

MODIFICATION DE L'APPAREIL PHOTOSYNTHETIQUE ET DE SA
STABILITE THERMIQUE CHEZ UNE POPULATION DE NAVETTE
(*Brassica campestris*) RESISTANTE A L'ATRAZINE

Y. LEMOINE *, J.P. DUBACQ **, J.M. DUCRUET ***

* Laboratoire de Cytophysiologie végétale - E.N.S., 24 Rue Lhomond, 75231 PARIS Cédex 05 - ** Laboratoire de Physiologie cellulaire, Tour 53-3, 4 Place Jussieu, 75230 PARIS Cédex 05 - *** Laboratoire des Herbicides - I.N.R.A. - B.V. 1540 - 21034 DIJON Cédex

Résumé : Les caractéristiques ultrastructurales, biochimiques et fonctionnelles de l'appareil photosynthétique de deux biotypes de *Brassica campestris*, l'un sensible (S), l'autre résistant (R) à l'atrazine ont été comparées. Il apparaît que la taille de l'antenne du PS II est plus importante chez les plantes R et que cette antenne est plus efficace. Les plantes R présentent cependant une fragilité thermique du PS II. Cette fragilité peut expliquer les différences entre ces résultats et ceux de travaux comparables (1,4) réalisés sur des plantes cultivées à des températures plus élevées.

Introduction

La caractérisation biochimique des chloroplastes isolés de navettes résistantes ou sensibles à l'atrazine a été préalablement étudiée par Burke *et al.* (1982). Ces auteurs montraient quelques différences structurales et biochimiques entre les 2 types de plastes. Ces résultats laissaient supposer que les résistants possédaient une antenne photosynthétique plus efficace mais dont le développement ne compensait pas les pertes d'activité photosynthétique mesurées au moyen des transferts d'électrons. L'étude de ces résistants nous a conduits à la confirmation de ces résultats à l'exception de la baisse des activités de transfert d'électrons. La présence d'une antenne photosynthétique plus efficace a été mise en évidence par l'étude électrophorétique des complexes pigments-protéines et l'analyse des propriétés de fluorescence des chloroplastes isolés. De plus l'étude des activités de transfert d'électrons et de production d'oxygène nous a permis de montrer que ces différentes activités photosynthétiques sont très sensibles à la température de culture des plantes. Il apparaît donc possible, que les baisses d'activités obtenues chez R dans d'autres conditions reflètent en réalité une thermosensibilité de ces plantes.

Abréviations : A, activité ; chl, chlorophylle ; CP a, complexe chl. a - protéine du PS II ; CP1 a, forme oligomérique du CP1, complexe P₇₀₀ - chl. a - protéine ; C 16:1 trans, acide Δ_3 -trans hexadécénoïque ; DCMU, 3, -(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée ; DCPIP, 2,6-dichlorophénol-indophénol ; DGDG, digalactosyldiacylglycérol ; LHCP, complexe chl. a/b-protéine (LHCP1, forme oligomérique ; LHCP3, forme monomérique) ; MGDG, monogalactosyldiacylglycérol ; PC, phosphatidylcholine ; PG, phosphatidylglycérol ; PI, phosphatidylinositol ; PS photo-système ; R, navette résistante à l'atrazine ; S, navette sensible à l'atrazine ; SDS, dodécylsulfate de sodium ; SQDG, sulfoquinovosyldiacylglycérol ; T°, température.

Matériel et Méthodes

Les techniques utilisées pour l'observation en microscopie électronique, les analyses électrophorétiques, les analyses lipidiques et les mesures de fluorescence et d'activités photosynthétiques des plastés isolés ont été décrites par ailleurs (5).

Deux populations de Navettes (*Brassica campestris* L.) sont cultivées dans les conditions suivantes : T° 20°C, photopériode 16 h/ jour, éclairage 350 $\mu\text{E}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$. L'une de ces populations est résistante à l'atrazine. L'isolement des chloroplastes est réalisé suivant la technique décrite par Ducruet et De Prado (1982). Les fluorescences sont mesurées sur feuilles entières (face supérieure) en utilisant un guide optique en V, l'une des branches permettant l'arrivée de la lumière d'excitation (450 nm) de faible énergie, l'autre branche, servant à la mesure de la fluorescence émise. Les feuilles sont appliquées pendant l'expérience sur une plaque métallique thermostatée permettant des mesures de fluorescence à T° variable.

