les membranes thylacoïdales (Fig. IV.5), à 0°C, l'activité diminue rapidement de 15% environ pendant les 10 premières minutes d'incubation en présence de PLA₂. Puis, elle se stabilise autour de 80% du contrôle initial, même après 70 minutes d'incubation. A 20°C, l'activité chute très brusquement (baisse de 30% en 20 minutes). On observe que le flux de l'activité contrôle (sans PLA₂) est stable (100%) à 0°C et diminue progressivement de 20% lorsque les membranes sont incubées à 20°C.

Dans les vésicules issues des lamelles stromatiques (Fig. IV.7), on observe aussi, à 0°C, une diminution brutale de l'activité dans les 10 premières minutes (20% de diminution), puis un déclin progressif du flux (de 10% en 70 minutes) d'une manière parallèle à l'activité du contrôle. A 20°C, l'activité chute brusquement de 40% en 40 minutes tandis que le contrôle diminue progressivement, mais lentement (5 à 10% en 40 min.).

La figure IV.9 représente l'activité du flux d'électrons dans les vésicules issues des lamelles granaires en fonction du temps d'incubation en présence de PLA₂. Nous avons représenté les résultats obtenus lors de cette étude (1995) et ceux obtenus précédemment dans le même laboratoire (1990). L'activité (1995) ne se stabilise pas après 10-20 minutes comme dans les MT ou les RO mais décline assez rapidement à 0°C (30% de diminution). A 20°C, elle diminue de 18% en 20 minutes. L'activité contrôle reste beaucoup plus stable. Les résultats obtenus en 1990 sont bien différents. A 0°C, on assiste à une diminution drastique de l'activité (45%) durant les 20 premières minutes puis à une stabilisation. A 20°C, l'activité diminue encore lentement (20 % en 100 min.).

- L'hydrolyse du phosphatidylglycérol (PG) par la phospholipase A₂ dans les thylacoïdes et les diverses fractions membranaires est représentée dans les figures IV.6, IV.8 et IV.10. Cette déplétion a lieu en plusieurs phases: à 0°C, on observe toujours, d'abord, une attaque rapide des phospholipides par la phospholipase lors des 10 premières minutes d'incubation puis un ralentissement de l'hydrolyse jusqu'à l'obtention d'un plateau après 40-50 minutes. Ce plateau correspond à un arrêt de l'action de la lipase lorsque tous les phospholipides de la monocouche externe des membranes ont été hydrolysés. Lorsque la température d'expérimentation s'élève à 20°C, on

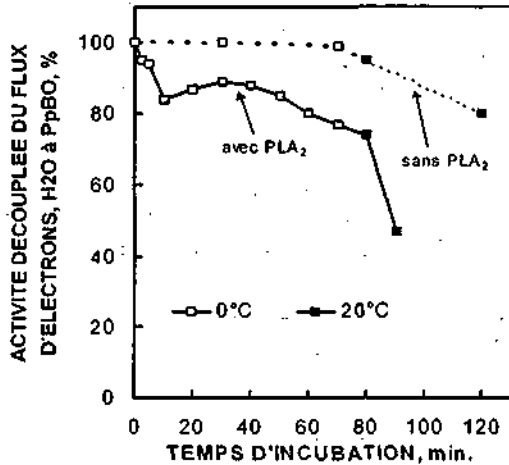


FIG. IV.5 : Photoréduction du PpBQ (à partir de l'eau comme donneur d'électrons) en fonction du temps dans les thylacoïdes (MT) incubés en présence (trait plein) ou en absence (traitillé) de phospholipase A₂ de pancréas de porc. La valeur du 100% correspond à 90 ± 9 μ moles O₂ dégagé par mg Chl par h (n=5).

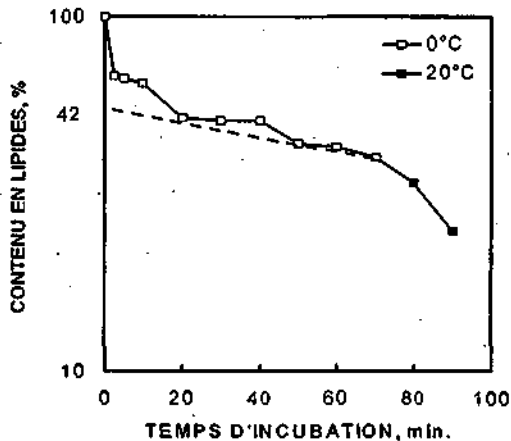


FIG. IV.6 : Hydrolyse du PG dans les thylacoïdes en fonction du temps d'incubation en présence de phospholipase A₂. Les résultats sont exprimés dans un système semi-log. La valeur du 100% est de 264 ± 15 nmoles PG par mg Chl (n=5). L'extrapolation du niveau du plateau (traitillé) jusqu'au temps zéro à 0°C indique le rapport molaire externe/interne (en %) pour PG ; ici, il se situe à 58/42.

assiste à un mouvement transmembranaire des phospholipides de la monocouche interne qui sont alors hydrolysés à leur tour par la PLA_2 (Siegenthaler et al., 1989a). Pour le PG des membranes thylacoïdales (Fig. IV.6), le plateau n'est pas très net mais nous nous sommes permis une extrapolation au temps zéro (voir les aspects théoriques dans l'article de Siegenthaler, 1982). Il se situerait donc à environ 42%, ce qui signifie que 58% des phospholipides ont été hydrolysés et enlevés de la membrane à 0°C. Ces pourcentages correspondent à la quantité de PG qui se trouve dans la monocouche externe des MT. Par conséquent, on peut en déduire que la distribution transmembranaire molaire du PG est de $58/42 \pm 3$ (externe/interne) pour les thylacoïdes.

Dans les vésicules issues des lamelles stromatiques (Fig. IV.8), la teneur en PG dans la monocouche externe est un peu plus élevée, le rapport molaire externe/interne est de $70/30 \pm 5$.

Les vésicules issues des lamelles granaires obtenues en 1995 (Fig. IV.10) ont un rapport molaire (externe/interne) presque identique à celui des MT ($59/41 \pm 5$) alors que l'on s'attendait à trouver un rapport inversé puisque l'orientation des lipides dans ces vésicules est censée être l'inverse de celle des MT ou RO. C'est bien le cas pour les résultats datant de 1990, où le rapport molaire est approximativement (nous n'avons pas véritablement de plateau) de $40/60 \pm 3$ (externe/interne).

- La figure IV.11 illustre de façon différente les résultats des figures IV.5 à IV.10. Elle permet d'observer plus aisément l'influence de la délipidation en phosphatidylglycérol sur l'activité du flux d'électrons à travers le photosystème II.

Aussi bien dans les thylacoïdes entiers (Fig. IV.11a) que dans les vésicules stromatiques (Fig. IV.11b) ou les vésicules granaires préparées en 1995 (Fig. IV.11d), nous constatons que la déplétion complète du PG de la monocouche externe (50 à 70%) n'est accompagnée que d'une baisse de 10 à 20% de l'activité du flux d'électrons. Au contraire, la déplétion du PG de la monocouche interne (10-30% ; temps d'incubation de 90 à 100 min.) entraîne un fort déclin (20 à 30%) du flux. La figure IV.11c, qui représente les vésicules granaires obtenues en 1990, présente la situation inverse. L'hydrolyse du PG de la monocouche externe provoque, cette fois, une forte baisse de l'activité du flux d'électrons (50%) tandis que la déplétion du PG de la monocouche interne n'entraîne qu'une faible baisse (10%).

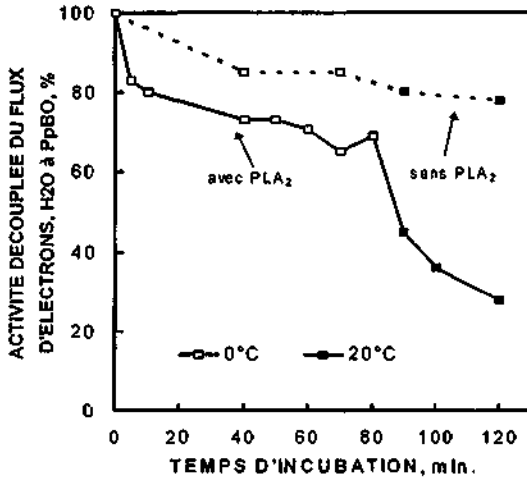


FIG. IV.7 : Photoréduction du PpBQ (à partir de l'eau comme donneur d'électrons) en fonction du temps dans les vésicules issues des lamelles stromatiques (RO) incubées en présence (trait plein) ou en absence (traitillé) de phospholipase A₂ de pancréas de porc. La valeur du 100% correspond à 39 ± 12 μ moles O₂ dégagé par mg Chl par h (n=10).

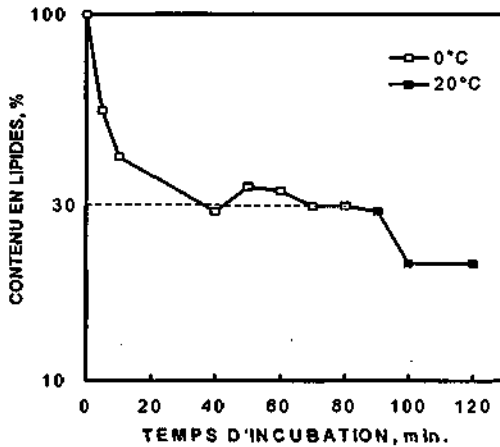


FIG. IV.8 : Hydrolyse du PG dans les vésicules issues des lamelles stromatiques en fonction du temps d'incubation en présence de phospholipase A₂. Les résultats sont exprimés dans un système semi-log. La valeur du 100% est de 274 ± 51 nmoles PG par mg Chl (n=5). L'extrapolation du niveau du plateau (traitillé) jusqu'au temps zéro à 0°C indique le rapport molaire (en %) pour PG ; Ici, il se situe à 70/30.

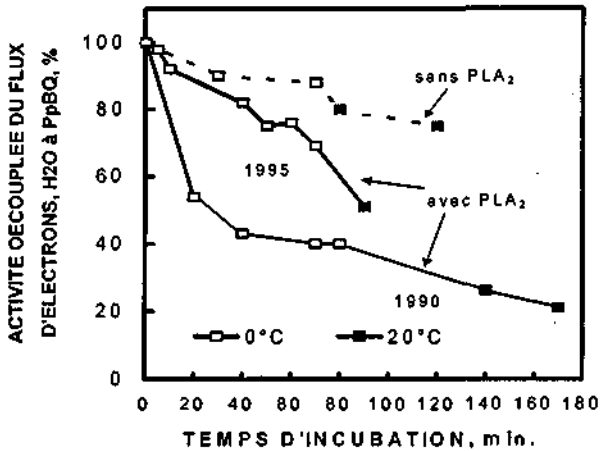


FIG. IV.9 : Photoréduction du PpBQ (à partir de l'eau comme donneur d'électrons) en fonction du temps dans les vésicules issues des lamelles granaires (IO) préparées en 1995 ou en 1990 et incubées en présence (trait plein) ou en absence (traitillé) de phospholipase A₂ de pancréas de porc. La valeur du 100% correspond à 55 ± 10 μ moles O₂ dégagé par mg Chl par h pour 1995 (n=5) et 130 μ moles O₂ dégagé par mg Chl par h pour 1990.

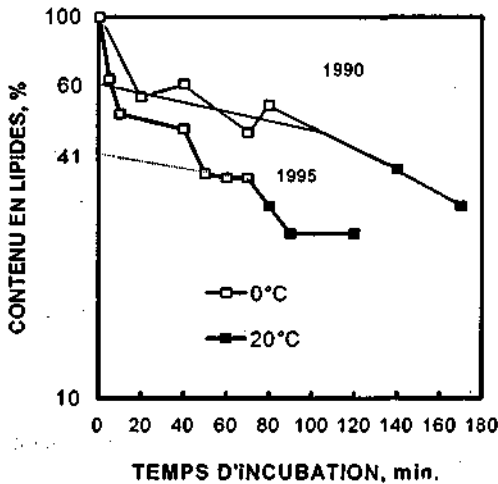


FIG. IV.10 : Hydrolyse du PG dans les vésicules issues des lamelles granaires (préparées en 1995 et 1990) en fonction du temps d'incubation en présence de phospholipase A₂. Les résultats sont exprimés dans un système semi-log. Pour 1995, la valeur du 100% est de 302 ± 58 nmoles de PG par mg Chl et, pour 1990, elle est de 100 (n=5). L'extrapolation du niveau du plateau jusqu'au temps zéro à 0°C indique le rapport molaire externe/intérieur (en %) pour PG ; ici, il se situe à 59/41 pour 1995 et 40/60 pour 1990.

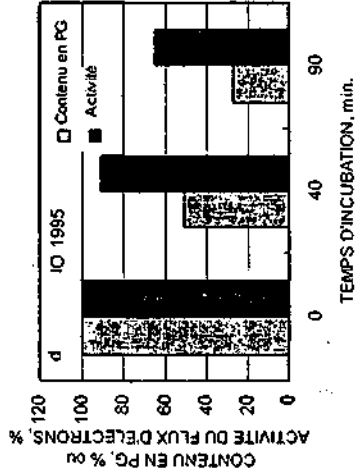
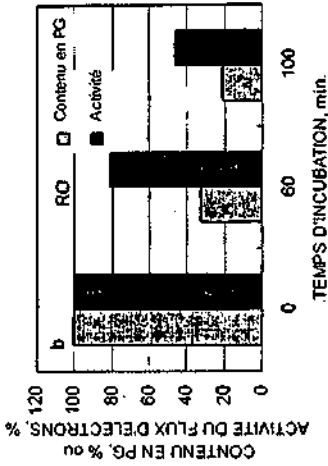
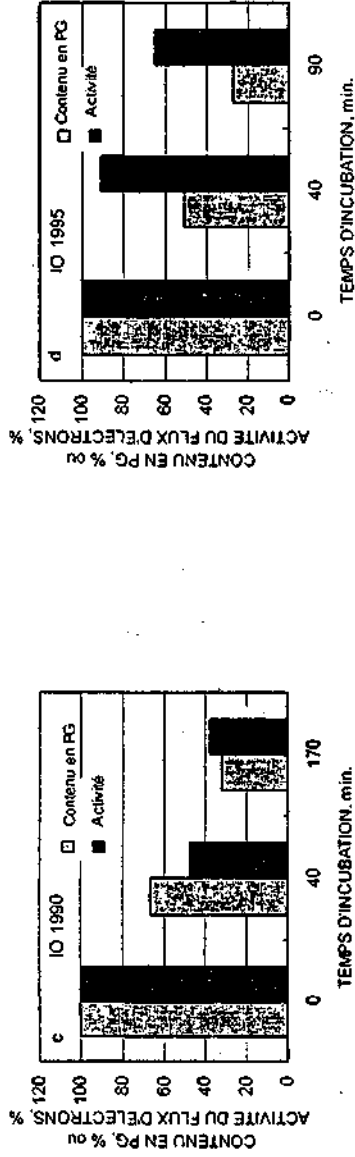
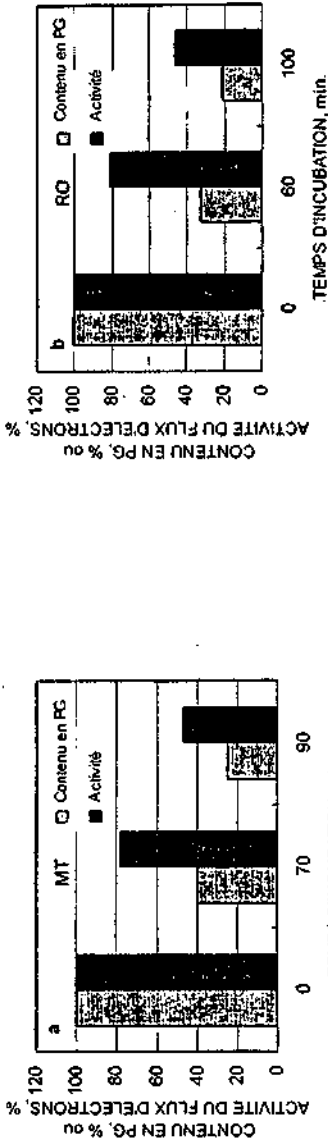


FIG. IV.11 : Dépletion du PG et activité découplée du flux d'électrons à travers le PSII en fonction du temps d'incubation en présence de PLA_2 dans les. a MT, b RO, c IO en 1990 et d IO en 1995. Les temps d'incubation de 40, 60, 70 min. correspondent à 0°C, ceux de 90, 100, 170 à 20°C.

- Dans le but d'identifier les populations de phospholipides dont dépend l'activité de flux d'électrons non-cyclique à travers le photosystème II, nous avons représenté les résultats des figures IV.5, IV.7 et IV.9 (activité au cours de l'incubation en présence de phospholipase A₂) et des figures IV.6, IV.8 et IV.10 (déplétion en phospholipides au cours de l'incubation) sur une même figure mais selon un mode d'expression différent de celui de la figure IV.11. Dans la figure IV.12, l'inhibition de l'activité photosynthétique dans les MT, les RO et les IO (obtenues en 1990) (en %) a été représentée en fonction de la déplétion en phospholipides.

Pour les membranes thylacoïdales (MT) (Fig. IV.12), nous pouvons distinguer très clairement trois populations de PG. La première est entièrement située dans la monocouche externe. Une déplétion d'environ 60 à 65% du PG conduit seulement à une inhibition de l'activité de 20%. La seconde population se situe dans la monocouche interne; elle correspond à environ 15% du PG et sa déplétion provoque une inhibition de l'activité de 40 à 50%. La troisième population correspond aux 20% du PG restant; dans nos conditions expérimentales, on ne peut pas l'hydrolyser. On distingue les mêmes populations de PG dans les vésicules issues des lamelles stromatiques (RO) que dans les thylacoïdes entiers. Finalement, la déplétion en PG de la monocouche externe des IO, qui doit correspondre à la monocouche interne des MT ou RO, entraîne une très forte inhibition de l'activité (55%) à l'inverse des résultats obtenus pour MT et RO. L'hydrolyse de la monocouche interne des IO provoque une baisse d'activité de 20%. Environ 30% du PG de ces vésicules granaires n'est pas hydrolysable.

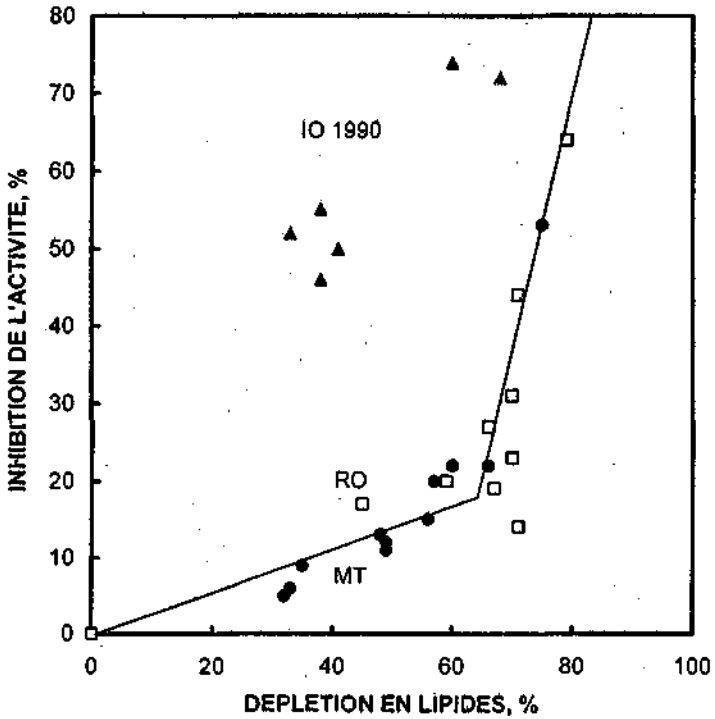


FIG. IV.12 : Inhibition de l'activité du flux d'électrons découplé à travers le PSII en fonction de la déplétion en PG dans les thylacoïdes (MT, cercles noirs), les vésicules issus des lamelles stromatiques (RO, carrés blancs) et celles issues des lamelles granaires (IO, triangles noirs) ; résultats obtenus en 1990 pour IO.

DISCUSSION

Caractérisation des domaines membranaires

Les diverses analyses effectuées sur les fractions membranaires thylacoïdales permettent de mettre en évidence les caractéristiques principales suivantes :

- Les lamelles stromatiques sont légèrement enrichies en chlorophylle a et contiennent une quantité élevée de photosystème I (Fig. IV.1, Tableau IV.I) et d'ATP-synthétase (Figs. IV.3 et IV.4). En outre, grâce aux mesures de la pompe protonique, on peut affirmer que ces vésicules sont closes et que l'orientation de leurs lipides est identique à celle des thylacoïdes entiers.

Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par l'équipe d'Albertsson, (Andreasson et al., 1988). Ce dernier a résumé dans une revue (Albertsson, 1995) l'organisation des pigments et structures protéiniques des divers domaines membranaires. Il faut noter qu'en Suède le rapport des chlorophylles a/b dans les lamelles stromatiques est nettement plus élevé que celui que nous trouvons à Neuchâtel (~5 en Suède et 2.4 en Suisse) et que, de plus, ce rapport est bien plus élevé dans les vésicules stromatiques que dans les thylacoïdes entiers alors qu'en Suisse les chiffres sont presque égaux (tableau IV.1). Nous ne nous expliquons pas pourquoi nos vésicules stromatiques sont si peu enrichies en Chl a. Nous avons suspecté que la qualité et la fraîcheur des Epinards (du marché local) étaient en cause et avons, de ce fait, cultivé des Epinards en milieu liquide (14h de Jour : 22°C, 50 % d'HR; 10h de Nuit : 18°C, 70 % d'HR). Or, nous avons constaté que, quelle que soit la provenance des Epinards (cultivés dans les phytotrons du laboratoire ou achetés sur le marché local), nous obtenons les mêmes rapports de chlorophylles a/b.

- Les lamelles granaires sont enrichies en chlorophylle b et contiennent une quantité élevée de photosystème II (Fig. IV.1, Tableau IV.I) et de LHCI (Figs. IV.3 et IV.4). Nos observations quant à l'enrichissement de la fraction granaire sont conformes aux travaux suédois (Andreasson et al., 1988; Albertsson, 1995).

