

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAITRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR

NATHALIE MILLER

**"EXPRESSION D'UNE THERMOTOLÉRANCE AU NIVEAU DE LA  
FONCTION DU PHOTOSYSTÈME II"**

DÉCEMBRE 1993

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

A mes parents...

...et à celle ou celui qui grandit en moi  
et qui m'apporte déjà tant de joie.

William né le 2 février 94

## RESUMÉ

Les biologistes sont depuis longtemps fascinés par la croissance de certains organismes végétaux dans des conditions désertiques, à des température très élevées. Et depuis ce temps, les fundamentalistes cherchent une explication à cette adaptation des végétaux à la chaleur ou face à ce que l'on appel un stress thermique.

Une élévation de température de 10°C au dessus de la température ambiante bouleverse la croissance des organismes végétaux dont le métabolisme est modifié pour faire face à cette agression. L'une des stratégies choisies par les tissus cellulaires pour s'adapter aux variations de température est la synthèse rapide de nouvelles protéines appelées protéines du choc thermique (HSP). Leur implication ainsi que leur mode de fonctionnement ne sont pas véritablement élucidés.

Les principaux objectifs de ce travail sont d'étudier l'activité photosynthétique de la membrane thylacoïdienne ainsi que sa composition polypeptidique lors d'un stress thermique. L'intérêt pour cette membrane est basé sur le fait que celle-ci semble être le site où les effets négatifs de températures élevées se font sentir en tout premier lieu. Par conséquent le site éprouvé par un choc thermique est le thylacoïde et plus particulièrement le photosystème II (PSII), qui est très vulnérable à l'effet de la chaleur. Les recherches ont été habituellement effectuées sur des membranes, isolées du chloroplaste, que l'on incube dans un bain d'eau thermostatée à température élevée. Par contre dans notre étude nous voulions considérer les effets et conséquences apportés par le stress thermique sur le thylacoïde encore intégré à la plante. Cette approche de l'adaptation à la chaleur permet de considérer à la fois son effet sur la plante entière ainsi que sur les

mécanismes de la photosynthèse. Nos membranes thylacoïdiennes à l'étude ne seront isolées de leur milieu naturel qu'une fois le stress thermique complété. Suite à nos conditions d'acclimatation sur les plants d'orge, nos résultats démontrent que l'activité photosynthétique n'est pas perturbée par l'effet de la chaleur, contrairement à ce qui a été observé sur la membrane isolée.

Des techniques de séparation des protéines par électrophorèse nous ont permis d'étudier la composition polypeptidique des membranes thylacoïdiennes de plants d'orge exposés à une élévation de température. Ainsi, deux protéines de stress thermique (HSPs) ont été décelées et localisées au niveau de la membrane photosynthétique. L'inhibition sélective de la synthèse des protéines par l'utilisation d'antibiotiques spécifiques fut employée dans le but de concrétiser l'implication des protéines de stress thermique dans l'acquisition de la thermotolérance. En présence des HSPs le processus de photosynthèse devient plus résistant à l'effet de la chaleur. Par exemple, le polypeptide extrinsèque de 33 kDa, dont le rôle est de stabiliser le complexe responsable du dégagement d'oxygène, est particulièrement sensible aux températures élevées mais devient résistant après l'acclimatation des plants d'orge. Ainsi, le complexe de dégagement d'oxygène semble préserver une intégrité accrue dans les plants acclimatés par l'intégration des HSPs.

## REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord faire part de ma gratitude à mon directeur de recherche, le Dr Robert Carpentier, pour son soutien scientifique apporté depuis plusieurs années, ainsi que le support financier accordé dans le cadre de congrès internationaux.

Des remerciements également aux collègues de laboratoires, présents et passés, pour les bons moments d'entraides et de rigolades.

Je tiens tout particulièrement à dire un grand merci à Marc, un collègue de laboratoire et depuis mon conjoint, pour sa confiance et ses nombreux encouragements à terminer ce travail.