Résultats

Ultrastructure des chloroplastes : L'examen en microscopie électronique (fig. 1) fait apparaître l'existence de granums comportant un nombre de saccules plus élevé chez les plantes résistantes (R). Les maxima des nombres de saccules granaires chez R et S sont respectivement 4 et 2. Dans les chloroplastes R on note l'absence de réserves amyloacées qui sont abondantes chez S.

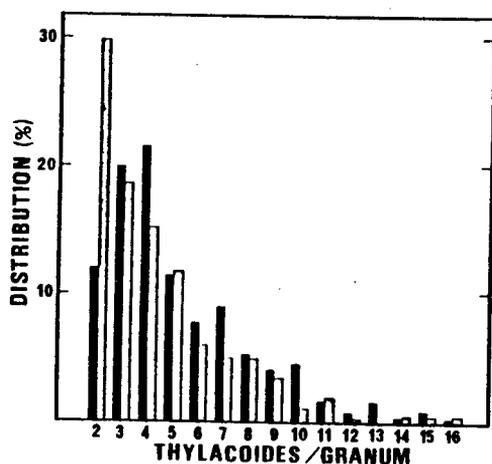


Fig. 1 : Histogrammes de fréquence (en %) des tailles des granums chez les chloroplastes de navette R (■) et S (□)

	Navette Résistante	Navette Sensible
C 16:0	21,5	32,5
Trans-C16:1	35,0	25,8
C 18:0	4,1	5,4
C 18:1	2,3	4,3
C 18:2	16,2	13,2
C 18:3	20,9	18,8

Tableau 1 : Composition en acides gras du PG des navettes résistante et sensible à l'atrazine (exprimée en % des acides gras totaux).

Analyses lipidiques : Les compositions lipidiques des plastes R et S sont identiques qualitativement et quantitativement (MGDG 18,5%, DGDG 29,5%, PC 8%, PG 21%, PI 4%, SQDG 19%). La seule différence significative entre les 2 types de Navette est leur teneur en acide Δ_3 -*trans*-hexadécénoïque du PG (tab. 1). Ces plantes apparaissent riches en PG par rapport aux données classiques de la littérature avec un taux plus élevé en $C_{16:1}$ -*trans* chez R.

Analyses électrophorétiques : La solubilisation des membranes avec le Triton X 100 puis le SDS suivie de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide a permis l'isolement des différents complexes chlorophylle-protéine et une bonne préservation des formes oligomériques. Dans ces conditions (tab. 2) on remarque que les plastes R dont le faible rapport chl a/chl b laissait prévoir l'existence d'une antenne LHCP abondante, possèdent effectivement plus de complexes LHCP 1 et LHCP 3 (rapportés à une même quantité de complexe CP I) que les plastes S. De plus la forme oligomérique de l'antenne chlorophyllienne LHCP 1 s'y trouve en quantité plus élevée.

L'ensemble de ces 3 types d'analyses fait penser que les Navettes R se comportent comme des plantes cultivées en faible lumière.

Tableau 2 : Composition en complexes chlorophylle-protéines des plastes R et S (exprimée en % de la chlorophylle totale) et rapports entre les teneurs de certains complexes.

	CP1a	CP1	LHCP1	CPa	LHCP3	$\frac{LHCP3}{LHCP1}$	$\frac{LHCPs}{CP1s}$
Navette sensible	12,4	18,3	13,6	9,4	46,3	3,4	1,95
Navette résistante	9,3	16,9	17,2	9,6	46,9	2,7	2,45

Cinétiques de fluorescence : Les variations du rendement de fluorescence de chloroplastes isolés ont été mesurées en présence de DCMU. Il ressort que le rendement de la fluorescence est plus important d'environ 60% chez les plastes R que chez les plastes S. Par contre, les rapports fluorescence variable (Fv)/fluorescence fixe (Fo) ne sont pas très différents : ($Fv/Fo = 0,9$ pour R et $Fv/Fo = 1$ pour S). Le temps de 1/2 montée de la fluorescence variable est beaucoup plus faible chez les plastes R (12 ms) que chez S (20 ms). La fluorescence variable de R atteint donc plus rapidement un plateau que celle de S, le niveau du plateau étant plus élevé. Ces mesures traduisent donc l'existence d'une antenne PS II plus efficace chez les Navettes R que chez les S.