Les mesures de la pompe protonique (Fig. IV.2, Tableau IV.I) nous amènent à la conclusion que ces vésicules ne sont pas closes ou qu'elles présentent une certaine porosité et qu'elles ne sont pas nécessairement dans une orientation inversée; ce qui expliquerait les résultats des analyses lipidiques suite à un traitement enzymatique. En effet, l'hydrolyse du phosphatidylglycérol (PG) par la phospholipase A₂ a permis de déterminer

que la distribution transmembranaire du PG dans ces vésicules granaires, prétendument inside-out, n'est pas l'inverse de celle des thylacoïdes. En revanche, en 1990, il a été possible d'obtenir des vésicules dans une orientation inside-out dans notre laboratoire (comme c'est le cas en Suède). L'inversion fut attestée par des mesures d'extrusion de protons. Cependant, à cette époque-là, il était impossible d'isoler des vésicules right-side-out closes. En effet, on ne pouvait mesurer aucun pompage de protons dans ces vésicules.

Il semble donc que la technique de fractionnement et d'isolement des vésicules sub-thylacoïdales sans détergents soit extrêmement délicate et ne permette pas toujours d'obtenir du matériel végétal de bonne qualité.

En résumé, en dépit de ces réserves, nous pouvons affirmer que le photosystème II est principalement localisé dans les lamelles granaires tandis que l'essentiel du photosystème I et du complexe d'ATP-synthétase est situé dans les lamelles stromatiques. D'autre part, les mesures de la pompe protonique nous permettent d'assurer que les vésicules d'origine stromatique ont une orientation right-side-out, conformément à nos espérances. Malheureusement, malgré tous nos efforts, nous ne sommes pas parvenus à obtenir, en 1995, des vésicules d'origine granaire orientées de façon inversée. Nous pensons qu'il y a peut-être un problème lors du fractionnement mécanique des thylacoïdes, ou pendant l'ultracentrifugation des vésicules ou leur resuspension. Nous avons fait part de nos difficultés au Professeur Albertsson et à son équipe (Université de Lund, Suède) puisque ce sont eux qui ont mis au point cette méthode de fractionnement et d'isolement des vésicules subthylacoïdales. Il s'avère qu'ils ne s'expliquent pas pourquoi leur méthode fonctionne parfaitement lorsque nous l'appliquons en Suède (nous avons travaillé dans leur laboratoire à trois reprises, en 1994, 1995 et 1996) mais pas lorsque nous nous trouvons à Neuchâtel.

Etude de l'asymétrie transversale des phospholipides

Aspects méthodologiques

Nombre de travaux effectués dans notre laboratoire (Siegenthaler, 1982; Siegenthaler et al., 1987; Siegenthaler, 1998) ont confirmé que l'approche enzymatique permet une détermination fiable de la distribution transmembranaire des lipides acylés dans les thylacoïdes. Quelle que soit l'origine de la lipase utilisée ou son mode d'action (par exemple l'hydrolase lipolytique issue de la Pomme-de-terre et la lipase de *Rhizopus arrhizus*), la même distribution transversale des galactolipides a été observée (Rawlyer et

Siegenthaler, 1985; Rawlyer et al., 1987; Giroud et Siegenthaler, 1988). Il en est de même pour les phospholipides (Unitt et Harwood, 1985 ; Siegenthaler et Giroud, 1986). De plus, la fiabilité de cette technique a été démontrée pour les galactolipides par l'utilisation de vésicules inversées. La distribution transmembranaire des galactolipides dans les vésicules inside-out est bien l'opposée de celle observée dans les membranes thylacoïdales (Siegenthaler et al., 1988).

L'approche enzymatique est une bonne méthode pour déterminer l'influence des diverses classes de lipides sur les fonctions membranaires thylacoïdales tel que le flux d'électrons photosynthétique (Siegenthaler et al., 1987; Siegenthaler et Rawlyer, 1986). Cependant, certaines conditions préalables doivent être remplies :

- Les produits issus de l'hydrolyse des lipides doivent être enlevés de la membrane de manière efficace et totale car ils constituent eux-mêmes de puissants inhibiteurs du flux d'électrons. L'albumine de sérum de Boeuf (BSA), ajoutée à la fraction aliquote de membranes et de lipase au moment de chaque prélèvement, joue ce rôle en se liant aux acides gras formés lors de la délipidation (Siegenthaler et al., 1987).
- La perméabilité de la membrane thylacoïdale doit demeurer inchangée au cours de la délipidation si l'on veut éviter que l'enzyme ne traverse la membrane et n'ait accès au lumen thylacoïdal. Ainsi que l'ont démontré Siegenthaler et al. (1989) par des mesures d'osmolarité, les propriétés de perméabilité de la membrane restent les mêmes tout au long de l'hydrolyse des phospholipides par la PLA₂ de pancréas de Porc à condition d'utiliser de la BSA pour enlever les produits de la délipidation. Il faut souligner que le PG ne représente qu'un faible pourcentage des lipides totaux des thylacoïdes (8 mol%). De ce fait, sa déplétion n'entraîne sans doute pas une trop grande désorganisation spatiale de la membrane thylacoïdale.

Déplétion en phospholipides dans les divers domaines membranaires et incidence sur le flux d'électrons photosynthétique

Nous avons observé que l'enlèvement des phospholipides par la PLA₂ se déroule en plusieurs phases. La plus intéressante consiste en l'obtention d'un arrêt de la délipidation (figuré par un plateau sur les graphes) à 0°C après 40 à 60 minutes d'incubation. Nous en déduisons que cet arrêt correspond au moment où la phospholipase a hydrolysé tous les phospholipides de la monocouche externe. Cependant, la phase d'arrêt n'est pas toujours très nette comme on peut le voir sur les figures IV.6 et IV.10 (MT et IO 1990). En effet,

l'hydrolyse peut, dans certains cas, continuer lentement si un léger « flip-flop » (réarrangement) des lipides membranaires se produit à 0°C. Ce phénomène serait imputable à la situation artificielle dans laquelle se trouvent les vésicules. Pour qu'une véritable délipidation de la monocouche interne ait lieu, il est nécessaire d'incuber les membranes à 20°C de sorte que les lipides se réarrangent rapidement par un mouvement transmembranaire. La lipase peut alors les hydrolyser au fur et à mesure qu'ils atteignent la monocouche externe (Siegenthaler et al., 1989). Néanmoins, il est souvent difficile, voire impossible, d'hydrolyser tous les phospholipides.

- Nous avons remarqué que la répartition des phospholipides dans les monocouches des membranes est différente selon le domaine considéré.

Ainsi, la distribution du phosphatidylglycérol entre les deux monocouches est la même dans les thylacoïdes entiers et les lamelles granaires (MT = 58/42 externe/interne, IO 1995 = 59/41 externe/interne) mais est plus élevée dans les lamelles stromatiques (RO = 70/30 externe/interne). Les vésicules granaires devraient présenter, si elles ont une orientation inside-out, une distribution lipidique inverse de celle mesurée dans les vésicules stromatiques right-side-out et les MT. Ce fut le cas des vésicules isolées en 1990 (40/60) mais pas de celles préparées en 1995. Nos vésicules granaires sont probablement légèrement poreuses ce qui expliquerait, comme nous l'avons mentionné précédemment, le non-fonctionnement de la pompe protonique. Cependant, les pores doivent être de taille inférieure à la grandeur de la molécule de PLA₂ puisque l'hydrolyse se fait bien en deux temps (stabilisation à 0°C). Les membranes passent peut-être d'une orientation inside-out à right-side-out quand elles entrent en contact avec l'enzyme qui perturberait ces vésicules fragiles et induirait leur retournement.

En 1989, Siegenthaler et al. ont déterminé un rapport molaire de 74/26 (ext./int.) pour PG dans les MT. Il est intéressant de constater que, dans leur cas, la répartition du PG s'apparente plutôt à celle observée dans nos lamelles stromatiques.

Quant aux galactolipides, leur répartition a été déterminée par la même approche enzymatique (Rawlyer et Siegenthaler, 1985) : la distribution du MGDG serait de 65/35 (ext./int.) et celle du DGDG de 15/85 dans les MT. Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation de vésicules inside-out dont le rapport molaire de MGDG et DGDG (MGDG : 42/58; DGDG : 82/18) est effectivement l'opposé de celui calculé pour les thylacoïdes (Siegenthaler et al., 1988).

Utilisant une autre technique (marquage par des galactose-oxydases), Sundby et Larsson (1985) ont également fait état d'un enrichissement en MGDG dans la monocouche externe. Ils ont également observé un enrichissement en DGDG dans cette monocouche. Or, Rawlyer et al. (1987) ont refait l'expérience en employant la même technique et ont obtenu un résultat opposé.

- Quant à l'incidence de la déplétion en PG sur l'activité de flux d'électrons, elle est illustrée par les figures IV.5, IV.7, IV.9 et IV.12. A 0°C, nous observons, pour les MT (Fig. IV.5), les RO (Fig. IV.7) et les IO de 1990 (Fig. IV.9), aussi bien un arrêt de la délipidation après 40 à 60 minutes qu'un arrêt de l'inhibition de l'activité photosynthétique. Cela signifie que les phospholipides jouent un rôle dans la régulation du flux d'électrons.

Dans les membranes thylacoïdales (Fig. IV.5), la déplétion de 58% de PG (correspondant au PG de la monocouche externe) ne conduit qu'à une baisse de l'activité de 15%. Dans les vésicules stromatiques (Fig. IV.7), on observe une inhibition de l'activité de 30% consécutivement à la déplétion de 70% du PG ; le maintien de 70% de l'activité du flux d'électrons n'est donc attribuable qu'à la population de PG de la monocouche interne qui représente seulement 30% du PG. Pour les vésicules granaires (1995) (Fig. IV.9), les résultats sont un peu moins nets, puisqu'il n'y a pas véritablement de stabilisation de l'activité à 0°C. Par contre, pour les vésicules granaires de 1990 (Fig. IV.9), qui sont closes et inversées, on observe une chute beaucoup plus brutale de l'activité (60%) lors de l'hydrolyse de la monocouche externe (correspondant à la monocouche interne des thylacoïdes et vésicules stromatiques), ce qui confirme la prépondérance de cette couche dans la régulation de l'activité photosynthétique.

Il semble que, quelque soit le type de domaine membranaire, la monocouche interne est constituée de deux populations de phospholipides, l'une hydrolysable (15%) et l'autre non (20%) qui ont beaucoup d'influence sur le flux d'électrons alors même que le PG de la monocouche interne ne représente que 2 à 3% des lipides totaux des membranes thylacoïdales. Sans doute certaines populations de phospholipides maintiennent-elles les complexes de protéines dans une conformation correcte par le biais de certaines liaisons hydrogène ou covalentes.

Nos résultats sont conformes à ceux relatés par Siegenthaler et al (1989) pour les membranes thylacoïdales d'Epinard.

CONCLUSION

La technique de fractionnement mécanique (presse Yeda) des membranes thylacoidales et la séparation des vésicules résultantes par un système biphasique aqueux s'avère efficace mais néanmoins très délicate ; d'où parfois des difficultés à obtenir des vésicules closes. Toutefois, nous avons réussi à isoler une fraction granaire et une fraction stromatique qui se distinguent par leur enrichissement en :

- l'un ou l'autre des photosystèmes
- les complexes protéïniques tels que le LHCII ou l'ATPase
- les chlorophylles a ou b.

Ainsi, les lamelles granaires sont enrichies en PSII et LHCII et les lamelles stromatiques en PSI et ATPase. Mais il ne suffit pas que ces vésicules soient clairement issues de domaines thylacoïdaux différents, deux autres conditions doivent être remplies si l'on veut déterminer la distribution transversale des lipides dans ces membranes :

- les vésicules doivent être closes de sorte que l'enzyme ne puisse atteindre que la monocouche externe.
- une des fractions doit être dans une conformation « right side-out » et l'autre doit être dans une conformation inversée, « inside-out », afin de permettre la vérification de l'asymétrie.

Nous avons obtenu des vésicules stromatiques closes et right side-out mais nous n'avons jamais réussi, lors du présent travail de thèse en Suisse (car cela ne posait pas de problèmes lorsque nous étions en stage en Suède), à isoler des vésicules granaires closes et inside-out. C'est pourquoi nous avons aussi reproduit ici les résultats obtenus par une de nos collègues (Jana Smutny) en 1990. Elle avait le problème inverse. Elle ne parvenait pas à préparer des vésicules stromatiques closes.

Ainsi, en rassemblant nos deux travaux, on en arrive à la conclusion que les grana et les lamelles stromatiques n'ont pas une distribution transversale de leurs phospholipides (PG) identique :

- $40/60 \pm 3$ (ext./int.) pour les lamelles granaires inside-out.
- $70/30 \pm 5$ (ext./int.) pour les lamelles stromatiques.

Quant à l'influence du phosphatidylglycérol sur le flux d'électrons photosynthétique, nous avons confirmé, par l'usage de vésicules inside-out (résultats de Jana Smutny), que ce sont principalement les populations de PG de la monocouche interne qui sous-tendent l'activité du flux d'électrons non-cyclique à travers le photosystème II.

CHAPITRE V

ETUDE DE LA DISTRIBUTION LATÉRALE DES LIPIDES DANS LES DIFFÉRENTS DOMAINES DE LA MEMBRANE PHOTOSYNTHÉTIQUE.

BUT

Il est bien établi que les complexes de protéines associées aux chlorophylles dans les membranes thylacoïdales sont distribués de façon hétérogène dans les domaines granaires ou stromatiques (Murphy, 1986).

Le but de ce chapitre est de déterminer si les lipides présentent, eux aussi, une hétérogénéité comparable à celle des protéines de la membrane thylacoïdale.

Dans cette optique, les thylacoïdes ont été fractionnés mécaniquement à l'aide d'ultrasons (sonication) en vésicules issues des lamelles stromatiques, du corps central des grana ou des marges des grana selon la méthode du groupe d'Albertsson (voir revue : Albertsson, 1995). La composition en lipides et acides gras des différents domaines du thylacoïde a été analysée par chromatographie en phase gazeuse.

RESULTATS

Caractérisation des domaines membranaires

Les diverses fractions thylacoïdales, comme nous les avons définies dans la figure III.1, peuvent être caractérisées par leur teneur en chlorophylles a et b (FIG. V.1), par la fluorescence relative de leurs photosystèmes (FIG. V.2) ou par leur teneur en un complexe protéinique, l'ATP-synthétase (FIG. V.3).

- L'équipe d'Albertsson, qui a étudié l'organisation des complexes protéiniques de la membrane thylacoïdale à l'aide de ces fractions subthylacoïdales, a défini quelques tests qui permettent de déterminer l'état de pureté d'une fraction (Andreasson et al., 1988 ; Wollenberger et al., 1994). La détermination de la teneur en chlorophylles a et b est le premier d'entre eux.

La figure V.1 permet de constater que les lamelles stromatiques (RO) ont un rapport des chl a/b nettement plus élevé que les autres fractions (4 ± 0.1). Les vésicules issues du corps central des grana (BS) ont le rapport le plus bas (2.1 ± 0.1). Le rapport des chlorophylles dans les membranes thylacoïdales (MT) et les marges de grana (Marg) se situe entre ces deux extrêmes (2.8 ± 0.1 pour les MT et 2.5 ± 0.2 pour les marges).

Ces résultats attestent que ces fractions sont issues de domaines thylacoïdaux différents et que les antennes collectrices du photosystème II (PSII), qui sont principalement situées dans les lamelles granaires (fractions BS et Marg),

contiennent plus de Chl b que les antennes collectrices du PSI localisées dans les lamelles stromatiques (fraction RO).

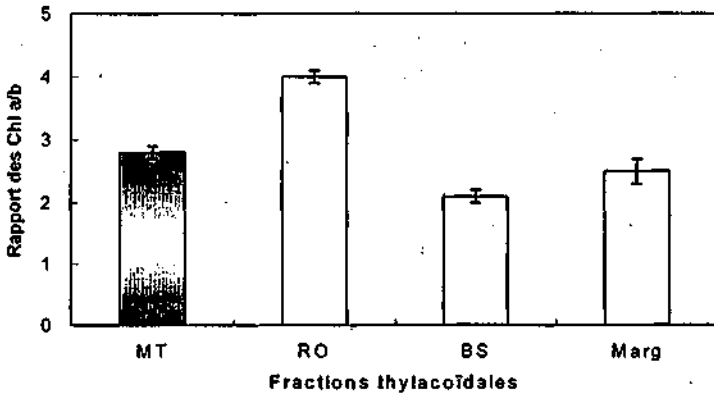


FIG. V.1 : Rapport de Chl a/b dans les membranes thylacoïdales (MT), les vésicules issues des lamelles stromatiques (RO), du corps central des grana (BS) et des marges de grana (Marg) ; n = 12 pour toutes les fractions.

- Un autre type de test consiste à mesurer la fluorescence émise à basse température (77K) par l'un ou l'autre des photosystèmes. L'examen des spectres de fluorescence permet d'estimer et de comparer les teneurs relatives en photosystèmes I et II dans les divers domaines membranaires.

Dans la figure V.2, nous avons représenté le rapport de la fluorescence à 695 et 740 nm. Nous observons que ce rapport est plus élevé dans les fractions issues du corps central des grana (BS) et des marges des grana (Marg) (respectivement 4.6 ± 1.5 et 2.4 ± 0.9) que dans les thylacoïdes non-fractionnés (MT) (1.2 ± 0.2). Le rapport de fluorescence est en revanche très bas dans les lamelles stromatiques (RO) (0.3 ± 0.1).

La fluorescence à 695 nm est émise par le photosystème II tandis que le photosystème I émet à 740 nm. Un rapport de fluorescence 695/740 supérieur à 1 signifie que la fraction testée contient plus de PSII que de PSI ; si le rapport est inférieur à 1, la teneur en PSI est plus élevée que celle en PSII. Les résultats relatés ci-dessus mettent donc clairement en évidence un enrichissement des lamelles stromatiques (RO) en PSI tandis que le corps central des grana (BS) est enrichi en PSII comme c'est le cas, dans une moindre mesure, pour les marges (Marg).

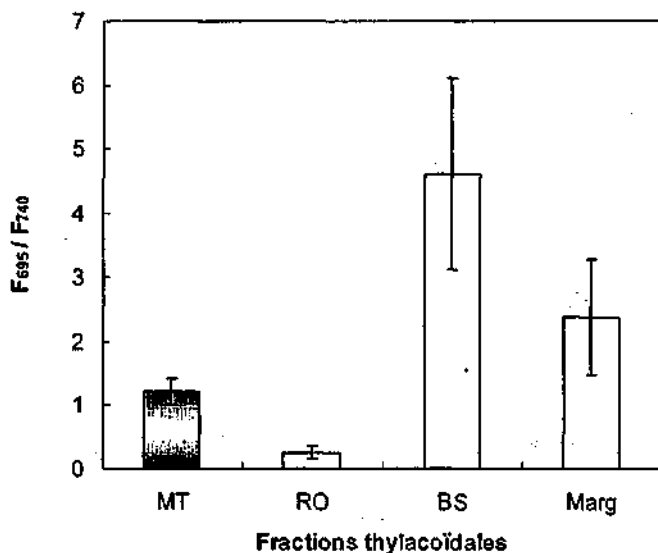


FIG. V.2.: Fluorescence des chlorophylles à basse température (77 K) dans les fractions thylacoïdales : rapport F_{695}/F_{740} (PSII/PSI) ; $n = 12$ pour les membranes thylacoïdales entières (MT) et les vésicules issues des lamelles stromatiques (RO) ; $n = 10$ pour les vésicules issues du corps central des grana (BS) ; $n = 4$ pour les vésicules issues des marges des grana (Marg). Ces différents domaines sont définis dans la figure III.1.

- Un troisième test consiste à déterminer la teneur en un complexe protéinique, l'ATP-synthétase, dans les fractions étudiées. Ce complexe est en effet principalement localisé dans les lamelles stromatiques (Wollenberger et al., 1994). La figure V.3 permet de constater que le complexe de l'ATPase se trouve localisé presque exclusivement dans les lamelles stromatiques.

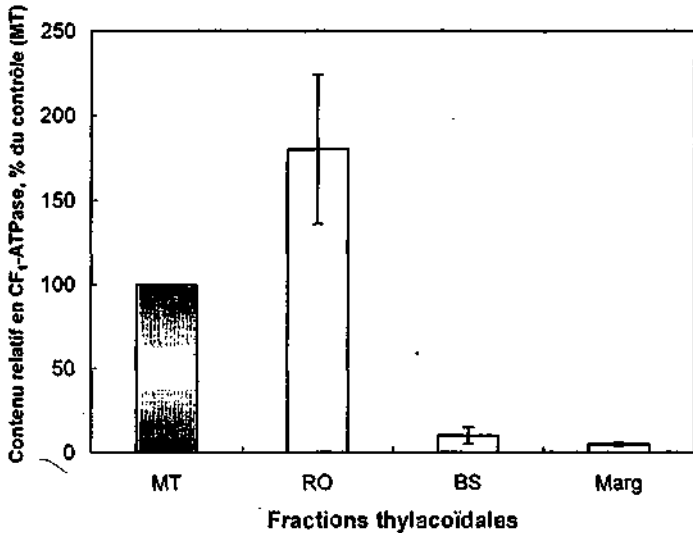


FIG. V.3 : Contenu relatif des deux sous-unités principales (α et β) du complexe CF₁-ATPase dans les fractions thylacoïdales (estimé par Bioimage, c'est-à-dire par mesure de la densité optique) ; n = 12 pour les fractions issues des thylacoïdes entiers (MT), des lamelles stromatiques (RO) et du corps central des grana (BS) ; n = 6 pour la fraction issue des marges des grana (Marg).

Etude de la distribution latérale des lipides

- Après avoir contrôlé l'origine membranaire des fractions thylacoïdales grâce aux trois tests décrits plus haut (voir figures V.1, V.2 et V.3), nous avons analysé la composition lipidique des fractions MT, RO, BS et Marg afin de déterminer s'il y avait une hétérogénéité latérale des glycérolipides dans les membranes thylacoïdales.

La figure V.4 présente la composition relative en classes de lipides des membranes thylacoïdales entières et des fractions sub-thylacoïdales. La quantité relative de chacune des classes de lipides ne varie pas de manière significative d'une fraction à l'autre.