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>BSA :</b>	Sérum albumine bovine
<b>CCL :</b>	Complexe collecteur de lumière
<b>Chl :</b>	Chlorophylle
<b>CPI :</b>	Complexe pigment-proteine associé au PSI
<b>CPII :</b>	Complexe pigment-proteine associé au PSII
<b>DCBQ :</b>	2,5-dichloro-p-benzoquinone
<b>DGDG :</b>	digalactosyl diacylglycerol
<b>DMSO :</b>	diméthyl sulfoxide
<b>EDTA :</b>	acide éthylènediaminetétraacétique
<b>FTIR :</b>	Infra-rouge à transformé de Fourier
<b>HEPES :</b>	acide (N-[2-hydroxyéthyle] pipérazine N'-[2-éthanesulfonique] )
<b>HSG :</b>	granule du stress thermique
<b>HSP :</b>	protéine du stress thermique
<b>LDS :</b>	lauryl dodécyl sulfate
<b>MES :</b>	acide (2[ N-morpholino] éthane sulfonique
<b>MGDG :</b>	monogalactosyl diacylglycerol
<b>POPOP :</b>	(1,4-bis 2,5-phényloxazolyl) benzène
<b>PPO :</b>	2,5- diphényloxazole
<b>PMSF :</b>	phénylméthyl sulfonyl fluorure
<b>PSI :</b>	photosystème I
<b>PSII :</b>	photosystème II
<b>QB :</b>	deuxième accepteur d'électrons du PSII
<b>SDS :</b>	sodium dodécyl sulfate
<b>TEMED :</b>	N,N,N,'N'- tétraméthyl-éthylène diamine
<b>TES :</b>	acide N-tris [hydroxyméthyl] méthyl-2- aminoéthanesulfonique

## TABLE DES MATIÈRES

	page
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>.iii</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>.v</b>
<b>ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>vi</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>.vii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>.xii</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>.xiv</b>
 <b>1. INTRODUCTION .....</b>	 <b>.1</b>
<b>1.1 Objectifs du travail .....</b>	<b>.2</b>
<b>1.1.1 Vérifier les modifications possibles au niveau de la membrane thylacoïdienne lors d'un stress thermique .....</b>	<b>.2</b>
<b>1.1.2 Vérifier la présence de HSP au niveau de la membrane thylacoïdienne .....</b>	<b>.3</b>
<b>1.1.3 Evaluer l'implication des HSP dans l'activité photosynthétique.....</b>	<b>.4</b>



<b>2. APPAREIL PHOTOSYNTHÉTIQUE.</b>	<b>5</b>
2.1 Le chloroplaste.	6
2.2 Composition protéique, lipidique et pigmentaire de la membrane photosynthétique	7
2.3 Organisation de la membrane thylacoïdienne.	12
2.4 Structure des complexes pigmentaires	14
2.5 Chaîne de transport d'électrons.	19
<b>3. STRESS THERMIQUE.</b>	<b>24</b>
3.1 Conséquences d'un choc thermique.	25
3.1.1 Changements structuraux au niveau de la membrane thylacoïdienne	25
3.1.2 Altérations de la composition lipidique de la membrane thylacoïdienne	29
3.1.3 Modifications possibles aux niveaux des complexes pigmentaires	32
3.1.4 Synthèse des protéines de choc thermique	33
3.1.5 Origine des protéines de choc thermique	34
3.1.6 Localisation des protéines du choc thermique.	35

3.2	Thermotolérance et protéines du choc thermique . . . . .	37
3.2.1	Induction de la thermotolérance . . . . .	38
3.2.2	Relation entre l'apparition des HSP et l'expression de la thermotolérance . . . . .	39
4.	<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES.</b> . . . .	42
4.1	Préparation du matériel biologique. . . . .	42
4.1.1	Culture de l'orge. . . . .	42
4.1.2	Traitement du choc thermique . . . . .	42
4.1.3	Incorporation d'antibiotiques. . . . .	43
4.1.4	Incorporation de la radioactivité. . . . .	43
	i) Compteur à scintillation . . . . .	43
4.2	Extractions du matériel biologique . . . . .	44
4.2.1	Extraction des cellules . . . . .	45
4.2.2	Extraction des chloroplastes. . . . .	45
4.2.3	Extraction des membranes thylacoïdiennes. . . . .	46
4.2.4	Extraction des complexes protéiques. . . . .	46
4.2.5	Extraction des protéines totales . . . . .	47