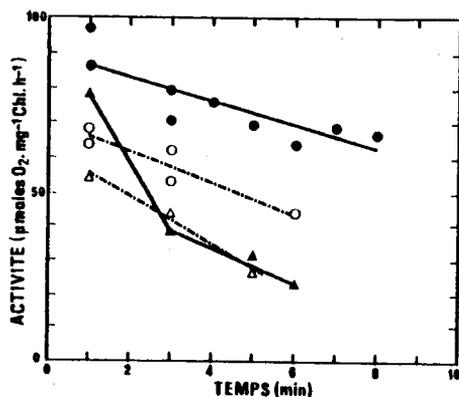


Fig. 2 : Décroissance de l'activité d'émission d'oxygène des plastes R et S à 25°C à 2 pH.
 (●—● R pH 6,8 ; ■—■ R pH 7,8)
 (○---○ S pH 6,8 ; △---△ S pH 7,8)

	Résistant		Sensible		
	n	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ
A pH 6,8	4	1,89	0,19	1,28	0,20
A pH 7,8					
5' à 25°C					
A 25°C	3	2,53	0,10	2,55	0,13
A 10°C					
à pH 6,8					

Tableau 3 : Rapports des activités d'émission d'oxygène (A) des chloroplastes R et S à 2 T° et à 2 pH. (pH 6,8 tampon phosphate; pH 7,8 tampon tricine).

Emission d'O₂ et transfert d'e⁻ : Les activités photosynthétiques des chloroplastes isolés de R et S ont été mesurées en lumière saturante et en lumière limitante (à l'aide d'un filtre neutre de 6,5% de transmission). Il apparaît une différence d'activité entre ces 2 conditions de mesure. Le rapport des activités R/S est de 1,27 ($\sigma = 0,35$) en lumière saturante, l'activité des plastes S étant alors de 62,1 $\mu\text{moles O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{chl}$, alors qu'en lumière limitante R/S vaut 0,94 ($\sigma = 0,13$), l'activité des plastes S étant 24,0 $\mu\text{moles O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{chl}$. L'activité des plastes R n'apparaît donc pas significativement inférieure à celle des plastes S. La figure 2 présente l'évolution au cours du temps de l'activité du dégagement d'O₂ à 2 pH chez R et S à 25°C. On observe une baisse rapide de l'activité des plastes R dans les premières minutes à pH 7,8. Ces variations sont obtenues à des températures supérieures à 20°C et elles s'accroissent avec l'élévation de la température. Les activités à pH 6,8 sont plus élevées qu'à pH 7,8 à 25°C, après 5 min d'incubation. La différence des activités aux pH 6,8 et 7,8 est beaucoup plus importante chez R que chez S. Ces variations d'activité se sont révélées statistiquement significatives (tab. 3). A pH 6,8 l'activité initiale des plastes R et S varie de la même manière entre 10 et 25°C; ces études montrent donc une sensibilité thermique des plastes R qui se manifeste surtout à pH 7,8. L'utilisation d'autres accepteurs d'électrons (DCPIP-méthylviologène) que le ferricyanure utilisé dans les expériences précédentes a permis de retrouver les effets comparables à des températures plus élevées, jusqu'à 30°C.

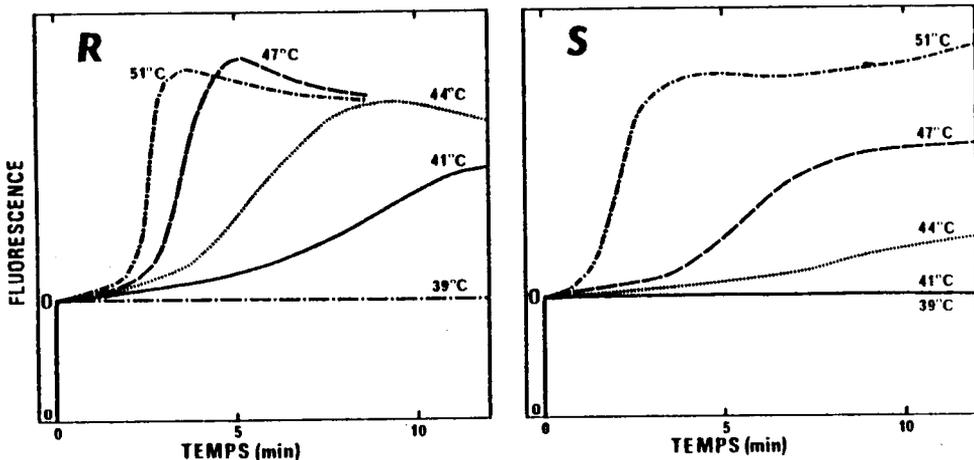


Fig. 3 : Variations en fonction du temps du niveau 0 de la fluorescence de feuilles entières de navettes R et S à diverses températures.