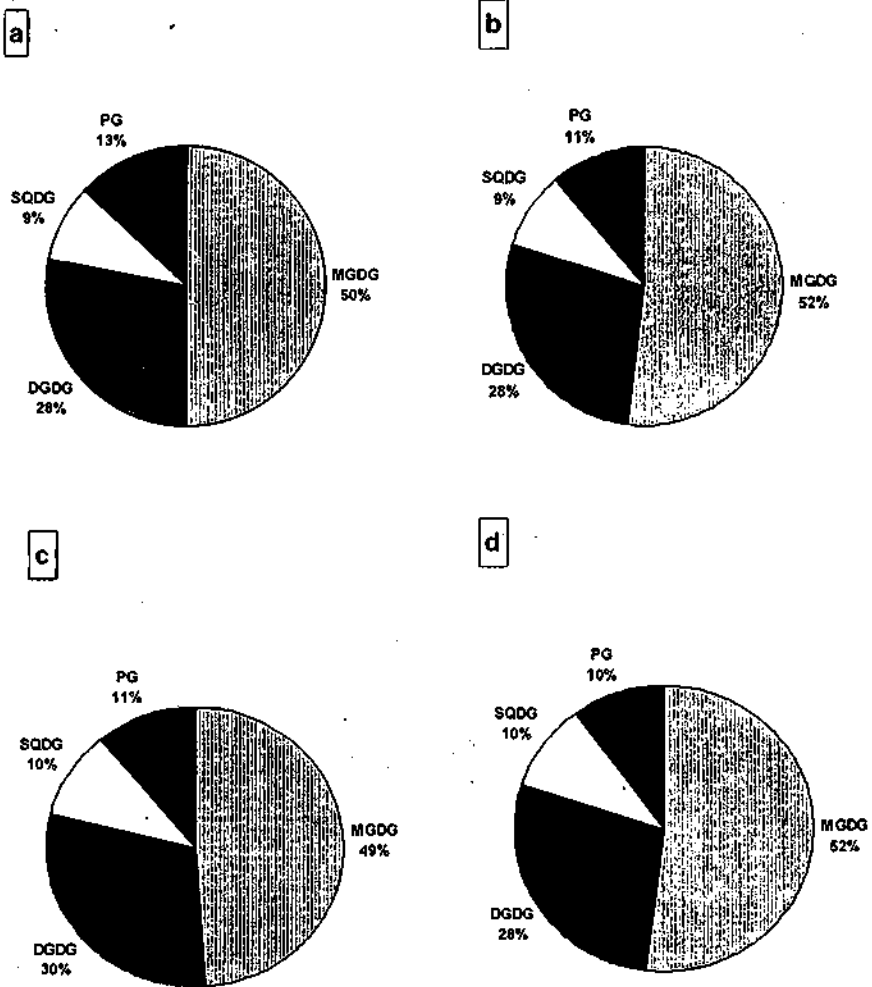
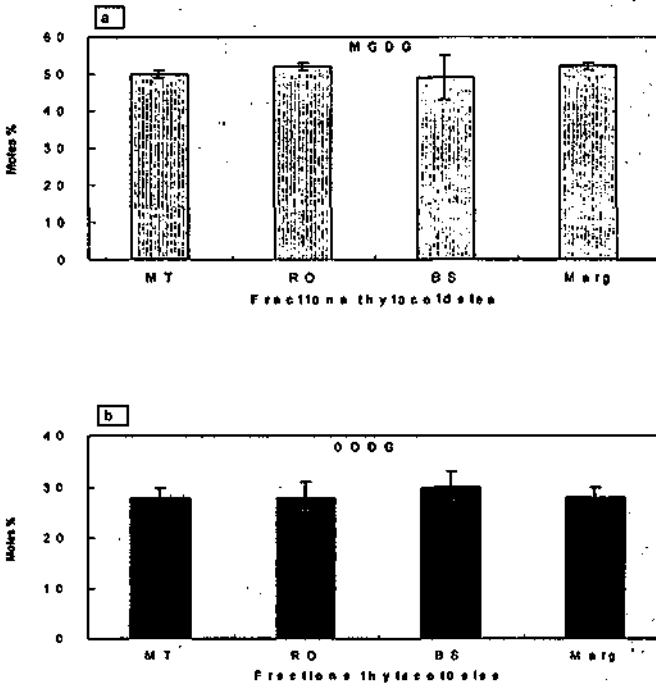


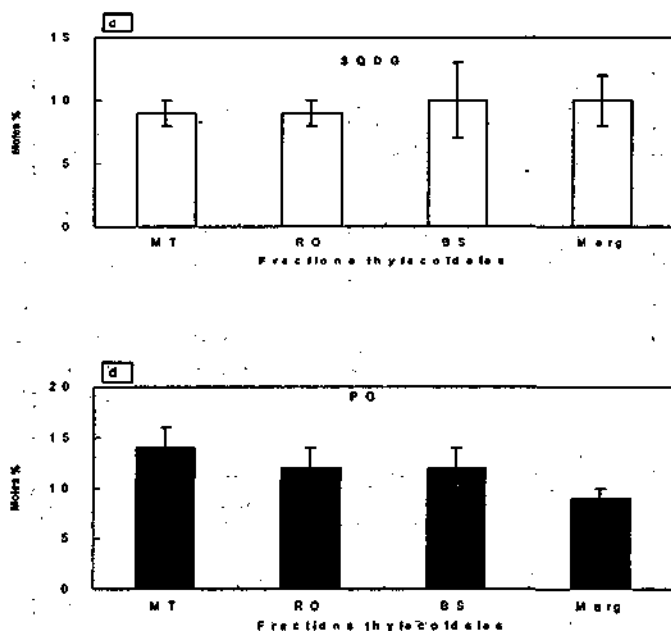
FIG. V.4 :

Composition en classes de lipides dans, (a) les membranes thylacoïdales (MT) (n=7), (b) les vésicules issues des lamelles stromatiques (RO) (n=10), (c) celles issues du corps central des grana (BS) (n=11) et (d) celles issues des marges des grana (Marg) (n=4). Les résultats sont exprimés en moles % par rapport aux lipides totaux. Les valeurs de 100% correspondent (en nmoles/mg Chl) à 1641 ± 162 pour les MT (a), 1788 ± 272 pour les RO (b), 1601 ± 151 pour les BS (c) et 1806 ± 116 pour les Marg (d). 100% correspondent, pour chaque fraction, à la somme des quatre lipides étudiés.

Les figures V.5a, b, c et d sont une représentation différente des résultats présentés dans la figure V.4. L'examen des résultats permet de constater que la teneur en galactolipides, sulfolipides et phospholipides est la même pour toutes les fractions si l'on tient compte des écarts-type. La composition relative en lipides est identique, quel que soit le domaine membranaire étudié.



FIGS V.5a et V.5b : Teneur en MGDG (a) et DGDG (b) dans les diverses fractions thylacoïdales ; n=7 pour les membranes thylacoïdales (MT), 10 pour les vésicules issues des lamelles stromatiales (RO), 11 pour les vésicules issues du corps central des grana (BS) et 4 pour les vésicules issues des marges des grana (Marg). La valeur de 100% est identique à celle donnée dans la légende de la figure V.4.



FIGS V.5c et V.5d : Teneur en SQDG (c) et PG (d) dans les diverses fractions thylacoïdales ; n=7 pour les membranes thylacoïdales (MT), 10 pour les vésicules issues des lamelles stromatiques (RO), 11 pour les vésicules issues du corps central des grana (BS) et 4 pour les vésicules issues des marges des grana (Marg). La valeur de 100% est identique à celle donnée dans la légende de la figure V.4.

- Finalement, ayant constaté que la teneur en chacun des quatre lipides thylacoïdaux étudiés ne variait pas d'un domaine membranaire à l'autre, nous avons décidé d'étudier la composition en acides gras de chaque lipide afin de déterminer s'il y avait une hétérogénéité à ce niveau-là.

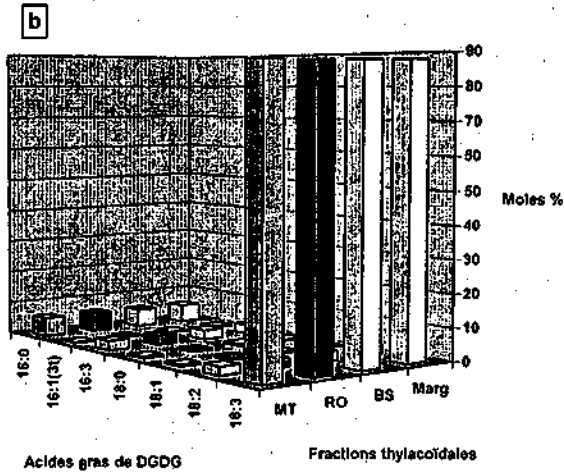
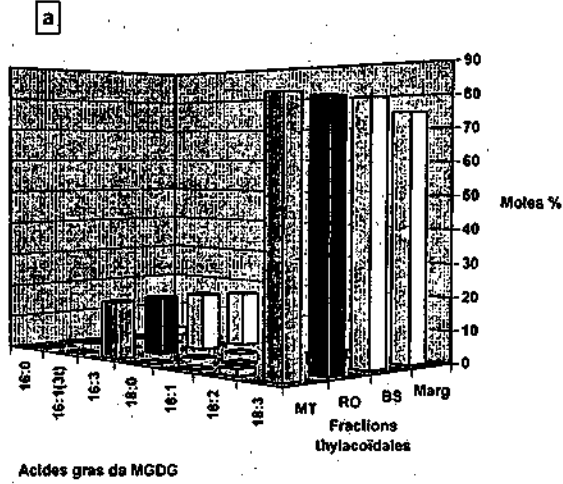
Les résultats sont présentés dans le tableau V.I. Les figures V.6 a, b, c et d expriment, sous une forme plus visuelle, les mêmes résultats que dans le tableau V.I. Force est de constater que, là aussi, si l'on tient compte des écarts-type, il n'y a aucune différence significative d'une fraction à l'autre.

TABLEAU V.J Composition en acides gras des lipides acylés dans les thylacoïdes entiers et les vésicules subthylacoïdales

Lipide acylé	Acides gras (moles %)						
	16:0	16:1(3n)	16:3	18:0	18:1	18:2	18:3
Fractions thylacoïdales							
MGDG							
MT n=7	0.7 ± 0.2	0.2 ± 0.1	17.3 ± 0.6	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.1	2.2 ± 0.4	79.1 ± 0.9
RO n=10	0.7 ± 0.3	0.2 ± 0.1	17.6 ± 0.6	0.3 ± 0.4	0.2 ± 0.1	2.3 ± 0.5	78.7 ± 0.9
BS n=11	0.7 ± 0.6	0.3 ± 0.2	17.5 ± 0.5	0.4 ± 0.7	0.1 ± 0.1	2.5 ± 0.5	78.5 ± 1.3
Marg n=4	2.5 ± 1.7	0.8 ± 0.6	16.6 ± 1.4	2.6 ± 3.1	0.1 ± 0.1	2.7 ± 0.3	74.6 ± 3.8
DG DG							
MT n=6	5.8 ± 0.6	0.2 ± 0.2	2.8 ± 0.2	0.5 ± 0.5	0.6 ± 0.6	2.5 ± 0.3	87.3 ± 1.5
RO n=10	5.8 ± 0.7	0.2 ± 0.1	2.8 ± 0.2	0.6 ± 0.7	0.7 ± 0.5	2.5 ± 0.4	87.4 ± 1.6
BS n=11	5.4 ± 1.2	0.2 ± 0.2	2.7 ± 0.2	0.7 ± 0.9	0.7 ± 0.5	2.7 ± 0.4	87.6 ± 2.1
Marg n=4	5.4 ± 1.6	0.3 ± 0.2	2.7 ± 0.1	0.4 ± 0.3	0.3 ± 0.2	2.9 ± 0.2	87.9 ± 1.9
SDG							
MT n=6	40.4 ± 1.6	0.6 ± 0.5	1.7 ± 0.3	0.7 ± 0.8	0.4 ± 0.5	8.8 ± 0.8	47.4 ± 1.8
RO n=10	41.2 ± 0.2	0.4 ± 0.5	1.5 ± 0.6	0.4 ± 0.6	0.1 ± 0.2	9 ± 1	47.3 ± 1.3
BS n=11	40.8 ± 0.9	0.7 ± 0.8	1.5 ± 0.2	1.5 ± 2.1	0.2 ± 0.4	9.3 ± 1.1	45.7 ± 2.4
Marg n=4	38.8 ± 2.9	1.7 ± 1.3	1.2 ± 0.3	3.9 ± 5.6	0.6 ± 0.9	9.9 ± 1.6	43.5 ± 6.6
PG							
MT n=8	15.9 ± 0.5	37.6 ± 1.1	0	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.2	8.4 ± 0.7	39.4 ± 0.9
RO n=11	16 ± 0.6	37.5 ± 0.9	0	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.2	8 ± 1	38.7 ± 1.2
BS n=11	15.2 ± 0.4	40 ± 1.5	0	0.4 ± 0.3	0.2 ± 0.1	6.5 ± 0.6	37.9 ± 1.3
Marg n=4	14.2 ± 2.3	39 ± 1.2	0	0.2 ± 0.2	0	7.1 ± 0.9	39.6 ± 1.3

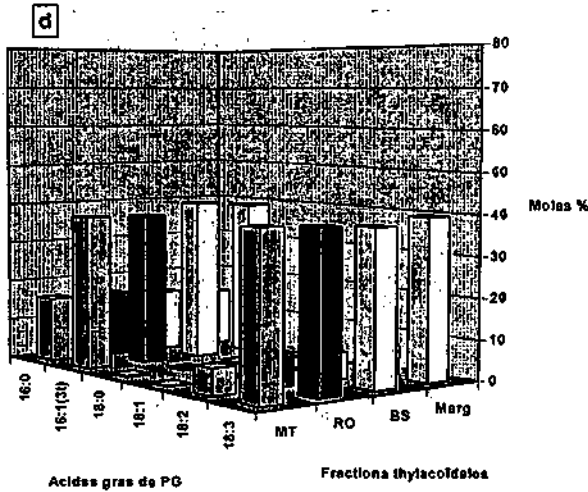
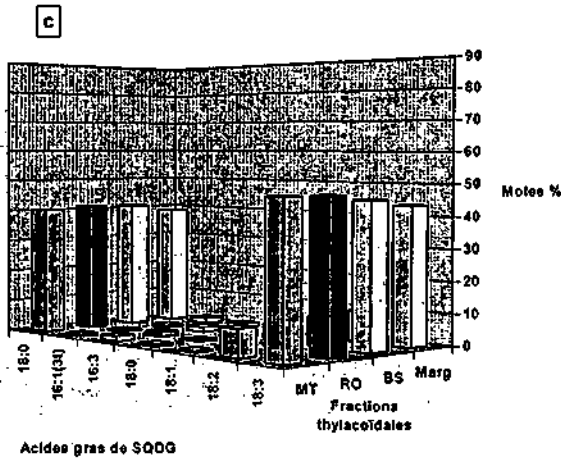
MT: membranes thylacoïdales, RO: vésicules issues des lamelles stromatiques, BS: vésicules issues du corps central des grana

Marg: vésicules issues des marges des grana. Les résultats sont exprimés en moles %, pour chaque classe de lipide. Pour MT, 100% = 825 ± 89 pour MGDG, 450 ± 57 pour DG DG, 140 ± 12 pour SDG et 214 ± 45 pour PG; pour la fraction RO, 100% =, respectivement, 924 ± 143, 501 ± 103, 159 ± 20 et 214 ± 43; pour BS, 100% = 774 ± 101, 474 ± 77, 163 ± 62 et 190 ± 43; pour les marges, 100% = 944 ± 53, 510 ± 47, 181 ± 26 et 171 ± 11.



FIGS. V.6a et b :

Composition en acides gras du MGDG (a) et du DGDG (b) dans les diverses fractions thylacoïdales. MT : membranes thylacoïdales, RO : vésicules stromatiques, BS : vésicules issues du corps central des grana, Marg : vésicules issues des marges des grana. Les valeurs de 100% sont données dans la légende du tableau V.1.



FIGS V.6c et d :

Composition en acides gras du SODG (c) et du PG (d) dans les diverses fractions thylacoïdales. MT : membranes thylacoïdales, RO : vésicules issues des lamelles stromatiques, BS : vésicules issues du corps central des grana, Marg : vésicules issues des marges des grana. Les valeurs de 100% sont données dans la légende du tableau V.I.

DISCUSSION

Caractérisation des domaines membranaires

Etant donné les problèmes rencontrés lors de la préparation des vésicules thylacoïdales dans la partie de notre thèse relatée dans le chapitre IV, nous avons décidé, pour cette partie de notre travail, de préparer toutes les fractions thylacoïdales en Suède afin d'obtenir un matériel de qualité optimale.

Les quelques analyses effectuées sur ces échantillons ont confirmé leur origine et leur pureté :

- Les lamelles stromatiques (RO) sont enrichies en chlorophylle a, en photosystème I et en ATP-synthétase conformément aux résultats obtenus par l'équipe d'Albertsson (Andreasson et al., 1988).
- Le corps central des grana (BS) contient plus de chlorophylles b que les autres domaines et est fortement enrichi en PSII. On devrait constater un enrichissement en LHCII mais les mesures de densité optique des bandes de protéines sur les gels sont sujettes à de fortes fluctuations d'un échantillon à l'autre ce qui rend difficile une conclusion claire.
- La situation des marges des grana (Marg) est intermédiaire, comme on peut s'y attendre. Elles contiennent beaucoup moins de chlorophylle a que les lamelles stromatiques mais plus que le corps central granulaire. Elles sont enrichies en PSII mais pas autant que les BS. Elles renferment très peu d'ATPase mais présentent une teneur en LHCII comparable aux autres fractions.

Mis à part l'enrichissement en LHCII qui est difficile à confirmer dans le corps central des grana, les fractions sont bien différentes les unes des autres. Elles sont facilement identifiables par un simple dosage des chlorophylles a et b ou par une mesure de la fluorescence des complexes de chlorophylles associées aux deux photosystèmes.

Etude de la distribution latérale des lipides

La distribution latérale des lipides a été étudiée par le biais de diverses méthodes : (a) l'utilisation de solvants pour une extraction douce à partir de membranes lyophilisées (Costes et al., 1972, 1978) ; (b) le fractionnement de particules subchloroplastiques enrichies en photosystème II ou en photosystème I (Eichenberger et al., 1977 ; Henry et al, 1983 ; Bednarz et al., 1988 ; Ouijja et

al., 1988) ; (c) la purification de l'un des complexes protéiniques des membranes thylacoïdales (Rawlyer et al., 1980 ; Heinz et Siefermann-Harms, 1981 ; Trémolières et al., 1981 ; Rémy et al., 1982 ; Doyle et Yu, 1985 ; Gounaris et Barber, 1985 ; Pick et al., 1985 ; Sigrist et al., 1988 ; Murata et al., 1990 ; Trémolières et al., 1994) ; (d) la détection des lipides à l'aide d'anticorps dirigés contre des lipides individuels liés à la surface de la membrane thylacoïdale, contre des particules subchloroplastiques ou contre des protéines individuelles (Radunz, 1981 ; Voss et al., 1992 ; Kruse et Schmid, 1995 ; Makewicz et al., 1995) ; (e) la séparation des régions thylacoïdales granaires et non-granaires (Tuquet et al., 1977 ; Gounaris et al., 1983 ; Henry et al., 1983 ; Murphy et Woodrow, 1983 ; Chapman et al., 1984 ; Bednarz et al., 1988). La conclusion de ces études est que les glycérolipides seraient distribués asymétriquement le long du plan latéral de la membrane thylacoïdale. Cependant, il faut relever que les approches (a) à (d) font usage de solvants ou de détergents pour isoler des particules subchloroplastiques. Or, ces produits sont susceptibles de déplacer les lipides acylés lors de l'extraction des particules. En outre, ces méthodes permettent seulement de déterminer l'organisation spatiale et la fonction des lipides que l'on appelle « stratégiques », c'est-à-dire les lipides qui sont associés aux complexes protéiniques, et non pas les « lipides structurels » (« bulk lipids » en anglais) qui constituent la majorité des glycérolipides thylacoïdaux (pour une revue plus complète sur l'hétérogénéité latérale des lipides thylacoïdaux, se référer à Siegenthaler, 1998).

Nous avons utilisé l'approche (e), c'est-à-dire celle qui fait appel à l'isolement de vésicules issues des domaines granaire ou stromatique des membranes thylacoïdales par fractionnement mécanique (presse Yeda ou ultrasons) des thylacoïdes et par séparation des vésicules dans des systèmes biphasiques aqueux. Cette méthode permet d'étudier les lipides structurels grâce à l'isolement de vésicules issues de domaines thylacoïdaux de taille importante et elle a l'avantage d'éviter l'utilisation de détergents.

Gounaris et al. (1983) et Murphy et Woodrow (1983) ont étudié l'hétérogénéité des glycérolipides des membranes thylacoïdales par cette approche et ont déclaré que les régions granaires seraient appauvries en lipides et enrichies en chlorophylles totales (70% des Chl_{tot}) par rapport aux membranes thylacoïdales entières. Cette différence au niveau des chlorophylles s'explique par le fait qu'environ 86% des complexes chlorophylle-protéines sont localisés dans les grana (Murphy et Woodrow, 1983). Cette concentration entraîne qu'il y a plus de pigments chlorophylliens dans les grana et qu'il reste peu de place pour les lipides entre les complexes. La répartition des classes de lipides dans les grana et les lamelles stromatiques est, quant à elle, sujette à controverse. Murphy et Woodrow (1983) ont mis en évidence un appauvrissement des grana en galactolipides (MGDG et DGDG) et sulfolipide (SQDG) tandis que Gounaris et al. (1983) font état d'un enrichissement en MGDG, SQDG et PG dans les lamelles granaires.

Ayant mis en évidence ces différences entre régions granaires et régions stromatiques, les auteurs cités plus haut se sont alors demandés si les lipides susmentionnés (galactolipides, sulfolipide et phospholipide) pouvaient jouer un rôle structural particulier dans les membranes thylacoïdales. Gounaris et al. (1983), qui avaient, notamment, déterminé un enrichissement en MGDG dans les grana, ont rappelé les propriétés spéciales du MGDG du point de vue géométrique. En effet, ce dernier forme des structures qui ne sont pas en bicouches puisque ce lipide a une forme cônica. Des micelles inversées pourraient se former, favorisant l'organisation des thylacoïdes en grana et la stabilisation de protéines hydrophobes telles que le complexe collecteur de lumière contenant les chlorophylles a et b (LHCII). Murphy et Woodrow (1983), qui, eux, avaient mis en évidence un appauvrissement en MGDG dans les grana, y ont vu une confirmation de l'hypothèse émise par Murphy (1982). Ce dernier pense que le MGDG pourrait fort bien, de par sa conformation cônica, contribuer à la courbure des marges de grana et de ce fait les stabiliser. Murphy a également suggéré que les marges de grana pourraient ne contenir que des lipides. Les résultats d'Andreasson et al. (1988) ainsi que les nôtres contredisent cette hypothèse. Les marges de grana contiennent des complexes protéiniques. Quant au SQDG et au PG, ils pourraient faciliter la conduction des protons le long de la surface membranaire grâce à leur groupe chargé négativement (Haines, 1983).