<b>4.3</b>	<b>Techniques biochimiques. ....</b>	<b>47</b>
<b>4.3.1</b>	<b>Electrophorèse SDS-page. ....</b>	<b>49</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Electrophorèse non dénaturante ....</b>	<b>49</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Analyse des électrophorèses ....</b>	<b>50</b>
	<b>i) Techniques de coloration ....</b>	<b>50</b>
	<b>A. Coloration au bleu de coomasie. ....</b>	<b>50</b>
	<b>B. Coloration à l'argent ....</b>	<b>50</b>
	<b>ii) Densitométrie ....</b>	<b>51</b>
	<b>iii) Autoradiographie. ....</b>	<b>51</b>
<b>4.4</b>	<b>Techniques biophysiques ....</b>	<b>52</b>
<b>4.4.1</b>	<b>Spectrophotométrie UV-visible et détermination de la chlorophylle ....</b>	<b>52</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Electrode à oxygène et activité photosynthétique ....</b>	<b>52</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Microscope optique et intégrité des chloroplastes ....</b>	<b>53</b>
<b>4.4.4</b>	<b>Infra-rouge à transformé de Fourier ....</b>	<b>54</b>
	<b>i) Préparation des échantillons. ....</b>	<b>55</b>

<b>5. RÉSULTATS ET DISCUSSION</b> .....	<b>56</b>
---	-----------

### **PARTIE I**

<b>5.1</b> Modifications structurales de la membrane photosynthétique .....	<b>57</b>
<b>5.1.1</b> Etude des changements conformationnels des protéines de la membrane thylacoïdienne en FTIR .....	<b>57</b>
<b>5.1.2</b> Etude des complexes pigments-protéines .....	<b>58</b>

### **PARTIE II**

<b>5.2</b> Présence des HSP au niveau de la membrane photosynthétique. ....	<b>68</b>
<b>5.3</b> Adaptation du PSII au stress thermique .....	<b>78</b>
<b>5.4</b> Thermotolérance. ....	<b>95</b>
<b>5.4.1</b> Thermotolérance en présence d'antibiotiques spécifiques .....	<b>102</b>
<b>i)</b> Influence du chloramphénicol .....	<b>106</b>
<b>ii)</b> Influence du cycloheximide .....	<b>116</b>
<b>6. CONCLUSION</b> .....	<b>121</b>
<b>RÉFÉRENCES</b> .....	<b>124</b>

## LISTE DES TABLEAUX

	Page
1. Nomenclature et localisation des complexes photosynthétiques . . . . .	17
2. Analyse quantitative des protéines membranaires de thylacoïdes isolés de plants d'orge . . . . .	72
3. Activité photosynthétique des membranes thylacoïdiennes provenant de plantes acclimatées ou non acclimatées à la chaleur en présence de lumière . . . . .	81
4. Activité photosynthétique des membranes thylacoïdiennes provenant de plantes acclimatées ou non acclimatées à la chaleur en absence de lumière . . . . .	83
5. Pourcentage de chloroplastes intacts après extraction. . . . .	84
6. Activité photosynthétique des membranes provenant de chloroplastes acclimatés ou non acclimatés à la chaleur en présence de lumière . . . . .	89
7. Analyse quantitative des protéines membranaires de thylacoïdes isolés de chloroplastes. . . . .	94

8. Activité photosynthétique des membranes  
thylacoïdiennes provenant de plantes acclimatées  
ou non acclimatées dans le méthanol . . . . . 105
9. Activité photosynthétique de membranes acclimatées  
ou non acclimatées à la chaleur en présence ou en  
absence de chloramphénicol . . . . . 112