Des expériences similaires ont montré que, après 10 min d'incubation en présence de DCPIP à 25°C et pH 7,8, la baisse d'activité peut alors être compensée par l'addition de diphenyl-carbazone. Après une baisse d'activité de 17% pour S et 45% pour R des récupérations à peu près complètes de l'activité initiale ont été obtenues. L'ensemble de ces études montre que le photosystème II des plastes R est plus sensible aux températures élevées et aux pH basiques que celui des plastes S. Ce problème de sensibilité thermique concerne au moins en partie le système de photolyse de l'eau.

Fluorescence et température : La figure 3 montre l'influence de la température sur la fluorescence F_0 des feuilles au cours du temps. L'augmentation du rendement de la fluorescence F_0 est d'autant plus rapide que la température est plus élevée. Les feuilles S apparaissent plus sensibles à la température que les feuilles R. Les expériences d'incubation des feuilles à 43°C pendant 10 min avant la mesure de fluorescence (à 25°C) ont montré que la phase thermique de l'induction de fluorescence des feuilles R était supprimée alors que celle des feuilles S était seulement réduite (environ -50%). Quand les plantes sont conservées 24 h à 30°C avant l'extraction des chloroplastes, ces organites présentent alors une activité plus faible chez R que chez S (respectivement 40,1 et 60,6 $\mu\text{moles O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{chl} \cdot \text{h}^{-1}$). Là encore, les expériences soulignent la fragilité thermique des plantes R.

Discussion, Conclusions

Les deux caractéristiques principales qui ressortent de cette étude sont que les navettes R possèdent des plastes ayant une organisation proche de celle d'une plante d'ombre et que ces plantes sont sensibles à la température. L'important développement des granums et les analyses lipidiques sont conformes aux données obtenues par Burke *et al.* (1982), de plus les électrophorèses confirment les résultats avancés par cette équipe sur la base des dosages de chlorophylles en montrant l'importance des antennes LHCP. La teneur élevée en C_{16:1} - *trans* et le nombre des accolements granaires chez R sont également concordants avec l'idée d'une antenne PS II plus efficace. Les variations du rendement de fluorescence des feuilles entières en fonction de la température peuvent être utilisées comme une sonde intrinsèque traduisant de possibles altérations des chloroplastes (6). Dans ces conditions, les résultats obtenus montrent bien la moindre stabilité thermique des plastes R. Ces observations *in situ* se retrouvent dans les chloroplastes isolés pour des températures plus faibles et des pH basiques. Cet effet est accentué par le ferricyanure en accord avec Weis (1982) et montre que le PS II est altéré chez R du côté donneur d'e⁻. D'autres espèces étudiées présentent des phénomènes analogues (3). Des différences observées dans les activités photosynthétiques de base de R et S (1, 4) n'ont pas pu être reproduites dans nos conditions de culture. Une explication possible de ces divergences pourrait résider dans la température de culture utilisée par ces auteurs (25°C à 29°C) qui permettrait l'expression de la thermosensibilité que nous avons mise en évidence. Ces résultats suggèrent que c'est peut-être dans la thermosensibilité des Navettes résistantes qu'il faudrait chercher une explication à l'éventuelle baisse de productivité liée au caractère de résistance (7).

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - BURKE J.J., WILSON R.F. et SWAFFORD J.R. (1982) Plant Physiol., 70, 24-29.
- 2 - DUCRUET J.M. et DE PRADO R. (1982) Pest. Biochem. Physiol., 18, 253-261.
- 3 - DUCRUET J.M., LEMOINE Y. et CADAHIA E. (1982) Regard sur la Biochimie, N°2, 45.
- 4 - HOLT J.S., STEMLER A.J. et RADOSEVICH S.R. (1981) Plant Physiol., 67, 744-748.
- 5 - LEMOINE Y., DUBACQ J.P. et ZABULON G. (1982) Physiol. Vég., 20, 487-503.
- 6 - SCHREIBER U. et BERRY J.A. (1977) Planta, 136, 233-238.
- 7 - WARWICK S.I. et BLACK L. (1981) Can. J. Bot., 59, 689-693.
- 8 - WEIS E. (1982) Planta, 154, 41-47.