Notre travail infirme tous les résultats décrits précédemment. Au contraire de Tuquet et al (1977), Gounaris et al. (1983), Henry et al. (1983), Murphy et Woodrow (1983) et de Bednarz et al. (1988) nous n'avons pu mettre en évidence aucune différence dans la composition en « lipides structurels » (et en leurs acides gras) dans les divers domaines des membranes thylacoïdales. Il faut tout de même souligner que Chapman et al. (1984), qui ont utilisé la même approche, ont, eux aussi, remis en question une hétérogénéité latérale des glycérolipides structurels dans les membranes thylacoïdales. Nous appelons « lipides structurels » les glycérolipides dont la fonction est de maintenir l'imperméabilité des membranes ainsi que de réagir correctement aux facteurs extérieurs qui peuvent perturber la plante tel que le froid ou une chaleur excessive. Ces lipides contiennent des acides gras hautement insaturés qui assurent une grande fluidité aux membranes photosynthétiques (Murata et Siegenthaler, 1998).

Même s'il n'existe pas d'hétérogénéité latérale des « lipides structurels », il y a, comme les travaux faisant appel aux approches (a) à (d) l'ont démontré, de nombreuses preuves d'une localisation très spécifique de certains « lipides stratégiques » associés aux complexes protéiniques.

Ainsi, Murata et al. (1990) ont isolé trois types de préparations du photosystème II (de feuilles d'Épinard), à savoir : (a) le photosystème II complet, composé de 20 protéines différentes, (b) le corps du PSII auquel manquent certaines

protéines extrinsèques et les protéines collectrices de lumière liées aux chlorophylles a et b, (c) le centre réactionnel composé seulement des protéines D₁ et D₂, des sous-unités du cytochrome b-559 et d'une protéine hydrophobe. Cette équipe a analysé les lipides attachés à ces complexes et a déterminé le rapport lipides : protéines pour chacune des préparations. Il s'avère que, en ce qui concerne le PSII complet, la stoechiométrie est de 150 moles de lipides associés par mole de protéine. Toutes les classes de lipides des membranes thylacoïdales y sont représentées (MGDG, DGDG, SQDG et PG) dans une proportion identique à celle des membranes dans leur entier. Les acides gras sont aussi les mêmes. La stoechiométrie est de 10 :1 pour le corps du PSII et il n'y a pas de SQDG dans cette préparation. La composition lipidique est de 33% de chacune des classes de lipides (MGDG, DGDG et PG). Le degré de saturation des acides gras de MGDG et PG est plus élevé dans ce domaine du PSII. Finalement, une mole de MGDG et un dixième de mole de PG (par mole de protéine) sont associées au centre réactionnel. Ces lipides présentent également une proportion élevée d'acides gras saturés.

Usant d'une technique assez semblable à celle du groupe de Murata (faisant appel à des détergents) pour isoler divers complexes protéiniques du photosystème II, Trémolières et al. (1994), qui ont travaillé avec le Maïs, ont déterminé que le corps du PSII était significativement enrichi en MGDG. Le fractionnement de ce domaine leur a permis de découvrir que le MGDG était principalement localisé vers les complexes chlorophylles-protéines de 43 et 47 kD et qu'il contenait beaucoup d'acides gras saturés. Les complexes Chl-protéines mineurs de 24, 26 et 29 kD retiennent, quant à eux, les quatre classes de lipides que l'on trouve dans les thylacoïdes. Les acides gras des galactolipides qui bordent ces complexes sont hautement insaturés. Ce groupe a aussi démontré que le phosphatidylglycérol est fortement lié à l'antenne collectrice de lumière (LHCII).

D'autres complexes protéiniques des membranes photosynthétiques ont été étudiés. Pick et al. (1985) ont découvert que le SQDG et le DGDG sont associés à l'ATP-synthétase. Selon Doyle et Yu (1985), du PG serait associé au complexe cytochrome b₆/f.

En conclusion, à l'issue de cette étude, il semble démontré que les « lipides structurels » (« bulk lipids ») sont répartis uniformément dans les divers domaines des membranes thylacoïdales contrairement à ce que la plupart des auteurs affirment. La théorie selon laquelle les marges des grana devraient contenir plus de monogalactosyldiacylglycérol que les autres fractions, la conformation de ce lipide pouvant convenir à la courbure des marges, n'est pas étayée par nos résultats.

CHAPITRE VI

FONCTIONS DES GALACTOLIPIDES, SULFOLIPIDES ET PHOSPHOLIPIDES DANS LES MEMBRANES THYLACOÏDALES : INVESTIGATIONS A L'AIDE DES CYCLODEXTRINES

BUTS

Le but premier de cette partie de thèse est de découvrir le rôle que jouent les sulfolipides (SQDG) dans la fonction des membranes thylacoïdales. En effet, à ce jour, nous avons quelques éléments de réponse en ce qui concerne les phospholipides (voir chapitre IV et Siegenthaler et al., 1989) et les galactolipides (Rawlyer et Siegenthaler, 1985 ; Siegenthaler et al., 1988) ; leurs fonctions dans les membranes ont été étudiées notamment grâce à l'emploi d'enzymes qui s'attaquent spécifiquement aux phospholipides, comme la phospholipase A₂ ou aux galactolipides, comme la lipase de *Rhizopus arrhizus*. Or, à ce jour, aucune sulfolipase n'a encore été découverte. Il existe évidemment d'autres techniques qui permettent d'enlever certains lipides des membranes thylacoïdales et de mesurer les conséquences d'une délipidation sur les fonctions photosynthétiques (Siegenthaler et Trémolières, 1998). Krupa et Baszynski (1975), ainsi que Costes et al. (1978), ont utilisé des solvants pour extraire les lipides de membranes qui avaient été préalablement lyophilisées ; cependant, cette technique a le désavantage de ne solubiliser que des lipides très peu polaires puisque les solvants employés sont, eux aussi, peu polaires. D'autres équipes (par exemple, Eichenberger et al., 1977 ; Eckert et al., 1987 ; Siefertmann-Harms et al., 1987 ; Murata et al., 1990) ont utilisé des détergents pour solubiliser les lipides membranaires puis ont reconstitué les membranes à l'aide de lipides synthétiques ou d'une sélection de lipides natifs. Cependant, les détergents ont le désavantage de dissoudre non seulement les lipides mais aussi les protéines et pigments des membranes. Chacune des techniques susmentionnées présente des avantages et des inconvénients (pour une revue, se référer à Siegenthaler, 1998 et à Siegenthaler et Trémolières, 1998) ; c'est pourquoi Rawlyer et Siegenthaler (1996) ont cherché une nouvelle méthode et ont pensé aux cyclodextrines, des composés utilisés en pharmacologie et chromatographie. Ces molécules sont des oligosaccharides cycliques et forment un anneau dont la cavité est hydrophobe. Elles ont la propriété de former des complexes d'inclusion avec des molécules solubles dans l'eau. Il a été démontré (voir par exemple Okada et al., 1989) qu'elles peuvent même complexer une grande variété de lipides, tels que le cholestérol ou les glycérolipides. C'est ainsi que notre équipe a eu l'idée d'employer les cyclodextrines pour délipider les membranes thylacoïdales.

Dans cette partie de notre travail, nous allons tester des cyclodextrines dans le but de trouver un dérivé qui serait capable de complexer spécifiquement les sulfolipides. Cela nous permettrait d'étudier l'influence de la complexation du SQDG sur quelques paramètres photosynthétiques tels que le flux d'électrons non-cyclique dans les membranes thylacoïdales et la fluorescence des chlorophylles. Nous continuerons aussi l'étude des fonctions des phospholipides et des galactolipides à l'aide de cyclodextrines qui ont la capacité de complexer ces lipides.

RESULTATS

Comparaison de la capacité de délipidation des membranes thylacoïdales par diverses cyclodextrines

- Le tableau VI.I présente une synthèse des expériences de délipidation par diverses cyclodextrines, expériences menées par Rawyler et Siegenthaler (1996) (partie supérieure du tableau) ou par nous-même (partie inférieure du tableau) :
 - On constate qu'un grand nombre de cyclodextrines sont incapables à fixer les lipides de la membrane thylacoïdale ; c'est le cas de la β -CD perméthylée ainsi que des β -CD carboxylée, quaternaire, amphotère, sulfatée et hydroxypropylée.
 - La γ -CD n'agit que très peu sur les galactolipides et le phospholipide (5-10%) tandis qu'elle permet la délipidation de 20 % du sulfolipide.
 - La β -CD diméthylée a deux fois plus d'effet sur les sulfo- et phospholipides (40%) que sur les galactolipides (20-25 %).
 - L' α -CD a une nette préférence pour les sulfo- et phospholipides (40 %) ; elle ne permet, à une concentration de 5 mM, d'extraire que 5-10 % des galactolipides.
 - A une concentration de 5 mM, la β -CD enlève pratiquement la même quantité de chacun des quatre lipides des thylacoïdes (MGDG, DGDG, SQDG et PG), à savoir environ 8-15 %.
 - Les effets de l' α - et de la β -CD s'additionnent lorsqu'on les utilise simultanément. Ainsi, on obtient une délipidation d'environ 30 % du MGDG et du DGDG et d'environ 60 % du SQDG et du PG.
 - Enfin, l'utilisation de l' α -CD perméthylée permet une délipidation de 15 % des galactolipides et environ 60 % du SQDG et du PG.
- La figure VI.1 permet de visualiser l'effet d'une des cyclodextrines présentée dans le tableau, en l'occurrence de la γ -CD.
 - On observe que, quelle que soit la concentration de γ -CD utilisée, le contenu en galactolipides varie très peu (au maximum 5 %).

TABLEAU VI.1 : Comparaison de la capacité de délipidation des thylacoïdes per diverses cyclodextrines dans les mêmes conditions.

Cyclodextrine ¹ utilisée	Lipides enlevés (mol %)				n =
	MGDG	DGDG	SQDG	PG	
A) Résultats obtenus par Rawlyer et Slegenthaler (1996) BBA 1278, 89-97					
α-	5.4 ± 4.8	5.4 ± 2.7	42.4 ± 2.1	39.1 ± 7.4	4
β-	13.9 ± 2.4	14.5 ± 3.0	8.1 ± 3.5	12.5 ± 2.6	4
β-DM 2, 6	28.1 ± 3.5	17.8 ± 2.1	43.7 ± 6.4	38.3 ± 2.8	4
β-HP	tr	tr	tr	tr	1
α + β	27.7 ± 5.0	27.0 ± 5.5	60.0 ± 8.4	54.4 ± 5.9	6
B) Nos résultats					
α-PM	12 ± 4	15 ± 2	64 ± 5	54 ± 5	6
β-PM	tr	tr	tr	tr	1
β-PAc	insoluble				
β-Carb	tr	tr	tr	tr	1
β-Quat	tr	tr	tr	tr	1
β-Amph	tr	tr	tr	tr	1
β-Sulf	tr	tr	tr	tr	1
γ-	5 ± 3	tr	22 ± 7	8 ± 8	3

¹ les échantillons (75µg Chl/ml) ont été incubés en présence de 5mM CD pendant 20-30 min. à 0°C

Abréviations : DM = diméthylée ; PM = perméthylée ; HP = hydroxypropylée ; PAc = peracétylée ; Carb = carboxylée ; Quat = quaternaire ; Amph = amphotère ; Sulf = sulfatée ; tr = traces = moins de 1%

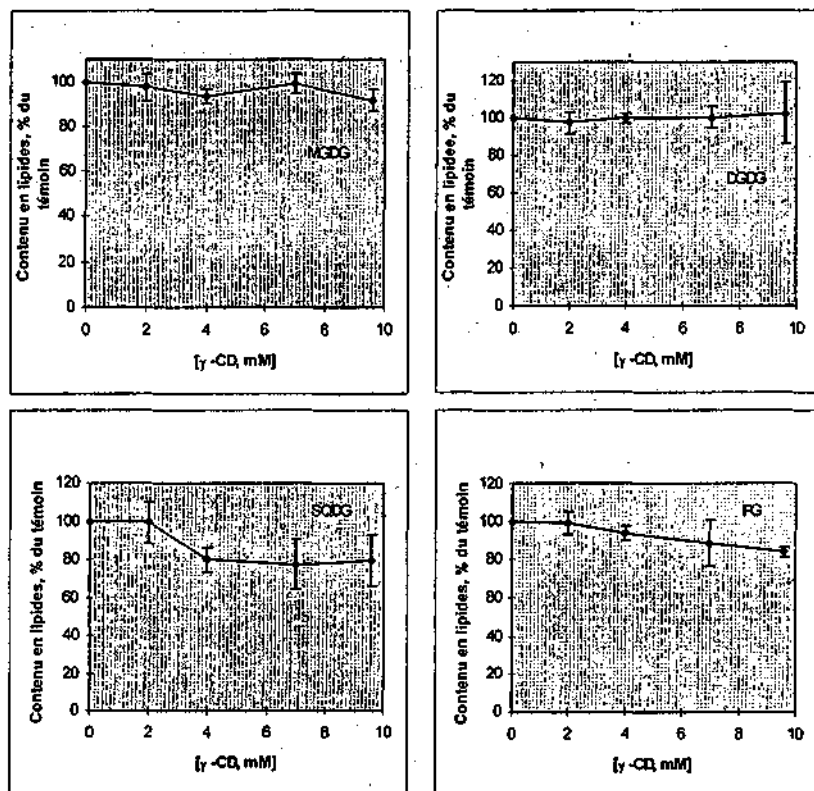


FIG. VI.1 : Effet de la γ -cyclodextrine sur le contenu en lipides des membranes thylacoïdales ($n = 3$) ; les valeurs des témoins (en nmoles/mg Chl) sont de 1350 pour MGDG, 680 pour DGDG, 112 pour SDDG et 230 pour PG. Les échantillons ($75 \mu\text{gChl/ml}$) sont incubés en présence de cyclodextrine pendant 20 min. à 4°C .

- Par contre, une concentration de γ -CD supérieure à 2 mM permet de réduire le contenu en SDDG de 20 %. Puis l'on obtient un plateau correspondant à 80 % du contenu initial en sulfolipide bien que l'on augmente la concentration de cyclodextrine.
- Quant au PG, sa délipidation se fait lentement (le contenu diminue d'environ 15 %) à mesure que la concentration de γ -CD augmente.

- Nous avons choisi d'utiliser l' α -CD perméthylée pour étudier les fonctions des lipides thylacoïdaux. Les conditions d'incubation ont été choisies en fonction des tests effectués par Rawyler et Siegenthaler (1996). Les échantillons (75 μ g Chl/ml) ont toujours été incubés pendant 20 minutes dans de la glace (0°C) en présence de CD. La figure VI.2 représente l'extraction des lipides totaux de la membrane thylacoïdale par cette cyclodextrine dérivée. La délipidation se fait régulièrement à mesure que la concentration de CD augmente et l'on constate qu'un traitement par 9.6 mM de CD conduit à la formation d'un complexe de plus de 50% des lipides totaux.

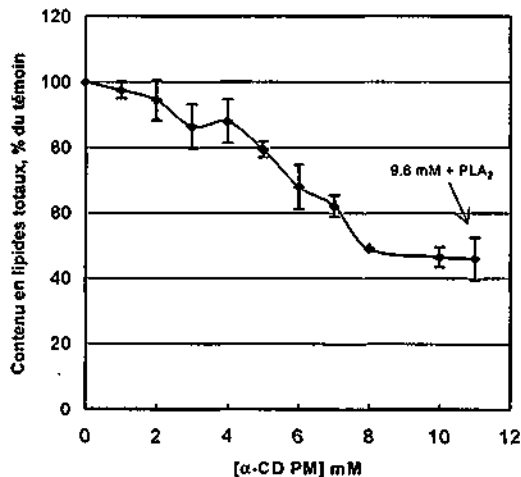


FIG. VI.2 : Délipidation des lipides totaux de la membrane thylacoïdale par l' α - cyclodextrine perméthylée. La délipidation est exprimée en % par rapport au contenu des lipides totaux du contrôle sans CD (2600 \pm 100 nmoles par mg Chl), n = 6; le dernier point représente un traitement de 20 min. à 0°C par 9.6 mM α -CD PM puis une incubation de 40 min. à 20°C en présence de phospholipase A₂ (4 unités par mg Chl).

- La figure VI.3 représente l'influence d'une concentration croissante d' α - CD perméthylée sur le contenu des quatre lipides étudiés dans les membranes thylacoïdales (MGDG, DGDG, SQDG et PG) :
- L'effet de cette cyclodextrine sur les deux galactolipides, MGDG et DGDG, est identique. Ainsi, jusqu'à une concentration de 5 mM, la CD ne modifie pas le contenu de ces lipides. Au-delà de cette molarité, une délipidation progressive a lieu jusqu'à l'obtention d'un plateau correspondant à 50 % de galactolipides restants.

- Quant à SQDG et PG, l'effet de la CD est beaucoup plus immédiat sur eux. Une concentration de 1.5 mM de CD suffit déjà à enlever 20 % de ces deux classes de lipides. Jusqu'à 4 mM de CD, la délipidation est rapide et correspond, à ce stade, à 55 % de SQDG et PG enlevés. De 4 à 9.6 mM de CD, le contenu en SQDG diminue progressivement jusqu'à 15 % et celui en PG jusqu'à 30 %.

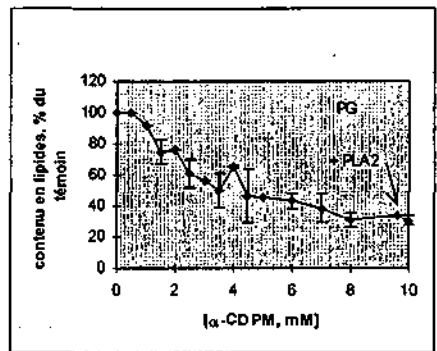
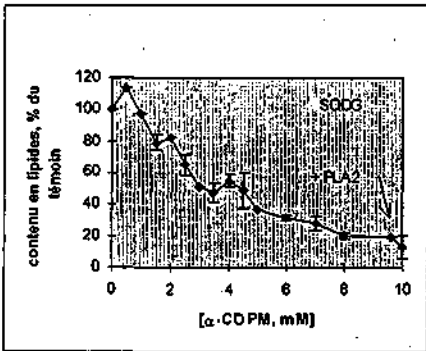
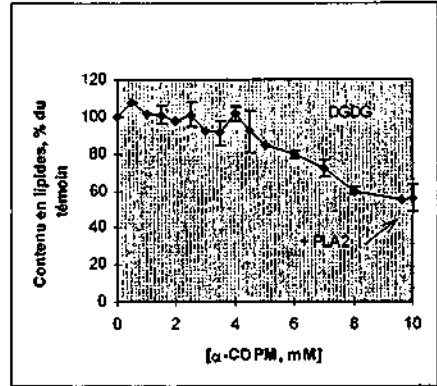
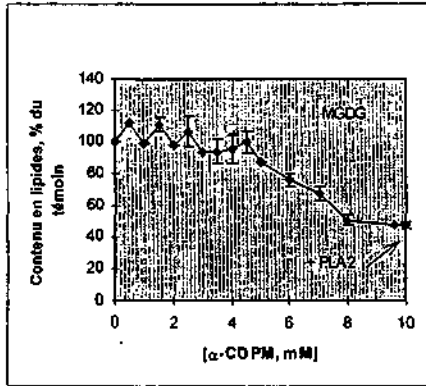


FIG. VI.3 : Effet de l' α -cyclodextrine perméthylée sur le contenu en lipides des membranes thylacoïdales ($n = 9$) ; les valeurs des témoins (en nmol/mg Chl) sont de 1400 pour MGDG, 707 pour DGDG, 165 pour SQDG et 227 pour PG ; tous les échantillons (75 μ g Chl/ml) sont incubés 20 min. à 0°C en présence de CD ; le dernier point de chaque graphe représente un traitement de 20 min. à 0°C par 9.6 mM α -CD PM puis une incubation de 40 min. à 20°C en présence de phospholipase A₂ (4 unités par mg Chl). La phospholipase A₂ hydrolyse le PG. Dans les conditions décrites ci-dessus, elle a accès au PG de la monocouche interne (pour plus de détails, se référer au chapitre IV).

Influence d'une incubation en présence d' α -cyclodextrine perméthylée sur la composition en acides gras des galactolipides, du sulfolipide et du phosphatidylglycérol de la membrane thylacoïdale

Nous avons d'abord étudié la capacité de l' α -CD PM à former des complexes avec les lipides thylacoïdaux puis nous avons cherché à savoir si cette CD avait une préférence pour certains acides gras (en fonction de leur degré de saturation ou de la longueur de leur chaîne carbonée par exemple).

La figure VI.4 permet de déterminer si, au cours de l'incubation des membranes thylacoïdales en présence de concentrations croissantes de CD, la composition en acides gras de chacun des lipides est modifiée :

- On constate, dans la figure VI.4a, que, quelle que soit la concentration de CD utilisée, et bien que le contenu en MGDG diminue au cours de l'incubation (se référer à la figure VI.3), la composition en acides gras est toujours la même, à savoir environ 75 % de C18:3 et 25 % de C16:3.

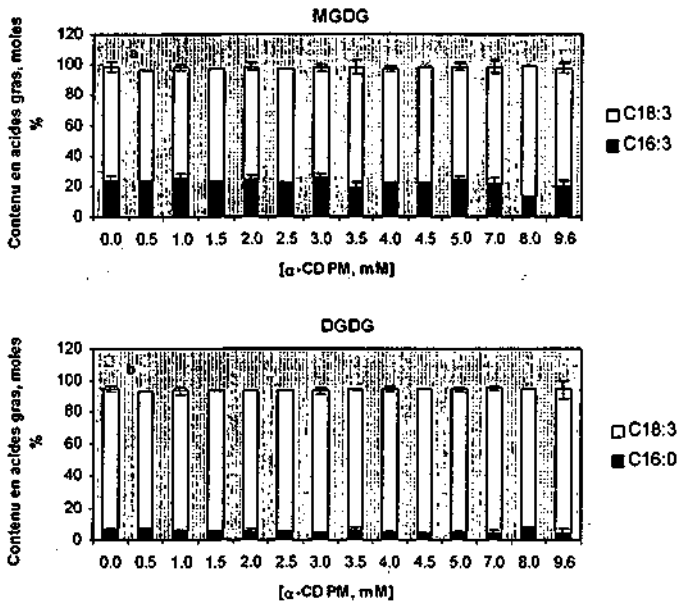


FIG. VI.4a et b : Influence de la concentration en α -cyclodextrine PM sur le contenu en acides gras (seuls les acides gras les plus abondants ont été représentés sur cette figure) dans, a) MGDG et b) DGOG ($n = 4$ à 11 , selon les échantillons ; $n = 1$ lorsque l'écart-type n'est pas représenté). 100% correspondent à 1400 nmoles de lipides/mg Chl pour MGDG et 707 pour DGOG.