## LISTE DES FIGURES

	page
1. Localisation du chloroplaste. ....	6
2. Structure interne du chloroplaste, représentant l'organisation de la membrane thylacoïdienne. ....	7
3. Composition et origine des protéines de la membrane thylacoïdienne. ....	8
4. Enveloppe du chloroplaste ....	9
5. Transport des protéines à l'intérieur du chloroplaste. ....	10
6. Complexes de polypeptides et de chlorophylles qui constituent la membrane thylacoïdienne ....	13
7. Localisation des complexes du PSI et PSII ....	14
8. Complexes pigment-protéine isolés de la membrane thylacoïdienne d'épinard. ....	16
9. Représentation du complexe collecteur de lumière du PSII. ....	18
10. Représentation du complexe collecteur de lumière du PSI ....	19
11. Spectre d'absorption des chlorophylles a et b ....	20
12. Transport d'électrons à travers le thylacoïde ....	22

13. Réorganisation de la membrane thylacoïdienne sous des conditions de stress thermique . . . . .	30
14. Spectre Infra-rouge à transformé de Fourier de la membrane acclimatée ou non acclimatée à la chaleur. . . . .	59
15. Isolation des complexes pigment-protéine des membranes acclimatées ou non acclimatées à la chaleur. . . . .	61
16. Comparaison par densitométrie des complexes pigment-protéine des membranes acclimatées ou non acclimatées à la chaleur . . . . .	62
17. Spectre d'absorption du complexe CPI isolé de membranes acclimatées ou non acclimatées à la chaleur. . . . .	63
18. Spectre d'absorption du complexe CPII* isolé de membranes acclimatées ou non acclimatées à la chaleur. . . . .	65
19. Spectre d'absorption du complexe CPII isolé de membranes acclimatées ou non acclimatées à la chaleur. . . . .	66
20. Spectre d'absorption des pigments libres de membranes acclimatées ou non acclimatées à la chaleur. . . . .	67
21. Composition polypeptidiques de la membrane thylacoïdienne acclimatée ou non acclimatée à la chaleur (technique de coloration au bleu de coomasie). . . . .	70
22. Comparaison par densitométrie de la composition polypeptidique de la membrane thylacoïdienne . . . . .	71



23. Composition polypeptique de la membrane par la technique de coloration au nitrate d'argent . . . . .	74
24. Autoradiogramme, illustrant les polypeptides nouvellement synthétisés en présence de $^{35}\text{S}$ -méthionine . . . . .	75
25. Analyse par densitométrie de l'autoradiogramme. . . . .	77
26. Composition polypeptidique des membranes photosynthétiques extraites de chloroplastes. . . . .	86
27. Densitogramme représentant la composition polypeptidique des membranes photosynthétiques extraites de chloroplastes . . . . .	87
28. Densitogramme représentant la composition polypeptidique des membranes photosynthétiques extraites de chloroplastes . . . . .	88
29. Composition polypeptidique de membranes thylacoïdiennes extraites de chloroplastes acclimatés ou non acclimatés à la chaleur . . . . .	92
30. Densitogramme représentant la composition polypeptidique de membranes thylacoïdiennes extraites de chloroplastes acclimatés ou non acclimatés à la chaleur. . . . .	93
31. Pourcentage d'activité photosynthétique en fonction du temps d'incubation à 30°C des membranes provenant de plantes acclimatées ou non acclimatées à la chaleur. . . . .	97
32. Pourcentage d'activité photosynthétique en fonction du temps d'incubation à 40°C des membranes provenant de plantes acclimatées ou non acclimatées à la chaleur. . . . .	98