- La composition en acides gras du DGDG (figure VI.4b) n'est, elle non plus, pas modifiée par la CD. On observe environ 90-95 % de C18 :3 et 5-10 % de C16 :0.
- Bien qu'à première vue (figure VI.4c) il semble que la composition en acides gras du SQDG restant dans la membrane fluctue en présence de cyclodextrine, on se rend compte, si l'on tient compte des écart-types, qu'en fait elle ne varie pas suite à l'application d' α -CD perméthylée. On observe environ 45 % de C16 :0, 40 à 45 % de C18 :3 et 5 % de C18 :2.
- Finalement, la composition en acides gras du PG (figure VI.4d) n'est pas altérée par la CD et consiste en environ 35 à 40 % de C16 :1(3t), 40 % de C18 :3, 15% de C16 :0 et 2-3 % de C18 :2.

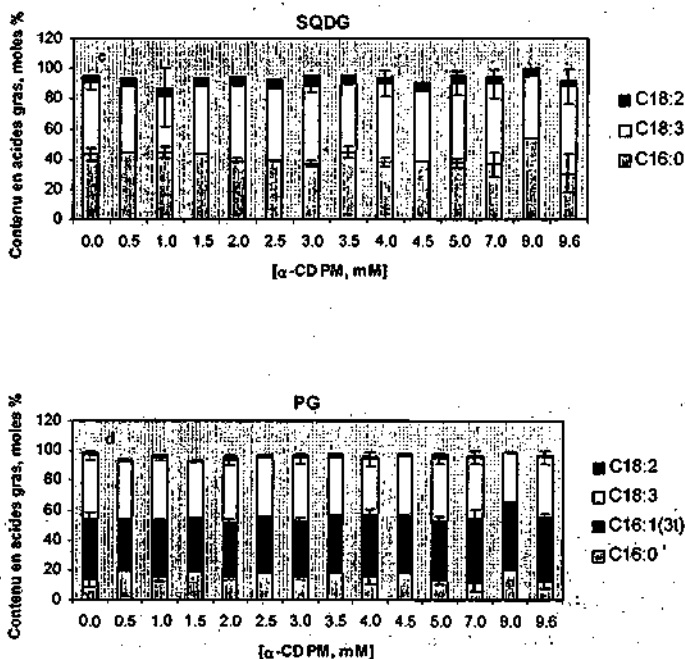


FIG. VI.4c et d : Influence de la concentration en α -cyclodextrine perméthylée sur le contenu en acides gras (seuls les acides gras les plus abondants ont été représentés sur cette figure) dans, c) SQDG et d) PG ($n = 4$ à 11, selon les échantillons ; $n = 1$ lorsque l'écart-type n'est pas représenté). 100% correspondent à 165 nmoles de lipides/mg Chl pour SQDG et 227 pour PG.

Influence d'une incubation en présence d' α -cyclodextrine perméthylée sur la composition en espèces moléculaires du phosphatidylglycérol de la membrane thylacoïdale

Après avoir étudié dans quelle mesure la composition en acides gras pouvait être modifiée par une incubation en présence d' α -CD perméthylée, nous avons choisi de déterminer si la CD dérivée complexait préférentiellement une des espèces moléculaires de PG.

- La figure VI.5 représente la délipidation du PG par l' α -cyclodextrine perméthylée. Or, cette fois, elle a été suivie par HPLC (pour la technique, voir Xu et Siegenthaler, 1996) au lieu de GC. De même que dans la figure VI.3 (dosage par GC), on observe, à partir d'une concentration en CD de 2 mM et jusqu'à 7 mM, une forte baisse du contenu en PG jusqu'à l'obtention d'un plateau qui se situe à environ 30 % de son contenu initial.

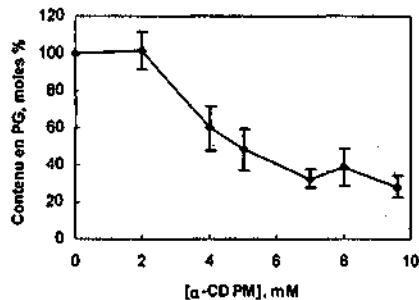


FIG. VI.5 : Contenu en PG dosé par HPLC ; 100 % correspondent à 262 nmoles/mg Chl ; n = 5

- La figure VI.6 représente l'influence de l' α -cyclodextrine perméthylée sur la composition en espèces moléculaires du PG. Si l'on tient compte des écarts-type, on peut dire que la cyclodextrine n'a pas de préférence pour une espèce moléculaire. Même si le contenu en PG diminue au fil de l'incubation, la composition en espèces moléculaires reste inchangée.

Intégrité de la membrane thylacoïdale au cours de la délipidation par l' α -cyclodextrine perméthylée

Avant d'étudier l'influence d'une délipidation par l' α -CD perméthylée sur le flux d'électrons et la fluorescence des chlorophylles, il était important de

déterminer dans quel état se trouvait la membrane thylacoïdale au cours de la déplétion en lipides. En effet, nous voulions savoir quel était le seuil de délipida-

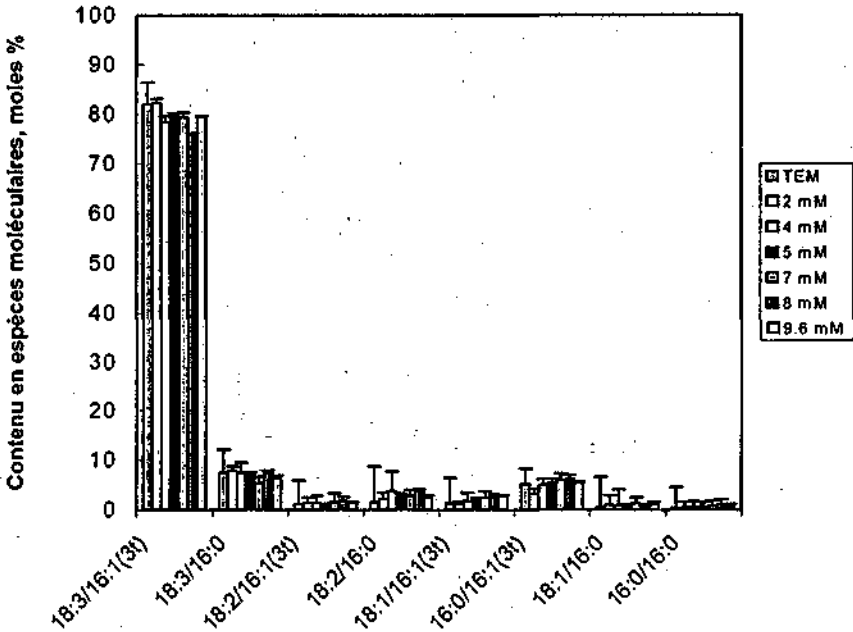


FIG. VI.6 : Influence de l' α -cyclodextrine perméthylée sur la composition en espèces moléculaires du phosphatidylglycérol ($n = 5$): TEM: témoin non traité, 2 à 9.6 mM: concentrations de CD pendant l'incubation.

tion au delà duquel la membrane perdait de son imperméabilité et, par la même, de sa capacité à permettre aux électrons de circuler et aux chlorophylles de fluorescer.

La figure VI.7 représente le changement de volume de la membrane en présence de diverses concentrations de saccharose dans le milieu externe (40, 51 et 60 mM): On constate que, jusqu'à l'adjonction de 6 mM de cyclodextrine, la membrane présente une bonne réponse osmotique: le volume membranaire diminue suite à la sortie d'eau des thylacoïdes, ceci pour équilibrer les concentrations interne et externe en sucre. Par contre, après une incubation avec

10 mM de CD, la membrane ne réagit plus ; il n'y a plus d'échange d'eau entre le lumen thylacoïdal et le milieu externe.

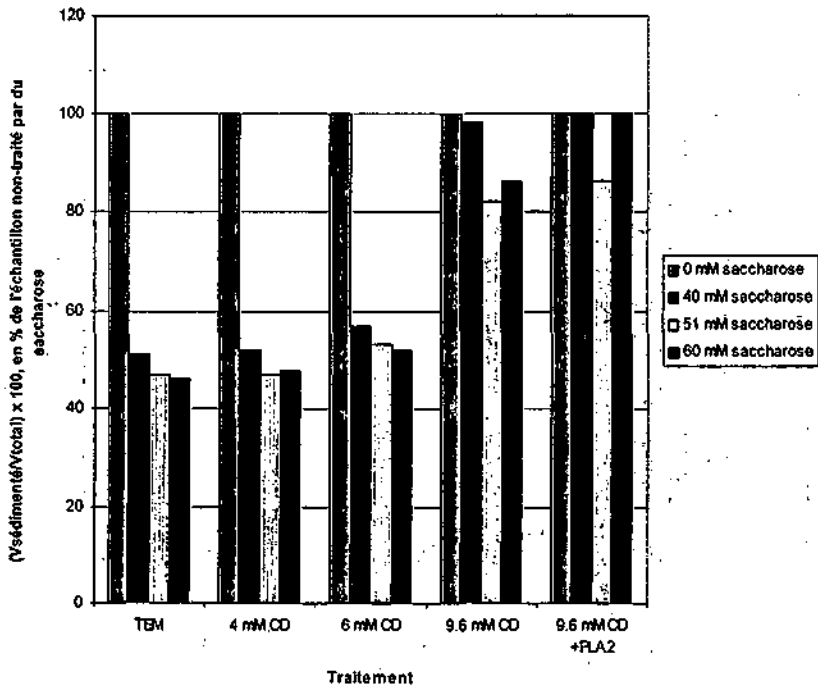


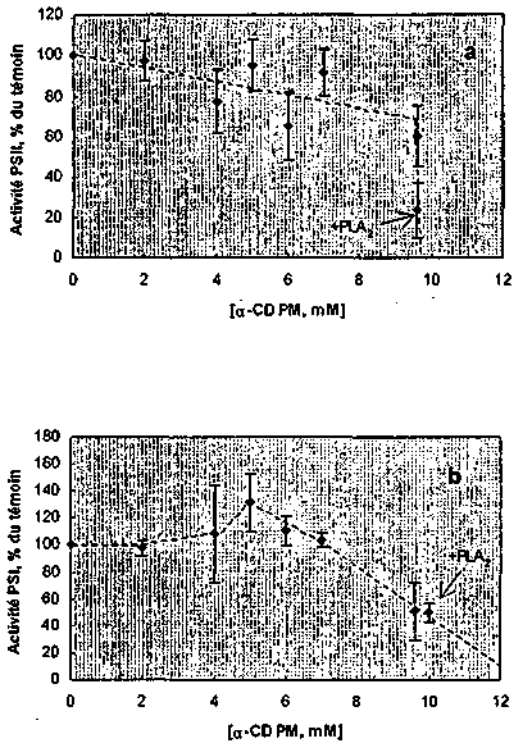
FIG. IV.7 : Réponse osmotique (changement de volume) des membranes thylacoïdales incubées en présence d' α -cyclodextrine perméthylée ; les dernières fractions sont incubées en présence de 9.6 mM α -CD PM puis 20 min. à 20°C en présence de phospholipase A₂ (4 unités par mg de Chl). Suite à l'incubation avec la CD, les membranes thylacoïdales (2 mg Chl/ml) sont mises en suspension dans un milieu constitué de 40 mM Tricine (pH 7.8) et 3 mM MgCl₂ puis elles sont mises en présence d'une solution de saccharose (40, 51 ou 60 mM) ; n=3

Influence de la délipidation par l' α -cyclodextrine perméthylée sur quelques paramètres photosynthétiques tels que le flux d'électrons et la fluorescence des photosystèmes

- La figure VI.8a représente l'effet de la délipidation par la cyclodextrine sur le flux d'électrons (découplé) à travers le photosystème II. Le flux d'électrons diminue progressivement en fonction de la concentration en CD. Même avec 9.6 mM de CD, l'activité par rapport au témoin est

encore d'environ 60 %. Par contre, l'addition d'une phospholipase après l'incubation à 9.6 mM de CD provoque une baisse drastique du flux (baisse de 40 %).

- La figure VI.8b représente l'effet de l' α -CD perméthylée sur le flux d'électrons (découplé) à travers le photosystème I.



FIGS. VI.8a et 8b : Effet de l' α -cyclodextrine perméthylée sur le flux d'électrons linéaire découplé à travers, a le photosystème II (de H_2O à PpBQ) et b le photosystème I (de l'Ascorbate/DCPIP au méthylviologène); pour a, 100% d'activité correspondent à 37 ± 11 μ moles O_2 dégagé par mg Chl par h, pour b, 100% d'activité correspondent à 428 ± 108 μ moles O_2 consommé par mg Chl par h, n=7; le dernier point de chaque graphe représente un traitement des thylacoïdes pendant 20 min. à 0°C par 9,6 mM α -CD PM puis une incubation de 40 min. à 20°C en présence de phospholipase A_2 (4 unités par mg Chl).

Jusqu'à une concentration de 7 mM de CD, l'activité du flux d'électrons se maintient à 100%. On observe en outre une stimulation du flux d'électrons PSI lorsque les membranes sont incubées en présence de 5 mM de CD. Une concentration de 9.6 mM de cyclodextrine réduit brutalement l'activité du flux de 55 % environ. L'addition de phospholipase A₂ ne semble pas affecter cette activité.

- La figure VI.9 représente l'effet d'un traitement par la cyclodextrine sur la fluorescence à basse température. Le graphe est une représentation, non pas du niveau de fluorescence des photosystèmes II (695 nm) et I (740 nm), mais du rapport de fluorescence PSII / PSI.

On observe que, dans le témoin non-traité, le rapport est de 1.5, environ, ce qui signifie que le pic de fluorescence du PSII est environ 1.5 fois plus grand que celui du PSI. Lorsque l'on augmente la concentration de cyclodextrine, on constate que ce rapport baisse. Ainsi, pour une incubation en présence de 2 mM de CD, le rapport n'est plus que de 1, ce qui implique que les deux pics sont à la même hauteur. Pour 9.6 mM de CD, le rapport n'est plus que de 0.4, ce qui signifie que le pic du PSII représente seulement 40 % de la hauteur du pic du PSI.

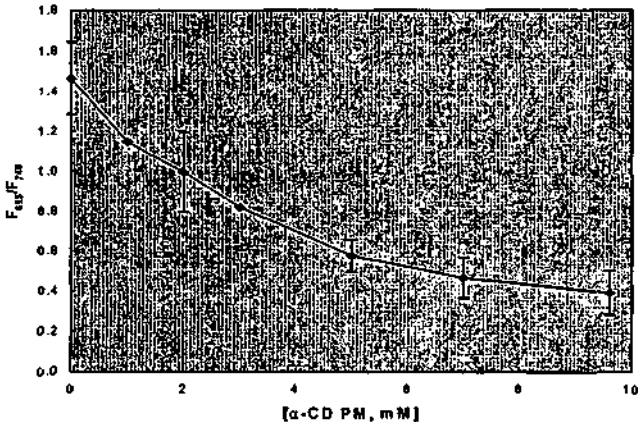


FIG. VI.9 : Effet d'un traitement des membranes thylacoïdales par l' α -cyclodextrine perméthylée sur le rapport de fluorescence (à basse température, 77K) des photosystèmes II et I ; le PSII fluoresce à 695 nm et le PSI à 740 nm ; n=6 pour les points pour lesquels l'écart-type est représenté ; n=2 pour les autres.

- L'effet d'une incubation (20 min. à 4°C) des membranes thylacoïdales en présence d' α -CD PM sur la cinétique d'induction de fluorescence du PSII est représentée sur les figures VI.11 et VI.12. La figure VI.10 représente, quant à elle, une courbe d'induction de fluorescence standard. Cette figure nous permet de mieux comprendre les commentaires qui ont trait aux figures VI.11 et VI.12.

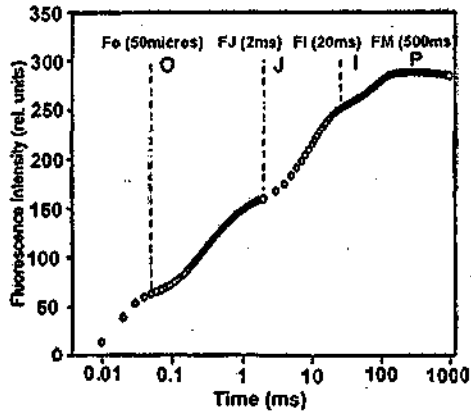


FIG. VI.10 : Courbe d'induction de fluorescence OJIP typique (feuille de tabac). Cette figure est adaptée d'une figure de Van Rensburg et al (1996).

Dans la figure VI. 11, le contrôle présente une cinétique normale bien que la phase J-Fm soit lente (Fm correspond à P dans la figure VI.10). D'autre part, quel que soit l'échantillon considéré, on constate que le traitement par l' α -cyclodextrine perméthylée induit une plus forte diminution de la fluorescence du côté Fm que du côté Fo (Fo correspond à O dans la figure VI.10). De plus, il semblerait que le deuxième épaulement, I, (voir la courbe standard de la figure VI.10) qui se trouve normalement à 20-30 ms, n'apparaisse pas.

Pour une meilleure compréhension des résultats, les courbes ont été normalisées par rapport à Fo. Les courbes normalisées sont représentées sur la figure VI.12 sur laquelle on observe, pour l'échantillon traité par 1 mM de CD, une augmentation de l'intensité de la fluorescence dans la phase J-Fm par rapport au contrôle non-traité. Une incubation par 2 mM de CD provoque une légère baisse du Fm par rapport au témoin. Une incubation par 3 mM de CD provoque non seulement la diminution du Fm mais aussi du J. La cinétique de fluorescence des échantillons traités par 4, 5, 7 et 10 mM de

CD présente un F_m bien inférieur à celui du contrôle et des échantillons traités par 1, 2 ou 3 mM de CD. F_m et J baissent lentement au fur et à mesure que l'on augmente la concentration en CD.

- Le tableau VI.II représente, en valeurs, ce que l'on peut voir sur les figures VI.11 et VI.12, c'est-à-dire que l'expression F_v/F_m de la courbe d'induction de fluorescence diminue au fil du traitement des membranes par des concentrations croissantes de CD. La seule exception est, comme nous l'avons mentionné plus haut, l'échantillon traité par 1 mM de CD et dont F_v/F_m est un peu plus élevé que celui du témoin non-traité.

TABLEAU VI.II : Rapport entre la fluorescence variable ($F_m - F_o$) et la fluorescence maximale $[(F_m - F_o)/(F_m - \text{fluorescence initiale avant } F_o)]$ lors des cinétiques d'inductions de fluorescence du PSII en présence de CD.

	Concentration en α -cyclodextrine perméthylée								
	0	1 mM	2 mM	3 mM	4 mM	5 mM	6 mM	7 mM	10 mM
F_v / F_m	0.624	0.641	0.599	0.567	0.491	0.449	0.463	0.435	0.392

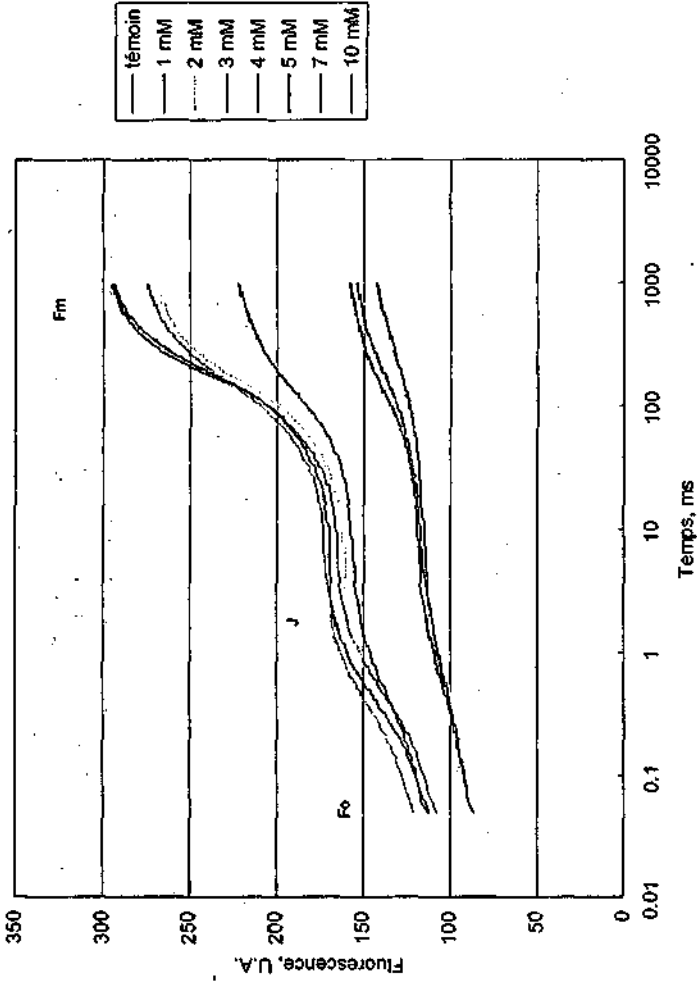


FIG. VI.11 : Cinétiques d'induction de fluorescence du photosystème II dans des membranes thylacoïdées incubées en présence de concentrations croissantes d' α -cyclodextrine perméthylée (20 min. à 4°C; n = 4) ; U.A. = unités arbitraires. Les courbes étant nombreuses, la lecture de cette figure sera plus facile si l'on se réfère à l'ordre indiqué dans la légende.

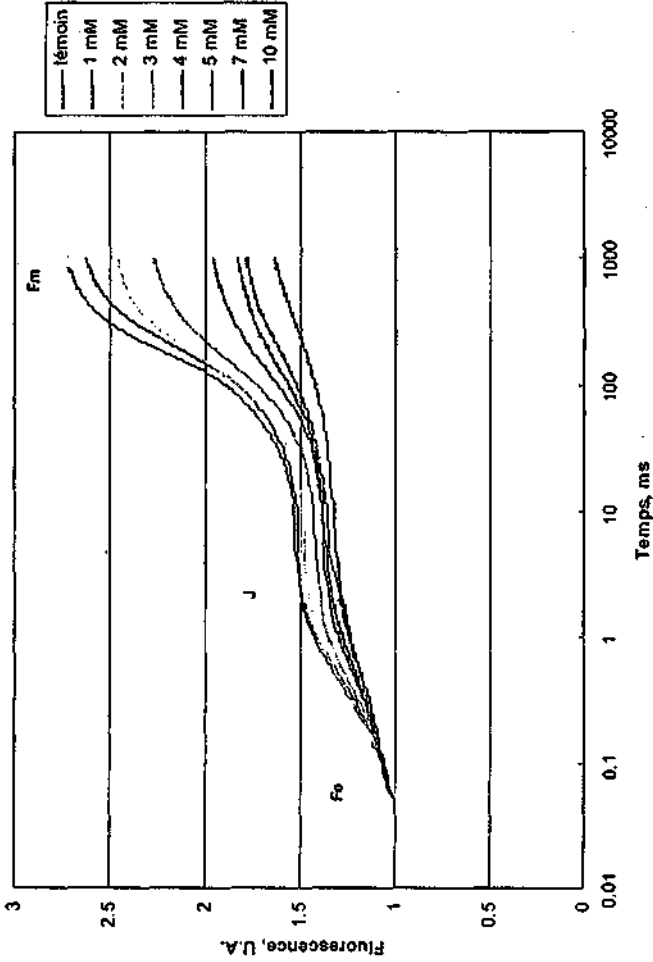


FIG. VI.12: Cinétiques d'induction de fluorescence du photosystème II dans des membranes thylacoïdales incubées en présence de concentrations croissantes d' α -cyclodextrine perméthylée (20 min. à 4°C); les courbes sont normalisées au niveau F_0 ($t = 50\mu s$) du contrôle ($n = 4$); U.A. = unités arbitraires. Les courbes étant nombreuses, la lecture de la figure sera plus facile si l'on se réfère à l'ordre indiqué dans la légende.

DISCUSSION

Choix d'une cyclodextrine par comparaison de sa capacité de délipidation des membranes thylacoïdales

L'emploi d'enzymes lipolytiques spécifiques constitue une méthode efficace et fiable (Siegenthaler et Trémolières, 1998) pour l'étude de la distribution transversale et de la fonction des galactolipides (Rawyler et Siegenthaler, 1985 ; Siegenthaler et al., 1988) et des phospholipides (Rawyler et Siegenthaler, 1981a et b ; Siegenthaler et al., 1987a ; Siegenthaler et al., 1989a) dans les membranes thylacoïdales. Quant à l'arrangement spatial et au rôle des sulfolipides dans les thylacoïdes, ils n'ont pas été étudiés car il n'existe pas, à ce jour, d'enzyme sulfolipase.

Les cyclodextrines (CD) sont des oligosaccharides cycliques largement employés dans l'industrie pharmaceutique, cosmétologique et alimentaire comme transporteurs de molécules organiques à travers les membranes. En effet, les cyclodextrines ont la capacité de complexer des molécules hydrophobes dans la cavité formée par leur anneau. Les lipides étant des molécules hydrophobes, Rawyler et Siegenthaler (1996) ont eu l'idée d'utiliser ces composés comme agent délipidant. Ils ont donc testé le comportement des cyclodextrines α et β , ainsi que de deux dérivés de la β -CD, vis-à-vis des membranes thylacoïdales. Quelques résultats sur la capacité de ces CD à extraire les lipides des membranes thylacoïdales sont présentés dans le tableau VI.1. En outre, ils ont testé l'influence des cyclodextrines sur d'autres composants des membranes photosynthétiques et ont déterminé que les cyclodextrines n'affectent pas le contenu en protéines telles que le complexe collecteur de lumière du photosystème II (LHCII) ou l'ATP-synthétase. Le contenu en chlorophylles et en caroténoïdes ne varie pas non plus en fonction de la concentration en cyclodextrine. Par contre, un des dérivés de la β -CD, la β -CD diméthylée, a la capacité de complexer 30% des plastoquinones tandis que l' α -CD en est incapable.

Nous avons, à notre tour, testé plusieurs dérivés des CD dans l'espoir de découvrir un dérivé qui ne complexerait que le sulfolipide des membranes thylacoïdales, le sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG). Nos résultats sont résumés dans le tableau VI.1.

Les dérivés de cyclodextrines que nous avons étudiées peuvent être classés en quatre catégories :

- (a) Les cyclodextrines insolubles dans un milieu aqueux (telle la β -CD peracétylée). Elles sont donc inutilisables pour nos expériences.

- (b) Les cyclodextrines solubles dans une solution aqueuse mais qui ne forment pas de complexes avec les lipides thylacoïdaux, comme par exemple certains dérivés de la β -CD : les β -CD hydroxypropylée, perméthylée, carboxylée, quaternaire, amphotère et sulfatée. Cette incapacité à complexer les lipides est certainement due à la nature de la dérivation. Dériver une cyclodextrine consiste à remplacer tout ou partie des groupes hydroxyles (il y en a trois par glucopyranose) par d'autres groupes. Cela entraîne que les forces électrostatiques et les diverses liaisons qui peuvent exister entre les atomes d'hydrogène et d'oxygène de la CD changent et que l'anneau de la CD se rigidifie ou s'élargit. Cela provoque une incapacité de la CD à encapsuler les lipides. On remarquera que la β -CD, non-dérivée, a un certain pouvoir complexant.
- (c) Les cyclodextrines qui n'ont pas de spécificité et complexent indifféremment toutes les classes de lipides. Ainsi, la β -CD enlève le même pourcentage de chaque lipide.
- (d) Les cyclodextrines qui complexent préférentiellement les sulfolipides et les phospholipides, c'est-à-dire celles qui enlèvent deux à quatre fois plus de sulfo- et phospholipides que de galactolipides. L' α -cyclodextrine, l' α -cyclodextrine perméthylée, la β -cyclodextrine diméthylée (sur les carbones 2 et 6) et la γ -cyclodextrine agissent ainsi. On observe, en se référant au tableau VI.1, que l' α -cyclodextrine est plus efficace à délipider les membranes que la γ -cyclodextrine. Ceci est sans doute dû au fait que l'anneau de la γ -CD est plus grand que celui de l' α -CD (8 Å pour la γ -CD et 5 pour l' α -CD, Bekers et al., 1991) ce qui implique peut-être une moins bonne imbrication des chaînes d'acides gras ou de la tête polaire du lipide dans la cavité de la CD donc un facteur de complexation beaucoup plus faible. Il serait intéressant de vérifier cette théorie en utilisant de la γ -CD perméthylée qui a une cavité encore plus large parce que le remplacement des groupes hydroxyles par des groupes méthyles assouplit les liaisons (Reinhardt et al., 1996). Nous pourrions déterminer si, effectivement, le pourcentage de lipides trappés par cette CD est plus bas que celui de la γ -CD. La seule ombre à cette séduisante théorie est l'incapacité de la β -CD perméthylée à capter les lipides alors qu'elle devrait avoir un effet intermédiaire entre celui de la β -CD et celui de la γ -CD puisque son diamètre de cavité est intermédiaire (Reinhardt et al., 1996).

Suite à cette étude préliminaire, nous avons décidé d'employer l' α -CD perméthylée pour étudier la relation entre l'organisation spatiale et la fonction

des lipides dans les membranes photosynthétiques. En effet, parmi les CD de la catégorie (d) décrites plus haut, l' α -cyclodextrine perméthylée est celle qui permet d'enlever la plus grande quantité de sulfolipides et phospholipides sans enlever (ou presque) les galactolipides dans une certaine gamme de concentration de CD. Ainsi, entre 1 et 5 mM de CD, pour une incubation de 20 minutes à 4°C, le contenu en MGDG et DGDG ne varie pas par rapport à celui du contrôle sans CD (voir figure VI.3). Cette intéressante propriété nous permet de déterminer l'influence conjointe des SQDG et PG sur quelques fonctions photosynthétiques. De plus, si l'on soustrait l'effet du PG (voir chapitre IV), on devrait pouvoir estimer l'effet du SQDG seul.

Pourquoi l' α -cyclodextrine perméthylée complexe-t-elle plutôt les sulfolipides et phospholipides que les galactolipides ? A-t-elle une préférence pour certains acides gras (parmi les quatre lipides étudiés) ou pour certaines espèces moléculaires du PG ?

- Plusieurs cyclodextrines sont utilisées dans le domaine pharmaceutique comme transporteurs de molécules biologiquement actives à travers les membranes. Or, certaines cyclodextrines, telles que l' α -CD et la β -CD non-dérivées, présentent une activité hémolytique qui les rend impropres à ce genre d'utilisation. En effet, elles ont la capacité de former des complexes d'inclusion avec les phospholipides des membranes des érythrocytes ce qui provoque leur lyse. Quelques chercheurs (voir par exemple Fauvelle et al., 1994 ou Debouzy et al., 1997) ont étudié le mécanisme de la formation des complexes d'inclusion entre l' α -CD et certains phospholipides composant les membranes des érythrocytes (PC, phosphatidylcholine ; PS, phosphatidylsérine ; PI, phosphatidylinositol ; PE, phosphatidyléthanolamine). La délipidation a lieu en deux étapes : tout d'abord, l'association externe ou l'inclusion de la tête polaire du phospholipide dans la cavité de l'anneau de l' α -cyclodextrine provoque l'extraction complète du phospholipide hors de la membrane. En second lieu, l'interaction entre la tête polaire du lipide et la cyclodextrine se dissipe pour faire place à la formation d'un complexe d'inclusion stable entre une des chaînes d'acides gras (celle qui est liée au carbone 2 du glycérol, le carbone central) du lipide et l'anneau de l' α -CD. Debouzy et al. (1997) ont constaté que la charge électrique de la tête polaire du phospholipide détermine le type d'interaction entre le lipide et la CD (association externe par liaisons hydrogène ou même inclusion de la partie inositol dans le cas de PI). Dans notre cas, la figure VI.3 laisse supposer que, pour une concentration en α -CD perméthylée inférieure à 6 mM, l'interaction entre l' α -CD perméthylée et les têtes polaires du phosphatidylglycérol (PG) ou du sulfoquinovosylglycérol (SQDG) est plus

forte que celle qui est engendrée par la mise en présence de l' α -CD PM et des deux galactolipides (MGDG et DGDG). Ceci serait dû au fait que le groupe phosphate du PG et le groupe sulfate du SQDG sont chargés négativement alors que les groupes galactoses du MGDG et du DGDG sont électriquement neutres donc moins attractifs pour la cyclodextrine. Les galactolipides ne sont complexés par l' α -CD PM que lorsque les membranes thylacoïdales sont incubées en présence d'une concentration en cyclodextrine supérieure à 5 mM. Ceci pourrait être expliqué de la façon suivante : une incubation des membranes thylacoïdales en présence de 6 mM d' α -CD PM entraîne la complexation de la majorité du PG et du SQDG accessible à la cyclodextrine, c'est-à-dire le PG et le SQDG de la monocouche externe des membranes. Les molécules de cyclodextrine qui n'ont pas été employées pour complexer le PG et le SQDG peuvent alors interagir avec d'autres lipides, en l'occurrence les galactolipides MGDG et DGDG. Il faut souligner que l'emploi de cette cyclodextrine, à haute concentration (8 à 10 mM), permet principalement la complexation des populations de lipides de la monocouche externe. Ainsi, une incubation en présence de 8 à 9.6 mM α -CD PM est à l'origine de l'enlèvement de la totalité du PG de la monocouche externe (l'approche enzymatique nous a permis de déterminer la distribution transmembranaire de ce lipide; voir chapitre IV) et de 50% du MGDG, ce qui correspond à 75% du MGDG situé dans la monocouche externe de la membrane thylacoïdale (le rapport molaire externe/interne est de 65/35 pour MGDG; Siegenthaler et al., 1988). Néanmoins, il semblerait qu'une grande partie du DGDG (40%) de la monocouche interne puisse être complexé par la cyclodextrine. En effet, nous savons (Siegenthaler et al., 1988) que la distribution transversale du DGDG est de 15/85 (externe/interne); or, il y a complexation de 50% du DGDG. Il est probable que l'organisation de la membrane thylacoïdale soit perturbée par la complexation d'une grande quantité de lipides ce qui permettrait à la cyclodextrine d'avoir accès aux populations internes de DGDG. Finalement, comme nous ne connaissons pas la distribution transmembranaire du SQDG, nous ne savons pas si l' α -CD PM complexe seulement les populations de SQDG de la monocouche externe ou s'il y a également une délipidation du SQDG interne.

- Ainsi, il semble que la charge électrique de la tête polaire des lipides joue un rôle prépondérant dans l'interaction entre la cyclodextrine et le lipide. Quant à la nature des deux chaînes d'acides gras liés à la partie glycérol du lipide, elle ne devrait pas avoir d'influence immédiate sur l'interaction lipide-cyclodextrine puisque l'inclusion de la chaîne d'acides gras dans l'anneau de la CD ne se fait que dans un deuxième temps, après que le lipide ait été extrait de la membrane par une association entre sa tête polaire et la CD. Nous avons néanmoins voulu vérifier cette hypothèse en déterminant (par

chromatographie en phase gazeuse) s'il y avait un changement de la composition en acides gras de chaque lipide au cours de la délipidation par l' α -CD PM. Les figures VI.4 a, b, c et d représentent cette expérience : il semblerait que, quel que soit le lipide considéré (galactolipides, sulfolipides et phospholipides), sa composition en acides gras ne varie pas sous l'effet d'une incubation en présence de l' α -cyclodextrine perméthylée.

- Nous avons également testé l'influence de l' α -CD perméthylée sur les diverses espèces moléculaires du phosphatidylglycérol (PG). Il faut cependant relever que le PG de la plante qui sert à nos expériences, l'Epinard, ne contient principalement qu'une espèce moléculaire, la 18:3/16:1(3t) (80%). Les sept autres espèces moléculaires sont très faiblement représentées (0.5% à 7% ; voir figure VI.6 ainsi que Siegenthaler et al., 1992). Quoiqu'il en soit, même si le choix des espèces moléculaires mises en présence de la cyclodextrine n'est pas très étendu, on peut tout de même constater qu'elle n'a pas de préférence pour l'une ou l'autre.

Intégrité de la membrane thylacoïdale au cours de la délipidation par l' α -cyclodextrine perméthylée

Avant d'examiner l'influence de la délipidation par l' α -CD PM sur quelques paramètres photosynthétiques tels que le flux d'électrons non-cyclique et la fluorescence des chlorophylles, il convenait de déterminer dans quelle mesure la membrane avait été endommagée par l'enlèvement des lipides. La figure VI.7 nous permet d'affirmer que, jusqu'à et y compris un traitement par 6 mM de CD (qui correspond à un enlèvement de 30 à 35% des lipides totaux ; voir figure VI.2), la membrane est en bon état car elle réagit à l'adjonction de saccharose dans le milieu par une extrusion d'eau afin de rééquilibrer la concentration en sucre entre l'intérieur et l'extérieur. Ceci se traduit par une diminution du volume membranaire. Par contre, un traitement par 9.6 mM de CD, avec ou sans adjonction de phospholipase A₂, endommage la membrane (50 % des lipides ont été enlevés) ce qui se traduit par le fait que les membranes ne réagissent plus à l'ajout de saccharose dans le milieu externe. En effet, il n'y a plus sortie d'eau mais entrée de saccharose, la membrane étant devenue perméable.

Influence de la délipidation par l' α -cyclodextrine perméthylée sur le flux d'électrons linéaire découplé dans les membranes thylacoïdales

- Les figures VI.2, VI.3 et VI.8a nous permettent de mettre en parallèle le changement de la composition en lipides dans les thylacoïdes (sous l'effet de la cyclodextrine puis de la phospholipase A₂) et l'activité du flux d'électrons linéaire découplé à travers le photosystème II.

Nous observons tout d'abord (figure VI.8a) que la complexation des lipides par l' α -cyclodextrine perméthylée entraîne une diminution progressive de l'activité du flux pour atteindre environ 60 % de l'activité du contrôle pour une concentration en α -CD PM de 9.6 mM. Nous pouvons comparer la figure VI.8a et la figure IV.5. Dans cette dernière, nous avons représenté l'effet de la délipidation en PG (voir aussi figure IV.6) par la phospholipase A_2 sur l'activité du flux tandis que la figure VI.8a représente l'influence de l'enlèvement de toutes les classes de lipides par la CD. Si l'on superpose ces deux courbes (pour une plus grande clarté, ces courbes ont été représentées

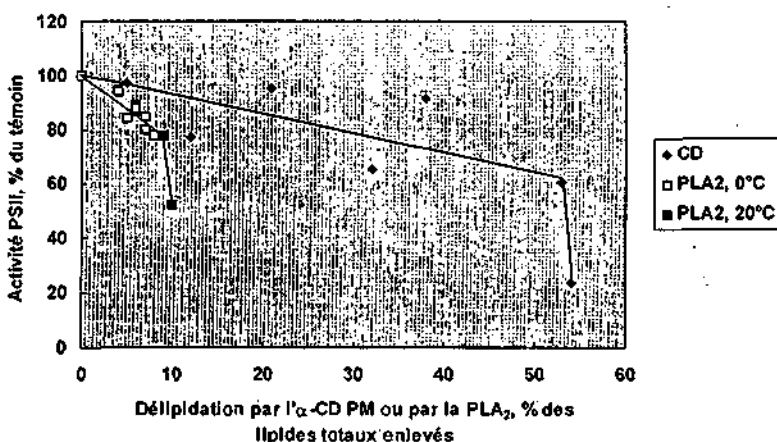


FIG. VI.13 : Effet d'une délipidation par l' α -cyclodextrine perméthylée (toutes les classes de lipides sont touchées) ou par la phospholipase A_2 (seul le PG est hydrolysé) sur le flux d'électrons linéaire découplé à travers le photosystème II (de H_2O à PpBQ). Le dernier point de la partie cyclodextrine du graphe représente un traitement des thylacoïdes pendant 20 min. à 0°C par 9.6 mM α -CD PM puis une incubation de 40 min. à 20°C en présence de phospholipase A_2 (4 unités par mg Chl). 100% d'activité correspondent à 37 ± 11 μ moles O_2 dégagé par mg Chl par h pour le graphe qui concerne la cyclodextrine et à 90 ± 9 pour le graphe qui concerne la phospholipase.

sur la même figure, VI.13), on constate qu'elles présentent la même tendance à la baisse à ceci près que cette activité est plus fortement réduite lorsque toutes les classes de lipides sont complexées (par la CD). Ainsi, on peut dire que le fait d'enlever 60% du PG (cette situation correspond à une délipidation d'environ 8% des lipides totaux par la PLA₂ et est représentée par les symboles en carrés blancs sur la figure VI.13), c'est-à-dire tout le PG de la monocouche externe, provoque une baisse de l'activité du flux d'électrons d'environ 25 % tandis que l'enlèvement de 55 % des lipides totaux (ce qui correspond à une délipidation de 50% des galactolipides, 80%

du sulfolipide SQDG et 70% du phospholipide PG; voir figure VI.3) ne contribue qu'à une diminution de l'activité de 35%. Ceci signifie qu'enlever 50% des galactolipides et 80% du sulfolipide ne provoque qu'une baisse d'activité de 10%.

Nos résultats corroborent ceux de Rawlyer et Siegenthaler (1996) qui observent une diminution de l'activité du flux d'électrons de 33 % lorsque 35 % des lipides totaux sont complexés par un mélange d' α et de β -CD. En effet, si nous nous référons à la figure VI.2, nous constatons que, dans notre cas, une incubation en présence de 7 mM d' α -PM-CD permet de complexer 35 % des lipides totaux et qu'une telle incubation provoque une baisse d'activité du flux d'électrons à travers le PSII d'un peu moins de 30 % (Fig. VI.8a).

La figure VI.8a permet aussi d'observer l'extraordinaire influence d'une délipidation par la phospholipase A_2 (incubation de 40 min. à 20°C) sur le flux d'électrons à travers le PSII. Dans notre cas, le PG restant (après une incubation de 20 min. en présence de 9.6 mM de CD) est celui qui se trouve dans la monocouche interne des thylacoïdes. En effet, nous savons (voir chapitre IV et l'article de Siegenthaler et al., 1989a) que la distribution transmembranaire du PG dans les thylacoïdes est de 60/40 (moles % externe/interne). La figure VI.3 nous montre que la PLA_2 n'enlève que 2 à 3 % du PG interne mais cela suffit pour faire baisser l'activité de 40 % (Fig. VI.8a).

Notre conclusion est, d'une part, que le phosphatidylglycérol (PG) de la monocouche externe des membranes thylacoïdales (MT) joue, de toute évidence, un rôle beaucoup plus important que les trois autres lipides sur la régulation de l'activité de flux d'électrons à travers le PSII ; d'autant plus si l'on considère que 60 % de PG ne représentent qu'environ 8 % des lipides totaux de la membrane. D'autre part, le rôle essentiel du PG de la monocouche interne des MT dans le soutien de l'activité du flux d'électrons est à nouveau (Siegenthaler et al., 1989a ; chapitre IV de cette thèse) mis en évidence dans cette expérience. Par contre, il ne semble pas que les galactolipides et sulfolipides de la monocouche externe soient vraiment importants dans le soutien de ce flux. La baisse de 10 % de l'activité imputable à ces lipides n'est sans doute que le reflet d'une forte perturbation de l'organisation spatiale des MT suite à une déplétion de 50 % des lipides totaux (Fig. VI.2).

- La figure VI.8b nous permet de déterminer quelle est l'influence d'une délipidation des MT sur l'activité du flux d'électrons découplé à travers le photosystème I. Nous observons que le tracé de la courbe est différent de

celui de la figure VI.8a. Il semblerait que l'enlèvement de 40 % des lipides totaux (incubation en présence de 7 mM de CD ; voir Fig. VI.2) n'affecte pas du tout l'activité du flux à travers le PSI. Il y aurait même une stimulation de l'activité du flux d'électrons à travers le PSI lorsque 20% des lipides totaux sont enlevés (incubation en présence de 5 mM de CD). Rawlyer et Siegenthaler (1996) ont eux aussi observé une stimulation du flux (45 %) lors d'une délipidation de 35% des lipides totaux (incubation en présence d'un mélange d' α et de β -CD). Par contre, une incubation avec 9.6 mM de CD provoque une diminution d'activité de 50 %. Si l'on observe la figure VI.2, on se rend compte que le contenu en lipides totaux change très peu (moins de 5 %) selon que l'on utilise 7 ou 9.6 mM d' α -CD PM. Ceci signifie que l'enlèvement d'une très petite quantité de lipides peut avoir une influence majeure sur le transport des électrons. La figure VI.3 nous renseigne sur ce qui s'est passé dans les échantillons de MT traités avec 7 ou 9.6 mM de CD, au niveau du contenu de chacun des quatre lipides. La quantité de MGDG et DGDG diminue de 10 à 15 %, celle de SQDG et de PG de 5 %. Il est difficile de déterminer lequel de ces lipides a le plus d'influence sur l'activité du flux.