33. Pourcentage d'activité photosynthétique en fonction du temps d'incubation à 30°C des membranes provenant de plantes acclimatées ou non acclimatées à la chaleur, en absence de lumière. .... 100
34. Pourcentage d'activité photosynthétique en fonction du temps d'incubation à 30°C des membranes provenant de chloroplastes acclimatés ou non acclimatés à la chaleur ..... 101
35. Pourcentage d'activité photosynhtétique en fonction du pourcentage de méthanol présent sur les membranes thylacoïdienne provenant de plantes acclimatées ou non acclimatées à la chaleur. .... 104
36. Densitogramme représentant la composition polypeptidique des membranes provenant de plants acclimatés ou non acclimatés à la chaleur en présence de méthanol ..... 107
37. Pourcentage d'activité photosynthétique en fonction du temps d'incubation à 30°C des membranes provenant de plants acclimatés ou non acclimatés à la chaleur en présence de méthanol. .... 108
38. Pourcentage d'activité photosynhtétique des membranes thylacoïdiennes en fonction de la concentration de chloramphénicol. .... 109
39. Pourcentage d'activité photosynthétique en fonction du temps d'incubation à 30°C des membranes provenant de plants acclimatés ou non acclimatés à la chaleur en présence de méthanol et de chloramphénicol. .... 113

40. Activité photosynthétique en fonction du temps  
d'incubation à 30° de la membrane thylacoïdienne  
isolée de plants d'orge non acclimatés en présence  
de 5 ou 15 mM de chloramphénicol. .... 115
41. Pourcentage d'activité photosynthétique en  
fonction du temps d'incubation à 30°C des membranes  
provenant de plants acclimatés ou non acclimatés  
à la chaleur en présence de méthanol et de  
cycloheximide. .... 117
42. Activité photosynthétique en fonction du temps  
d'incubation à 30° de la membrane thylacoïdienne  
isolée de plants d'orge non acclimatés en présence  
de 5 ou 15 mM de cycloheximide. .... 118

# CHAPITRE 1

## INTRODUCTION

La recherche sur les effets des stress physiologiques au niveau des plantes remonte à plusieurs années. Toutes ces études démontrent que les plantes supérieures ont la capacité de survivre et de croître sous des conditions environnementales défavorables. Entre autres les plantes sont aptes à tolérer des températures qui dépassent la température normale de croissance.

Les êtres vivants croissent et se développent dans une zone de températures très étroite: au-dessous de  $-3^{\circ}\text{C}$  et dans certains cas jusqu'à  $-13^{\circ}\text{C}$ , la plupart des réactions biochimiques ne peuvent se produire, c'est aussi le cas au-dessus de la zone de  $37^{\circ}$  à  $47^{\circ}\text{C}$  (Mazliak 1981). Pour des températures en-dessous de  $-3^{\circ}$  à  $-13^{\circ}\text{C}$ , le métabolisme devient pratiquement impossible dû à la forte teneur en eau de tous les tissus vivants. Par contre pour des températures dans la zone de  $37^{\circ}$  à  $47^{\circ}\text{C}$ , on peut observer une tolérance certaine du métabolisme qui mérite d'être étudiée et discutée longuement.

Un changement de température, au niveau de tout organisme vivant entraîne certaines modifications dans la structure fondamentale de ceux-ci. Toute variation de température provoque deux types de modifications très différentes: a) la vitesse des réactions biochimiques du métabolisme est modifiée, b) la structure ainsi que la composition des macromolécules cellulaires (protéines et lipides) est altérée.

Les transformations apportées au monde végétal par des températures élevées (soit entre 10°-15°C au-dessus des températures normales de croissance) sont très nombreuses. Ces modifications sont par exemple, la dénaturation de protéines, l'inactivation des enzymes, la réduction de l'activité photosynthétique du chloroplaste etc. Cette étude traitera de quelques transformations apportées par le choc thermique au niveau de l'appareil photosynthétique, puisque ce dernier constitue l'élément où les effets négatifs de températures élevées se font sentir en tout premier lieu. En particulier nous étudierons les modifications au niveau des protéines de cette membrane thylacoïdienne ainsi que l'influence du choc thermique sur l'activité photosynthétique.

La condition de stress thermique employée dans ce travail sera une augmentation de température de 17°C au-dessus de la température normale de croissance de notre espèce végétale et d'une durée de trois heures. Puisque dans cette étude nous voulons spécifiquement étudier le rôle des protéines de stress thermique (HSPs), il est alors primordial, selon les études de Glackinski en 1988 de travailler dans de telles conditions pour ainsi produire la synthèse de ces protéines.