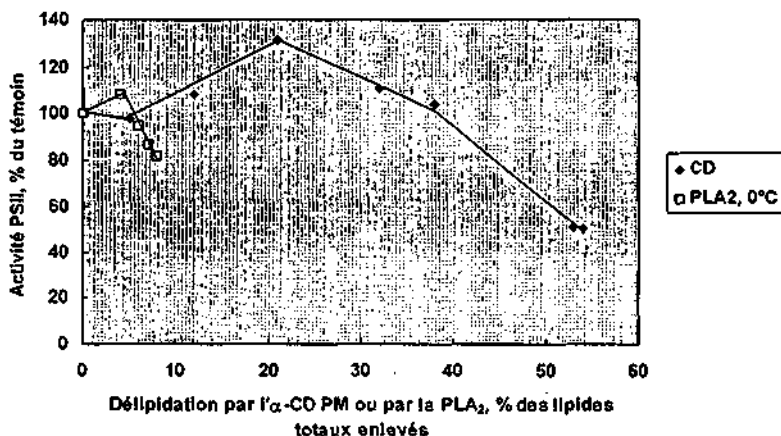


FIG. VI.14 : Effet d'une délipidation par l' α -cyclodextrine perméthylée (toutes les classes de lipides sont touchées) ou par la phospholipase A₂ (seul le PG est hydrolysé) sur le flux d'électrons linéaire découplé à travers le photosystème I (de l'ascorbate au DCPIP puis au méthylviologène/O₂). Le dernier point de la partie cyclodextrine du graphe représente un traitement des thylacoïdes pendant 20 min. à 0°C par 9.6 mM α -CD PM puis une incubation de 40 min. à 20°C en présence de phospholipase A₂ (4 unités par mg Chl). 100% d'activité correspondent à 428±108 μ moles O₂ consommé par mg Chl par h (n=7) pour le graphe qui concerne la cyclodextrine et à 270±32 (n=3) pour le graphe qui concerne la phospholipase.

La figure de synthèse VI.14 représente l'effet de la délipidation des membranes thylacoïdales par la cyclodextrine (tous les lipides sont complexés) ou par la phospholipase (seul le PG est hydrolysé) sur l'activité du flux d'électrons PSI. L'examen de cette figure permet de constater que le fait d'enlever 8-10% des lipides totaux par la phospholipase (symboles carrés sur la figure VI.14), c'est-à-dire 60% du PG (tout le PG de la monocouche externe) provoque une baisse de 20% de l'activité du flux d'électrons à travers le PSI. Or, cette situation correspond à une incubation des MT en présence de 9.6 mM CD (Fig. VI.14 : avant-dernier point du graphe cyclodextrine, symboles en losanges) où nous assistons aussi à une déplétion en PG d'environ 60 % et où la baisse d'activité est de 40%. Nous pouvons donc en conclure que près de la moitié de la diminution d'activité du flux à travers le PSI est à mettre en relation avec la complexation totale du PG de la monocouche externe.

Par contre, on observe, sur la figure VI.8b, qu'une incubation des MT en présence de PLA₂ (après une incubation en présence de 9.6 mM CD) n'affecte pas l'activité du flux d'électrons. Cela signifie sans doute que le PG de la monocouche interne des MT n'a pas de rôle de soutien de l'activité du flux PSI.

- Ces résultats nous permettent d'affiner les conclusions tirées dans l'article de Siegenthaler et al. (1989a). En effet, dans cet article, il était question du flux d'électrons complet, à travers les deux photosystèmes, alors que nous avons étudié séparément le PSII et le PSI, ce qui permet de mieux comprendre le rôle des lipides dans les différentes parties de la membrane.

Influence de la délipidation par l' α -cyclodextrine perméthylée sur la fluorescence à basse température (77 K) des deux photosystèmes

La figure VI.9 nous indique que le fait d'utiliser des concentrations croissantes de cyclodextrine, c'est-à-dire d'enlever de plus en plus de lipides (Figs. VI.2 et VI.3) des membranes thylacoïdales, provoque une augmentation importante de la fluorescence du photosystème I aux dépens de la fluorescence du photosystème II qui diminue. Cela pourrait signifier que la cyclodextrine enlève préférentiellement les lipides des lamelles granaires, conduisant ainsi à une importante désorganisation de cette partie de la membrane. En conséquence, les complexes chlorophylle-protéines qui constituent le photosystème II pourraient ne plus être assemblés correctement et donc, ne seraient plus en mesure d'absorber normalement la lumière. Par contre, la fluorescence du PSI augmente très fortement au cours de la délipidation. Il semblerait donc que les lamelles stromatiques ne soient pas touchées par la cyclodextrine.

Murata (1969) a mis en évidence l'effet du chlorure de magnésium sur la redistribution d'énergie entre le PSII et le PSI. L'ajout de magnésium

empêcherait cette redistribution ce qui se traduit par une fluorescence du PSII supérieure à celle du PSI alors qu'en absence de magnésium la fluorescence du PSI est plus élevée que celle du PSII. Ce phénomène peut s'expliquer de la façon suivante : le $MgCl_2$ permet un bon assemblage des grana (par un effet électrostatique), or, cet arrangement spatial semble perturber la distribution énergétique entre la partie granaire et la partie stromatique des membranes. Dans notre cas, la délipidation par la CD pourrait engendrer un désaccolage des grana (on enregistre le même phénomène lorsque le milieu de suspension des membranes ne contient pas de magnésium) ce qui, en conséquence, faciliterait le passage de l'énergie du PSII au PSI. Ces résultats confirment les expériences relatées par Rawlyer et Siégenthaler (1996) qui ont également observé une diminution de la fluorescence du PSII et une augmentation de celle du PSI au cours de la délipidation par un mélange d' α et de β -cyclodextrine. Ces changements ont été interprétés comme résultant d'une redistribution de l'énergie d'excitation entre les photosystèmes.

Influence de la délipidation par l' α -cyclodextrine perméthylée sur la cinétique d'induction de fluorescence du PSII

Les résultats des figures VI.11 et VI.12 nous permettent de tirer les conclusions suivantes :

- La cinétique du contrôle présente une montée, entre F_0 et F_1 , passablement faible. En effet, même si les figures VI.10 et VI.11 ne sont pas nécessairement comparables, nous pouvons calculer le rapport F_1/F_0 et constater qu'il est d'environ 2.5 pour la cinétique de la figure VI.10 tandis qu'il ne vaut qu'environ 1.5 pour le contrôle de la figure VI.11. Cela pourrait indiquer que la réduction du premier accepteur du PSII, Q_A , se fait incomplètement. Ceci est sans doute imputable au système responsable de la photolyse de l'eau, système qui produit l'oxygène, les protons et les électrons qui réduiront Q_A . Le manganèse, qui fait partie de ce complexe et qui est indispensable à cette réaction, est sans doute détaché des membranes thylacoïdales sous l'action des nombreux lavages qui président à l'obtention de thylacoïdes très purifiés. Les mesures de dégagement d'oxygène confirment cette hypothèse (Fig. VI.8a). En effet, le contrôle non-traité présente une activité découplée de seulement 37 ± 11 μ moles O_2 dégagé par mg de Chl par h alors que Akerlund et Andersson (1983) ou Andreasson et al. (1988) enregistrent une activité basale de, respectivement 117 et 135 (Tableau IV.I).
- Normalement, une courbe d'induction de fluorescence de la Chl a présente deux épaulements (appelés J et I) avant d'atteindre un plateau qui correspond au point P ou Fm (voir par exemple Srivastava et Strasser, 1996 et la figure

VI.10). Or, dans notre cas, il semble que l'épaulement I n'apparaît pas. D'autre part, la montée entre F_i et F_m est passablement lente (ce commentaire est basé sur la comparaison entre les figures VI.10 et VI.11) ce qui pourrait signifier que le transport des électrons de Q_A à Q_B , puis aux plastoquinones (PQ) se fait plus rapidement que le transport de H_2O à P_{680} puis à Q_A puisque, comme nous l'avons expliqué plus haut, le complexe de photolyse de l'eau est sans doute endommagé. Ainsi, Q_A ne serait pas complètement réduit ce qui empêcherait une montée rapide de la fluorescence à partir de l'épaulement J (en effet, Q_A ralentit la fluorescence lorsqu'il est dans un état oxydé).

- Quant à la délipidation par les cyclodextrines, elle semble provoquer plus de changements du côté F_m (ou I) que du côté F_o . Or, nous savons (voir par exemple l'article de Strasser et al., 1996) que, (a) $1/F_m$ est proportionnel à la constante de désexcitation non-photochimique ($k(N)$), (b) $1/F_o$ est proportionnel à la somme de $k(N)$ et de la constante photochimique ($k(P)$) et, (c) $1/F_o - 1/F_m$ est proportionnel à $k(P)$. Dans notre cas, une incubation en présence de concentrations croissantes de CD provoque une baisse importante de F_m donc une augmentation de $1/F_m$ (donc de $k(N)$) tandis que $1/F_o$ reste constant. Par conséquent, $1/F_o - 1/F_m$ diminue (baisse de $k(P)$). La diminution de $k(P)$ et l'augmentation de $k(N)$ signifient que la délipidation par la cyclodextrine provoque une inactivation photochimique des centres réactionnels P_{680} qui se traduit par une dissipation non-photochimique.
- Il semblerait que ce soit particulièrement à partir d'incubations en présence de plus de 4 mM de CD que le niveau de fluorescence maximale présente une forte baisse. Or, c'est à partir de cette concentration-là que les galactolipides commencent à être complexés par la CD. Ces lipides constituent 70 % des lipides totaux des MT ; ils sont donc essentiels au maintien de l'organisation spatiale des complexes chlorophylle-protéines. On peut, par conséquent, envisager que l'enlèvement des galactolipides par la CD provoque une forte perturbation des MT. Ceci entraîne une diminution du flux d'électrons et de la fluorescence.
- Sur la figure VI.12, on peut observer un phénomène inattendu : il semblerait qu'une incubation en présence de 1 mM de CD provoque une augmentation de F_m par rapport au contrôle. Il est difficile d'interpréter ce phénomène. Les figures VI.3 a, b, c et d semblent indiquer que, à cette concentration-là, la CD ne complexe pas les lipides. Peut-être s'accumule-t-elle autour des membranes et permet-elle le maintien en place des complexes chlorophylles-protéines ce qui permettrait une réduction de Q_A plus rapide.

Nous avons discuté des résultats de façon assez générale sur la base des courbes d'inductions de fluorescence (figures VI.11 et VI.12). Or, il existe un mode de traitement des résultats qui permet une discussion plus approfondie. Il s'agit d'une représentation en graphe « toile d'araignée » (« spider » en anglais) de divers paramètres calculés à partir des cinétiques d'induction de fluorescence.

La figure VI.15 représente l'effet d'une délipidation par la cyclodextrine (de 2 à 6 mM) sur, d'une part, des activités photosynthétiques spécifiques telles que le degré d'absorption de la lumière (ABS/RC) et de piégeage des photons (TRo/RC) par centre réactionnel du PSII et le flux d'électrons qui en résulte (ETo/RC) et, d'autre part, sur des activités phénoménologiques (c'est-à-dire par surface foliaire ou « cross section » (CS)) telles que l'absorption lumineuse (ABS/CS), le piégeage des photons (TRo/CS) et le flux d'électrons par surface foliaire

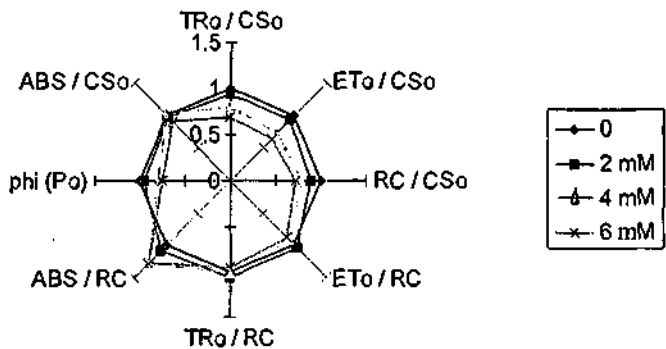


FIG. VI.15 : Influence d'une délipidation des membranes thylacoïdales par l' α -cyclodextrine perméthylée sur l'absorption et le piégeage des photons par le PSII ainsi que sur le flux d'électrons qui en résulte.

(ETo/CS). Le rapport du nombre de centres réactionnels PSII par surface foliaire (RC/CS) ainsi que le degré de piégeage des photons par rapport à l'absorption lumineuse ($\phi(Po)$) sont également représentés sur le graphe de la figure VI.15. Les valeurs de cette figure sont données dans le tableau VI.III.

- Nous observons (Fig. VI.15) que l'absorption de lumière par surface foliaire (ABS/CSo) reste constante au fil de la délipidation par la CD tandis que le degré de piégeage des photons (TRo/CSo) et le flux d'électrons par surface (ETo/CSo) diminuent. Cette baisse résulte de la diminution du rapport

RC/CS₀ (quantité de centre réactionnel par surface). Cela signifie qu'un certain nombre de centres réactionnels PSII sont inactivés par le traitement par la CD. Etant donné que le degré d'absorption des photons par centre réactionnel (ABS/RC) est calculé comme l'absorption par centre réactionnel actif, ce paramètre augmente puisque certains centres sont inactivés.

TABLEAU VI.III : Influence de la délipidation par l' α -cyclodextrine perméthylée sur divers paramètres photosynthétiques (se référer à l'article de Strasser et al. (1996) pour l'aspect théorique des calculs de ces paramètres à partir des valeurs représentées sur les cinétiques d'induction de fluorescence ; figures VI.11 et VI.12)

PARAMETRES	0 contrôle	2 mM	4 mM	6 mM
FLUX par RC				
ABS/RC	2.93	3.23 1.00	3.76 1.10	3.74 1.28 1.28
TRo/RC	1.82	1.92 1.00	1.85 1.06	1.73 1.02 0.95
ETo/RC	1.27	1.32 1.00	1.19 1.04	1.14 0.93 0.90
DENSITE DE RC				
RC / CS ₀ (Chl/CS)/(Chl/RC)	38.21	33.77 1.00	30.05 0.88	27.26 0.79 0.71
ACTIVITES				
ABS / CS ₀	112	109 1.00	113 0.97	102 1.01 0.91
TRo / CS ₀	69.46	64.83 1.00	55.48 0.93	47.24 0.80 0.68
ETo / CS ₀	48.60	44.57 1.00	35.63 0.92	31.14 0.73 0.64
RENDEMENT				
TRo / ABS = ϕ_i (Po)	0.62	0.59 1.00	0.49 0.96	0.46 0.79 0.75

Finalement, le degré de piégeage des photons par centre réactionnel (TRo/RC) et le flux d'électrons qui en résulte (ETo/RC) diminuent peu. En conclusion, ces résultats nous permettent d'affirmer que la délipidation des membranes thylacoïdales par l' α -cyclodextrine perméthylée a pour effet de désactiver un certain nombre de centres réactionnels. Cependant, les centres réactionnels encore actifs gardent une activité photochimique normale (le piégeage des photons par centre réactionnel = TRo/RC reste constant).

CONCLUSIONS

Le but de ce chapitre VI était de déterminer le rôle des différentes classes de lipides des membranes thylacoïdales dans le soutien de l'activité photosynthétique. Nous étions particulièrement intéressés par la fonction des sulfolipides dans les membranes thylacoïdales. Afin d'étudier ces fonctions, nous avons délipidé les membranes, non pas avec une enzyme spécifique, comme nous l'avons fait dans le chapitre IV, mais avec un composé essentiellement utilisé en pharmaceutique et chromatographie, la cyclodextrine.

Nous avons commencé par tester la capacité de délipidation de différentes cyclodextrines dérivées puis avons arrêté notre choix sur l' α -cyclodextrine perméthylée. En effet, cette CD a la propriété intéressante de ne complexer que les sulfolipides et phospholipides, dans une gamme de concentration de 0 à 5mM, puis, au-delà d'une concentration de 5 mM, d'enlever les galactolipides. Ainsi, en utilisant les connaissances que nous avons déjà de l'influence d'une délipidation du phosphatidylglycérol (PG) sur le flux d'électrons (en présence de phospholipase A₂), nous avons pu estimer le rôle que jouent le PG, le sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG) et les galactolipides dans la fonction photochimique :

- Le PG est essentiel dans le soutien du flux d'électrons linéaire découplé. Nous avons étudié séparément le flux d'électrons à travers les photosystèmes I ou II et avons observé, que le flux d'électrons à travers le PSII est principalement soutenu par le PG de la monocouche interne des MT mais que, par contre, en ce qui concerne le flux à travers le PSI, c'est le PG de la monocouche externe qui joue un rôle important. Il semblerait donc qu'il existe, latéralement, des sous-populations de PG, que l'on peut considérer comme faisant partie des « lipides stratégiques ».
- Comme on pouvait s'y attendre, les galactolipides, qui constituent les lipides majeurs des membranes thylacoïdales, tiennent en place les complexes chlorophylle-protéines. Les cinétiques d'induction de fluorescence nous

indiquent que, lorsque l'on commence à enlever les galactolipides de la membrane, le système de photolyse de l'eau et le centre réactionnel P_{680} ne fonctionnent plus correctement. En effet, la délipidation par la cyclodextrine aurait pour effet de désactiver un certain nombre de centres réactionnels du PSII.

- Nous ne sommes pas parvenu à mettre en évidence un rôle spécifique des populations de sulfolipides (SQDG) dans les membranes thylacoïdales car, les têtes polaires du PG et du SQDG ayant la même charge électrique, les cyclodextrines n'ont pas de spécificité pour l'un ou l'autre de ces deux lipides.

1417

CHAPITRE VII

CONCLUSION GENERALE

Ce travail nous a permis de considérablement améliorer les connaissances que nous avons (pour une revue, se référer à Siegenthaler, 1998 et à Siegenthaler et Trémolières, 1998) sur l'organisation spatiale des glycérolipides dans les membranes thylacoïdales de l'Epinard et sur le rôle que les lipides jouent dans la fonction photosynthétique.

En ce qui concerne l'organisation spatiale des glycérolipides thylacoïdaux, que nous avons étudiée à l'aide de vésicules subthylacoïdales obtenues par fractionnement mécanique et séparation dans des systèmes biphasiques aqueux, nous avons démontré que la distribution transversale du phosphatidylglycérol (PG) est différente dans les lamelles granaires inside-out (distribution de $40/60 \pm 3$ mol%, externe/interne) et dans les lamelles stromatiques ($70/30 \pm 5$ mol%, externe/interne). D'autre part, il n'y a pas d'asymétrie latérale des « lipides structurels » (« bulk lipids ») dans la membrane thylacoïdale. Ceci n'exclut pas la possibilité, comme le prétendent beaucoup d'auteurs, que certains lipides (dits stratégiques) soient fortement et spécifiquement associés à certaines protéines ou complexes chlorophylles-protéines. Dans ce sens-là, on peut parler d'asymétrie latérale des « lipides stratégiques ».

Le rôle des glycérolipides structurels dans les thylacoïdes a été mis en évidence par une méthode originale et nouvelle. L'emploi de cyclodextrines, oligosaccharides cycliques qui ont la capacité de délipider les membranes en encapsulant les lipides dans la cavité hydrophobe de leur anneau, a permis de différencier le rôle des lipides anioniques (phospholipide et sulfolipide) et celui des lipides neutres (galactolipides).

Il semble que le phosphatidylglycérol (PG) joue un rôle essentiel dans le soutien du flux d'électrons linéaire découplé. Nous avons étudié séparément le flux d'électrons à travers les photosystèmes I et II. Nous avons observé que le flux d'électrons à travers le PSII est principalement soutenu par le PG de la monocouche interne des MT mais que, par contre, le flux à travers le PSI dépend uniquement du PG de la monocouche externe. Il semblerait donc qu'il existe, latéralement, des sous-populations de PG qui ont des fonctions diverses quant à l'intensité du flux d'électrons photosynthétique dans les membranes thylacoïdales. Les galactolipides, quant à eux, auraient pour fonction de maintenir une conformation adéquate des complexes pigments-protéines. Finalement, nous ne sommes pas parvenus à mettre en évidence un rôle spécifique des populations de sulfolipides (SQDG) dans les thylacoïdes car, les têtes polaires du PG et du SQDG ayant la même charge électrique, les cyclodextrines n'ont pas de spécificité pour l'un ou l'autre de ces deux lipides.

Néanmoins, il serait peut-être possible d'étudier la fonction du SQDG en commençant par enlever uniquement le PG de la monocouche externe des membranes thylacoïdales à l'aide de la phospholipase A₂ avant d'utiliser l' α -cyclodextrine perméthylée à basse concentration (moins de 5 mM) afin de complexer le SQDG et d'observer dans quelle mesure une déplétion en sulfolipide a un effet sur le flux d'électrons photosynthétique et la fluorescence des chlorophylles.

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail de thèse, je souhaite vivement remercier :

- Le Professeur Paul-André Siegenthaler, ancien directeur du Laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université de Neuchâtel et, maintenant, Professeur Honoraire de l'Université de Neuchâtel, de m'avoir proposé ce sujet d'étude et de m'avoir accueillie dans son laboratoire. Je le remercie également pour le temps qu'il m'a consacré tout au long de ma thèse, plus particulièrement pendant la phase de rédaction de mon mémoire et pour ses conseils scientifiques avisés.
- Le Professeur Enrico Martinoia, actuel directeur du Laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université de Neuchâtel, d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et de m'avoir permis de finir mon doctorat dans son laboratoire dans des conditions optimales.
- Le Professeur Reto Strasser, directeur du Laboratoire de Bioénergétique de l'Université de Genève, de m'avoir accueillie chaleureusement dans son laboratoire afin de conduire une série d'expériences et pour ses conseils scientifiques judicieux. Je le remercie également pour le temps qu'il a consacré à réviser la partie de mon travail qui concerne les cinétiques d'induction de fluorescence et d'avoir accepté d'être un des membres de mon jury de thèse.
- Le Docteur Saturnin Claude, privat-docent dans le Laboratoire de Chimie Organique de l'Université de Neuchâtel (dirigé par le Professeur R. Tabacchi), de m'avoir aimablement fourni les diverses cyclodextrines dérivées, d'avoir synthétisé, à notre demande, l' α -cyclodextrine perméthylée et d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.
- Le Professeur Waldemar Eichenberger, directeur du Laboratoire de Biochimie Végétale de l'Institut de Biochimie de l'Université de Beme, d'avoir accepté d'être un des membres de mon jury de thèse.
- Le Professeur Per-Ake Albertsson, ancien directeur du Laboratoire de Biochimie de l'Université de Lund (Suède), ainsi que ses collaborateurs, Mesdames Agneta Persson, Eva Andreasson, Shigui Yu et Ingun Sunden-Cullberg et Messieurs Hreinn Stefansson et Louie Wollenberger de m'avoir accueillie à plusieurs reprises dans leur laboratoire, de m'avoir appris toutes les finesses de la méthode d'isolement des vésicules subthylacoïdales à l'aide de systèmes biphasiques aqueux et pour leurs conseils avisés.
- Madame Jana Smutny, technicienne dans le Laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université de Neuchâtel, de m'avoir permis d'utiliser les résultats qu'elle avait obtenus avec les vésicules thylacoïdales inside-out et pour son amitié.