## **1.1 Objectifs du travail**

### **1.1.1 Vérifier les modifications possibles au niveau de la membrane thylacoïdienne lors d'un choc thermique.**

Un stress thermique provoque sur les membranes photosynthétiques de grandes perturbations. Des changements conformationnels des réorganisations des membranes etc. Dans un

premier temps nous voulons observer si le fait de provoquer un stress thermique sur la plante entière, entraîne aussi des chambardements aussi considérables sur la membrane thylacoïdienne. La spectroscopie FTIR (infra-rouge par transformée de Fourier) permettra une analyse globale de la structure des protéines membranaires. Suite à ces recherches sur les modifications conformationnelles produites par la chaleur, notre intérêt se portera sur les complexes pigment-protéine et de leur sort durant un stress thermique. Une isolation des complexes sera d'abord effectuée à partir des membranes thylacoïdiennes et ensuite ils seront séparés par électrophorèse dans la but de les étudier séparément par spectroscopie d'absorption. Les transformations lipidiques apportées aussi par le stress thermique n'ont pas été étudiées dans ce présent travail, mais seulement l'apport de la partie protéique.

### **1.1.2 Vérifier la présence de HSP au niveau de la membrane thylacoïdienne.**

Un stress thermique ne provoque pas seulement des dommages aux plantes, mais entraîne aussi des réponses positives de la plante face à la chaleur en guise de protection. Entre autre la synthèse de nouvelles protéines (protéines du choc thermique). L'intérêt de ce travail porte sur cette synthèse de protéine et sur leurs fonctions encore énigmatiques. Il est tout d'abord primordial d'identifier toutes les modifications entraînées par le stress thermique au niveau de la membrane thylacoïdienne pour ensuite explorer le niveau d'implication de ces protéines.

Cet objectif consiste à vérifier l'existence d'une ou plusieurs protéines du choc thermique (HSP) au niveau de la membrane thylacoïdienne isolée de plants d'orge acclimatés à la chaleur. Pour se faire, il faut tout d'abord déterminer une température d'incubation à laquelle il y aura synthèse de ces protéines ainsi que la durée du temps

d'incubation permettant aux protéines de gagner leur site respectif. Par l'extraction des protéines de cette membrane et leur analyse par électrophorèse, il sera facile d'accéder à ce premier objectif.

### **1.1.3 Evaluer l'implication des HSP dans l'activité photosynthétique.**

Le troisième objectif fixé est d'étudier le rôle de protéines HSP (de la membrane thylacoïdienne acclimatée) au niveau des changements dans le comportement ainsi que dans l'activité de la membrane photosynthétique.

La méthode employée, pour accéder à notre but consiste en l'analyse de l'activité de l'appareil photosynthétique en termes de dégagement d'oxygène. Nous pourrions vérifier que la présence des HSP au niveau de la membrane thylacoïdienne (observée dans l'objectif précédant) permet de modifier ou de protéger l'activité photosynthétique lors d'exposition à des températures relativement élevées.

### **1.1.4 Etablir une relation entre la présence de HSP et l'acquisition de la thermotolérance.**

Cet objectif vise à établir une relation entre la présence de HSP et la résistance de la membrane photosynthétique à la chaleur.

L'utilisation d'antibiotiques spécifiques pour l'inhibition de la synthèse des protéines chloroplastiques ou nucléaires nous permettra, en plus de définir l'origine des HSP, de confirmer le rôle d'importance de ces protéines dans la thermotolérance de l'appareil photosynthétique.



## CHAPITRE 2

### APPAREIL PHOTOSYNTHÉTIQUE

La photosynthèse est le processus par lequel les plantes, algues et plusieurs espèces de bactéries utilisent l'énergie lumineuse pour générer leur propre énergie. L'équation générale du processus de la photosynthèse



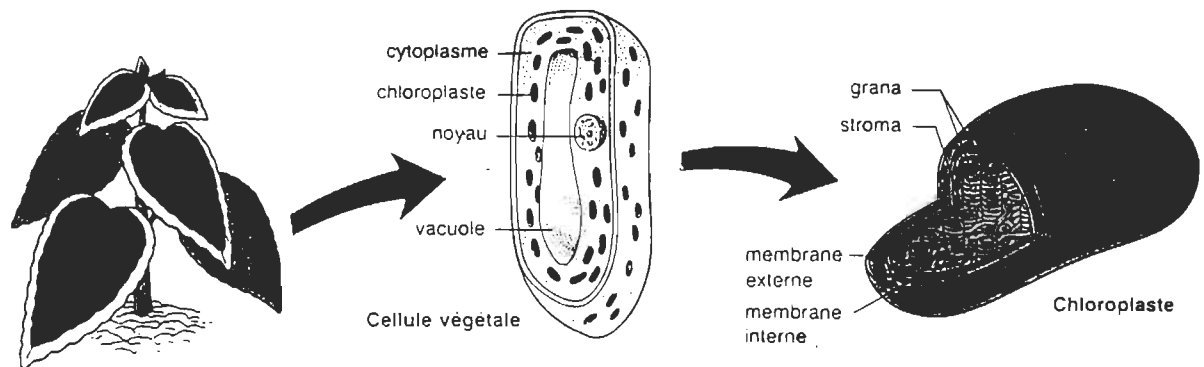
montre l'utilisation du dioxyde de carbone et de l'eau, pour la formation d'hydrate de carbone et la libération de molécules d'oxygène. Le mécanisme de la photosynthèse est relié aux membranes thylacoïdiennes qui sont séparées en deux régions spécifiques, le photosystème I (PSI) et le photosystème II (PSII). La présence de complexes de pigments et de protéines à l'intérieur de ces membranes permet le transport des électrons qui sont générés par l'absorption photonique. Ce même transport d'électrons amène la synthèse d'ATP et de NADPH nécessaires au déroulement du cycle de Calvin, et responsable de la production d'hydrates de carbone (principale source d'énergie chez les plantes).

Où se retrouve la membrane photosynthétique, comment est-elle constituée exactement et comment le transport d'électrons est-il possible au niveau de celle-ci ?



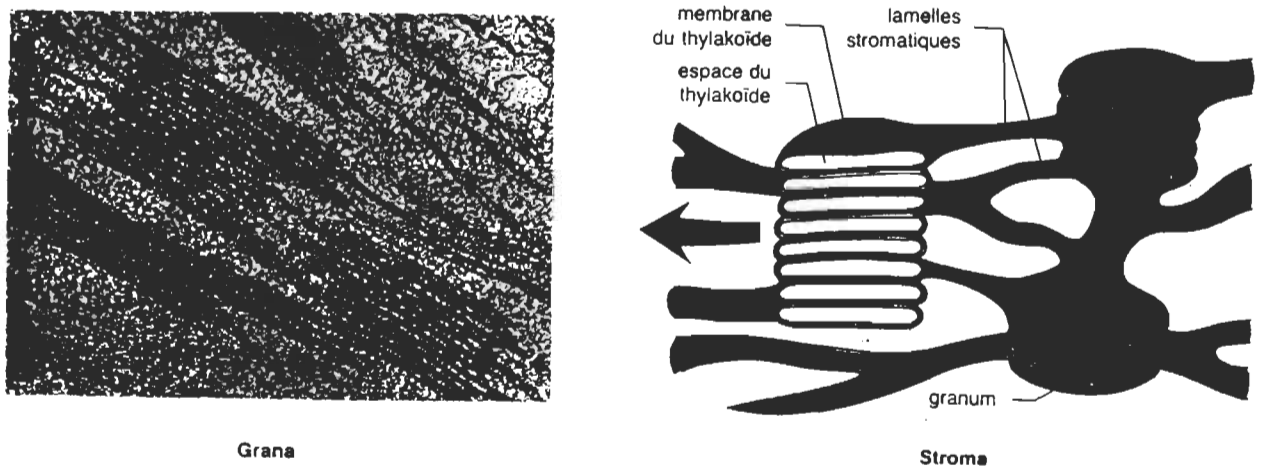
## 2.1 Le chloroplaste.