- Le Docteur Alaka Srivastava, collaboratrice du Professeur R. Strasser dans le Laboratoire de Bioénergétique de l'Université de Genève, de m'avoir consacré tout son temps lorsque j'ai mené quelques expériences dans ce laboratoire.
- Le Docteur André Rawyler, ancien chef de travaux du Laboratoire de Physiologie végétale de l'Université de Neuchâtel, des précieux conseils qu'il m'a prodigués dans les moments critiques.
- Le Docteur Yinong Xu, pour le temps qu'il m'a accordé chaque fois que j'avais un problème chromatographique ou informatique et pour son amitié.
- Mesdemoiselles Nathalie Simon-Vermot et Marie-José Arias, anciennes apprenties laborantines dans le Laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université de Neuchâtel, pour leur précieuse assistance technique et leur amitié.
- Mademoiselle Monique Reymond, qui a travaillé une année avec moi dans le cadre de son travail de diplôme, pour sa persévérance et son amitié.
- Tous mes collaborateurs et amis, anciens ou actuels, du Laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université de Neuchâtel, à savoir, Marlyse, Christiane, Jarmila, Bénédicte, Agnès, Nathalie F., Aurélie, Naoko, Vivienne, Damien, Nathalie B., Lucien, Marc-Olivier, Thomas, Talat, Olivier, Markus et Sébastien, pour avoir su créer une ambiance de travail fantastique. Je remercie aussi toutes mes étudiantes et étudiants pour leur enthousiasme pendant les travaux pratiques ainsi que les collègues du Laboratoire de Biochimie de l'Université de Neuchâtel, à savoir, le Professeur Neuhaus, M. Schuermann, Sophie, Cristina, Nadine, Véronique, Gipo, Yves, David, Albert et Maxime.
- Mes parents, qui m'ont permis de mener cette étude dans les meilleures conditions et m'ont soutenu moralement.
- Ma sœur, Christelle, ma grand-mère et les autres membres de ma famille ainsi que mes amis et amies, dont Pascal, Emma, Giancarlo, Marcel, Marie-Claire, Liliane, Andrzej, Antonio, Boris, Maria, Angelika, Josefine, Calleo, Juanito, Jessica, François, Arpad, tous les membres du club d'aviron et les collaborateurs de l'école secondaire du Mail, de m'avoir distrait de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- Akerlund, H.-E. and Andersson, B. (1983) Quantitative separation of spinach thylakoids into Photosystem II-enriched inside-out vesicles and Photosystem I-enriched right-side-out vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, 725, 34-40
- Albertsson, P.A. (1956) Chromatography and partition of cells and cell fragments. *Nature* 177, 771-774
- Albertsson, P.A. (1958) Particle fractionation in liquid two-phase systems-The composition of some phase systems and the behaviour of some model particles in them-Application to the isolation of cell walls from microorganisms. *Biochim. Biophys. Acta*, 27, 378-395
- Albertsson, P.-A. (1995) The structure and function of the chloroplast photosynthetic membrane – a model for the domain organization. *Photosynthesis Research* 46, 141-149
- Andreasson, E., Svensson, P., Weibull, C. and Albertsson, P.-A. (1988) Separation and characterization of stroma and grana membranes – evidence for heterogeneity in antenna size of both Photosystem I and Photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta*, 936, 339-350
- Bednarz, J., Radunz, A. and Schmid, G.H. (1988) Lipid composition of photosystem I and II in the tobacco mutant *Nicotiana tabacum* NC 95. *Z Naturforsch* 43c, 423-430
- Bekers, O., Vijtendaal, E.V., Beijnen, J.H., Bult, A. and Underberg, W.J.M. (1991) Cyclodextrins in the pharmaceutical field, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 17(11), 1503-1549
- Bender, M.L. and Komiyama, M. (1978) in : *Cyclodextrin Chemistry*, Springer Verlag, Berlin
- Bergeron, R. and Rowan, R. (1976) The molecular disposition of sodium *p*-nitrophenolate in the cavities of cycloheptaamylose and cyclohexaamylose in solution. *Bioorg. Chem.*, 5, 425-436
- Bergsma, J., Bruinenberg, P.M., Hokse, H. and Meiberg, J.B.M. (1988) in : *Proceedings of the 4th International Symposium on Cyclodextrins* (Hber, O. et Szejtli, J. eds), p.41, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Bishop, D.G., Kenrick, J.R., Bayston, J.H., MacPherson, A.S. and Johns, S.R. (1980) Monolayer properties of chloroplasts lipids. *Biochim. Biophys. Acta*, 602, 248-259
- Block, M.A., Dorne, A.J., Joyard, J. and Douce, R. (1983) Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. I. Electrophoretic and immunochemical analyses. *J. Biol. Chem.*, 258, 13281-13286
- Brewster, M.E., Simpkins, J.W., Singh Hora, M., Stern, W.C., Bodor, N. and Parent, J. (1989) *Sci. Technol.*, 43, 231
- Bruinsma, J. (1961) A comment on the spectrophotometric determination of chlorophyll. *Biochim. Biophys. Acta*, 52, 576-578

- Chapman, D.J., De Felice, J. and Barber, J. (1984) Lipids at sites of quinone and herbicide interaction with the photosystem two pigment-protein complex of chloroplast thylakoids. In: Siegenthaler, P.A. and Eichenberger, W. (eds) Structure, Function and Metabolism of Plant Lipids, pp 457-464. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York
- Clarke, R.J., Coates, J.H. and Lincoln, S.F. (1988) Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 46, 205
- Costes, C., Bazier, R. and Lechevallier, D. (1972) Rôle structural des lipides dans les membranes des chloroplastes de Blé. *Physiol Vég* 10, 291-317
- Costes, C., Bazier, R., Baltscheffsky, H. and Hallberg, C. (1978) Mild extraction of lipids and pigments from *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *Plant Sci Lett* 12, 241-249
- Debouzy, J.C., Fauvelle, F., Crouzy, S., Girault, L., Chapron, Y., Göschl, M. and Gabelle, A. (1998) Mechanism of α -cyclodextrin induced hemolysis. 2. A study of the factors controlling the association with serine-, ethanolamine-, and choline-phospholipids. *J. of Pharm. Sci.*, 87, 59-66
- Douce, R., Holz, R.B. and Benson, A.A. (1973) Isolation and properties of the envelope of Spinach chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 248, 7215-7222
- Doyle, M.F. and Yu, C.A. (1985) Preparation and reconstitution of a phospholipid deficient cytochrome *b₆-f* complex from spinach chloroplasts. *Biochem Biophys Res Commun* 131, 700-706
- Duchêne, D. (1988) in : Proceedings of the 4th International Symposium on Cyclodextrins (Huber, O. et Szejtli, J. eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Duchêne, S., Smutny, J. and Siegenthaler, P.-A. (1996) Topological and photosynthetic functional sidedness of phospholipids in spinach thylakoid membrane, inside-out and right-side-out vesicles. *Experientia* 52, S08-12
- Dubacq, J.P. and Trémoilières, A. (1983) Occurrence and function of phosphatidylglycerol containing Δ^3 -trans- hexadecenoic acid in photosynthetic lamellae. *Physiol. Vég.*, 21, 293-312
- Eichenberger, W., Schaffner, J.C. and Boschetti, A. (1977) Characterization of proteins and lipids of photosystem I and II particles from *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett* 84, 144-148
- Eckert, H.J., Toyoshima, Y., Akabori, R. and Dismukes, G.C. (1987) The involvement of lipids in light-induced charge separation in the reaction center of photosystem II. *Photosynthesis Res.*, 14, 31-41
- Fauvelle, F., Debouzy, J.C., Nardin, R. and Gabelle, A. (1994) Nuclear magnetic resonance study of a polar headgroup determined α -cyclodextrin-phospholipid association. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 33, 95-99
- Ford, R.C. and Barber, J. (1983) Time-dependent decay and anisotropy of fluorescence from diphenylhexatriene embedded in the chloroplast thylakoid membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, 722, 341-348

- 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
- Gounaris, K., Sundby, C., Andersson, B. and Barber, J. (1983a) Lateral heterogeneity of polar lipids in the thylakoid membranes of spinach chloroplasts. *FEBS Lett.* 156, 170-174
- Gounaris, K., Whitford, D. and Barber, J. (1983b) The effect of thylakoid lipids on an oxygen-evolving photosystem II preparation. *FEBS Lett.* 163, 230-234
- Gounaris, K. and Barber, J. (1985) Isolation and characterisation of a photosystem II reaction centre lipoprotein complex. *FEBS Lett* 188, 68-72
- Gounaris, K., Barber, J. and Harwood, J.L. (1986) The thylakoid membranes of higher plant chloroplasts. *Biochem. J.*, 237, 313-326
- Haines, T. H. (1983) Anionic lipid headgroups as a proton-conducting pathway along the surface of membranes: A hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 160-164
- Heinz, E. and Siefermann-Harms, D. (1981) Are galactolipids integral components of the chlorophyll-protein complexes in spinach thylakoids? *FEBS Lett* 124, 105-111
- Henry, L.E.A., Mikkelsen, J.D. and Müller, B.L. (1983) Pigment and acyl lipid composition of photosystem I and II vesicles and of photosynthetic mutants in Barley. *Carlsberg Res Commun* 48, 131-148
- Hobe, S., Prytulla, S., Kühlbrandt, W. and Paulsen, H. (1994) Trimerization and crystallization of reconstituted light-harvesting chlorophyll *a/b* complex. *EMBO J.*, 13, 3423-3429
- Hobe, S., Kuttkat, A., Förster, R. and Paulsen, H. (1995) Assembly of trimeric light-harvesting chlorophyll *a/b* complex in vitro. In: Mathis, P. (ed) *Photosynthesis: From Light to Biosphere*, vol 1, pp 47-52. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London
- Israelachvili, J.N., Mitchell, D.J. and Ninham, B.W. (1977) Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, 470, 185-201
- Juhler, M. et al. (1993) *Photosynthesis Research*, 35, 171-178
- Krupa, Z. and Baszynski, T. (1975) Requirement of galactolipids for photosystem I activity in lyophilized spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 408, 26-34
- Kruse, O. and Schmid, G.H. (1995) The role of phosphatidylglycerol as a functional effector and membrane anchor of the D1-core peptide from photosystem II-particles of the cyanobacterium *Oscillatoria chalybea*. *Z Naturforsch* 50c, 380-390
- Kito, M., Takamura, H., Narita, H. and Urade, R. (1985) A sensitive method for quantitative analysis of phospholipid molecular species by high-performance liquid chromatography. *J. Biochem.* 98, 327-331

- Laemmli, U.R. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 227, 680-685
- Lichtenthaler, H.K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments in photosynthetic biomembranes. In: Packer, L. and Douce, R. (eds) *Plant Cell Membranes, Methods in Enzymology*, vol 148, pp. 350-382, Academic Press, New-York and London
- Lowry, D.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randal, R.J. (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275
- Lukovits, I. (1988) Theoretical investigation of inclusion complexes of β -cyclodextrin with alcohols. *J. Mol. Struct.*, 170, 249
- Makewicz, A., Radunz, A. and Schmid, G.H. (1995) Structural modifications of the photosynthetic apparatus in the region of photosystem I in *Nicotiana tabacum* as a consequence of an increased CO₂-content of the atmosphere. *Z Naturforsch* 50c, 511-520
- 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, in: *Methods in Enzymology* (Lowenstein, ed.) vol 72, part. D, pp. 296-303, Academic Press, New-York
- Mattoo, A.K. and Edelman, M. (1987) Intramembrane translocation and posttranslational palmitoylation of the chloroplast 32 kD herbicide binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1497-1501
- Murata, N. (1969) Control of excitation transfer in photosynthesis. II. Magnesium ion-dependent distribution of excitation energy between two pigment systems in spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 189, 171-181.
- Murata, N., Higashi, S.-I. and Fujimura, K. (1990) Glycerolipids in various preparations of Photosystem II from spinach chloroplasts. *BBA*, 1019, 261-268
- Murata, N. and Siegenthaler, P.A. (1998) Chap 1 : Lipids in photosynthesis : an overview. In: Siegenthaler, P.A. and Murata, N. (eds) *Lipids in Photosynthesis : Structure, Function and Genetics*, pp. 1-20, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Murphy, D.J. (1982) The importance of non-planar bilayer regions in photosynthetic membranes and their stabilisation by galactolipids. *FEBS Lett* 150, 19-26
- Murphy, D.J. and Woodrow, I.E. (1983) Lateral heterogeneity in the distribution of thylakoid membrane lipid and protein components and its implications for the molecular organization of photosynthetic membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 725, 104-112
- Murphy, D.J. (1986) The molecular organization of the photosynthetic membranes of higher plants. *Biochim. Biophys. Acta* 864, 33-94
- Nishiara, M., Yokota, K. and Kito, M. (1980) Lipid molecular species composition of thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 617, 12-19

- Nussberger, S., Dörr, K., Wang, D.N. and Kühlbrandt, W. (1993) Lipid-protein interactions in crystals of plant light-harvesting complex. *J Mol Biol.*, 234, 347-356
- Okada, Y., Koizumi, K., Ogata, K. and Ohfuji, T. (1989) Inclusion complexes of lipids with branched cyclodextrins. *Chem. Pharm. Bull.*, 37, 3096-3099
- Ouijja, A., Farineau, N., Cautrel, C. and Guillot-Salomon, T. (1988) Biochemical analysis and photosynthetic activity of chloroplasts and photosystem II particles from a barley mutant lacking chlorophyll *b*. *Biochim Biophys Acta* 932, 97-106
- Pick, U., Gounaris, K., Weiss, M. and Barber, J. (1985) Tightly bound sulpholipids in chloroplast CF₀-CF₁. *Biochim Biophys. Acta* 808, 415-420
- Quinn, P.J. and Williams, W.P. (1983) The structural role of lipids in photosynthetic membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 737, 223-266
- Radunz, A. (1971) Phosphatidylglycerin-antiserum und seine Reaktionen mit Chloroplasten. *Z Naturforsch.*, 26b, 916-919
- Radunz, A. (1972) Lokalisierung des Monogalaktosyldiglycerids in Thylakoidmembranen mit serologischen Methoden. *Z Naturforsch.*, 27b, 822-826
- Radunz, A. (1976) Localization of the tri- and digalactosyl diglyceride in the thylakoid membrane with serological methods. *Z Naturforsch.*, 31c, 589-593
- Radunz, A. (1981) Application of antibodies in the analysis of structural configuration of thylakoid membranes. *Ber Deutsch Bot Ges* 94, 477-489
- Radunz, A. and Berzborn, R. (1970) Antibodies against sulphoquinovosyl-diacyl glycerol and their reactions with chloroplasts. *Z Naturforsch.*, 25b, 412-419
- Rawlyer, A., Henry, L. and Siegenthaler, P.A. (1980) Acyl and pigment lipid composition of two chlorophyll-proteins. *Carlsberg Res Commun* 45, 443-451
- Rawlyer, A and Siegenthaler, P.-A. (1981 a) Transmembrane distribution of phospholipids and their involvement in electron transport, as revealed by phospholipase A₂ treatment of spinach thylakoids. *Biochim Biophys Acta*, 635, 348- 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*, 638, 30-39
- Rawlyer, A. and Siegenthaler, P.-A. (1984) Localization of monogalactosyldiglyceride and digalctosyldiglyceride in spinach thylakoid membranes, in : *Structure, Function and Metabolism of Plant Lipids* (Siegenthaler, P.-A. et Eichenberger, W., eds), pp. 409-412, Elsevier, Amsterdam
- Rawlyer, A. and Siegenthaler, P.-A. (1985) Transversal localization of monogalactosyldiacylglycerol in spinach thylakoid membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 815, 287-298

- 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 plants. *Photosynth. Res.* 11, 3-13
- Rawlyer, A. and Siegenthaler, P.-A. (1989) Change in the molecular organization of monogalactosyldiacylglycerol between resting and functioning thylakoid membranes. Involvement of the CF_0/CF_1 -ATP synthetase. *Biochim. Biophys. Acta*, 975, 283-292
- Rawlyer, A. and Siegenthaler, P.-A. (1996) Cyclodextrins : a new tool for the controlled lipid depletion of thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1278, 89-97
- Reinhardt, R., Richter, M. and Mager, P.P. (1996) Investigation of the conformational behaviour of permethylated cyclodextrins by molecular modelling. *Carb. Res.*, 291, 1-9
- Rémy, R., Trémolières, A., Duval, J.C., Ambard-Bretteville, F. and Dubacq, J.P. (1982) Study of the supramolecular organization of light-harvesting chlorophyll protein (LHCP). *FEBS Lett* 137, 271-275
- Schardinger, F. (1903) *Z. Unders. Nahr. Genussm*, 6, 865
- Schardinger, F. (1911) *Zentralb. Bakteriolog. Abt. II*, 29, 188
- Siefermann-Harms, D., Ninnemann, H. and Yamamoto, H.Y. (1987) Reassembly of solubilized chlorophyll-protein complexes in proteolipid particles- comparison of monogalactosyldiacylglycerol and two phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta*, 892, 303-313
- Siegenthaler, P.-A. (1982) Transmembrane distribution and function of lipids in spinach thylakoid membranes : rationale of the enzymatic modification method. in : *Biochemistry and Metabolism of Plant Lipids* (Wintermans, J.F.G.M. and Kuiper, P.J.C., eds.), pp. 351-358, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam
- Siegenthaler, P.-A. and Giroud, C. (1986a) Transversal distribution of phospholipids in prothylakoid and thylakoid membranes from oat. *FEBS Lett.* 201, 215-220
- Siegenthaler, P.-A. and Rawlyer, A. (1986b) Acyl lipids in thylakoid membranes: distribution and involvement in photosynthetic functions. in : *Encyclopedia of Plant Physiology* (Staehelein, L.A. et Arntzen, C., eds.) New Series, vol. 19, pp. 693-705, Springer Verlag, Berlin
- Siegenthaler, P.-A., Rawlyer, A. and Giroud, C. (1987a) Spatial organization and functional roles of acyl lipids in thylakoid membranes. in : *The Metabolism, Structure and Function of Plant Lipids* (Stumpf, P.K., Mudd, J.B. and Nes, W.D., eds), pp. 161-168, Plenum, New-York
- Siegenthaler, P.-A., Smutny, J. and Rawlyer, A. (1987b) 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 Rawyler, A. (1988) The transmembrane distribution of galactolipids in spinach thylakoid inside-out vesicles is opposite to that found in intact thylakoids. *FEBS Lett.*, vol. 228, 1, 94-98
- Siegenthaler, P.-A., Rawyler, 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., Rawyler, A. and Mayor, J.-P. (1989b) in : *Biological Role of Plant Lipids* (Biacs, P.A., Gruiz, K. et Kremmer, T., eds), pp. 171-180, Akadémiskí Lado, Budapest et Plenum, London
- Siegenthaler, P.A., Xu, Y., Bovet, L., Smutny, J. and Rawyler, A. (1992) Molecular organization and functions of acyl lipids in spinach chloroplast membranes. In : *Proceedings of the 10th International Symposium on the metabolism, structure and utilization of plant lipids* (Cherif, A., Miled-Daoud, D., Marzouk, B., Smaoui, A. and Zarrouk, M. eds) Centre National Pédagogique, Tunis.
- Siegenthaler, P.A. (1998) Chap 7 : Molecular organization of acyl lipids in photosynthetic membranes of higher plants. In : Siegenthaler, P.A. and Murata, N. (eds) *Lipids in Photosynthesis : Structure, Function and Genetics*, pp.119-144 Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Siegenthaler, P.A. and Trémolières, A. (1998) Chap 8 : Role of acyl lipids in the function of higher plant photosynthetic membranes. In : Siegenthaler, P.A. and Murata, N. (eds) *Lipids in Photosynthesis : Structure, Function and Genetics*, pp.145-173 Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- 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
- Spector, T. (1978) Refinement of the Coomassie blue method of protein quantitation. *Anal. Biochem.*, 86, 142-146
- Staelin, L.A. (1986) in : *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series* (Staelin, L.A. and Arntzen, C.J., eds.) vol 19, Springer-Verlag, Berlin
- Srivastava, A. and Strasser, R.J. (1996) Stress and stress management of land plants during a regular day. *J. Plant. Physiol.*, 148, 445-455
- Sundby, C. and Larsson, C. (1985) Transbilayer organization of the thylakoid galactolipids. *Biochim. Biophys. Acta*, 813, 61-67
- Szejtli, J. (1988) in : *Cyclodextrin Technology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Trémolières, A., Dubacq, J.P., Ambard-Bretteville, F. and Rémy, R. (1981) Lipid composition of chlorophyll-protein complexes. *FEBS Lett* 130, 27-31

Trémolières, A., Dainese, P. and Bassi, R. (1994) Heterogeneous lipid distribution among chlorophyll-binding proteins of photosystem II in maize mesophyll chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 221, 721-730

Trémolières, A. and Siegenthaler, P.A. (1998) Chap 9: Reconstitution of photosynthetic structures and activities with lipids. In: Siegenthaler, P.A. and Murata, N. (eds) *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*, pp. 175-189, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

Tuquet, C., Guillot-Salomon, T., de Lubacq, M. and Signol, M. (1977) Granum formation and the presence of phosphatidylglycerol containing *trans*- Δ^3 -hexadecenoic acid. *Plant Sci Lett* 8, 59-64

Uekama, K. and Otagiri, M. (1987) *CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 3, 1

Unitt, M.D. and Harwood, J.L. (1985) Sidedness studies of thylakoid phosphatidylglycerol in higher plants. *Biochem. J.*, 228, 707-711

Van Rensburg, L., Krüger, G.H.J., Eggenburg, P. and Strasser, R.J. (1996) Can screening criteria for drought resistance in *Nicotiana tabacum* be derived from the polyphasic rise of the chlorophyll *a* fluorescence transient (OJIP)? *S. Afr. J. Bot.*, 62, 337-341

Villiers, A. (1891) *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 112, 536

Voss, R., Radunz, A. and Schmid, G.H. (1992) Glycolipids are prosthetic groups of polypeptides of the reaction center complex of photosystem II. In: Argyroudi-Akoyunoglou, J.H. (ed) *Regulation of Chloroplast Biogenesis*, pp 417-422. Plenum Press, New York

Weber, K. and Osborn, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244, 4406-4412

Wollenberger, L., Stefansson, H., Yu, S.G. and Albertsson, P.A. (1994) Isolation and characterization of vesicles originating from the chloroplast grana margins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1184, 93-102

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

Xu, Y. N. and Siegenthaler, P.-A. (1996a) Phosphatidylglycerol molecular species of photosynthetic membranes analyzed by high-performance liquid chromatography: theoretical considerations. *Lipids* 31, 223-229

Xu, Y.N. and Siegenthaler, P.A. (1996b) Effect of non-chilling temperature and light intensity during growth of squash cotyledons on the composition of thylakoid membrane lipids and fatty acids. *Plant Cell Physiol.*, 37, 471-479