Des chloroplastes de forme et de taille différentes existent dans une variété de plantes (Kirk et Tilney-Bassett, 1978). Le chloroplaste, un organe cellulaire trouvé seulement dans les cellules des eucaryotes et les bactéries photosynthétiques, est identifié comme site d'action du processus de la photosynthèse. Cet organe est constitué d'une double membrane, qui permet un certain contrôle sur les échanges entre le cytoplasme (liquide interstitiel des cellules) et le stroma (liquide intracellulaire du chloroplaste, riche en enzymes et en amidon). La présence de pores au niveau de la membrane permet à certaines molécules, de faible poids moléculaires (10 kDa), d'avoir la possibilité de se retrouver dans le stroma du chloroplaste. Lorsque l'on observe les chloroplastes de plus près, nous pouvons constater la présence d'un système membranaire en son coeur. Ce système membranaire est appelé aussi membrane photosynthétique ou membrane thylacoïdienne et représente précisément le lieu où l'on identifie l'activité photosynthétique (Menke, 1962).



**FIGURE 1** Localisation du chloroplaste dans la cellule végétale.

Les thylacoïdes prennent généralement une forme complexe d'enchevêtrements dans lesquels existent des régions empilées, constituées de 2 ou plusieurs membranes repliées, appelées grana et des régions non empilées qui représentent une membrane simple, appelée lamelle du stroma. (Foyer, 1984)



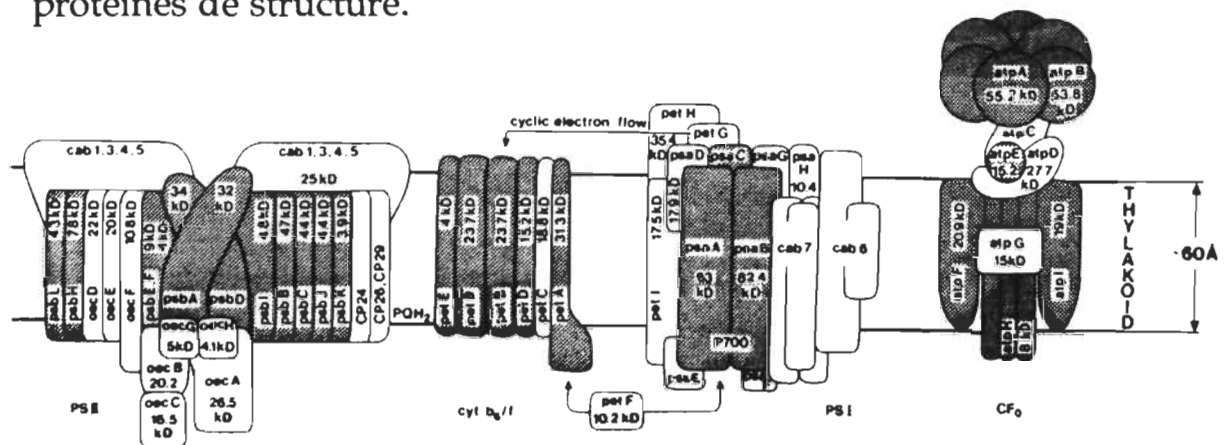
**FIGURE 2** Structure interne du chloroplaste représentant l'organisation de la membrane thylacoïdienne

## 2.2 Composition protéique, pigmentaire et lipidique de la membrane photosynthétique

Puisque l'activité photosynthétique est rattachée à cette membrane, il est primordial d'en étudier sa composition. Comme toute autre membrane, son agencement complexe est constitué de protéines, de pigments et de lipides. L'intérêt porte sur sa composition en protéines membranaires ainsi que sur sa constitution pigmentaire (ce dernier point sera traité de façon plus détaillée à la section 2.4).

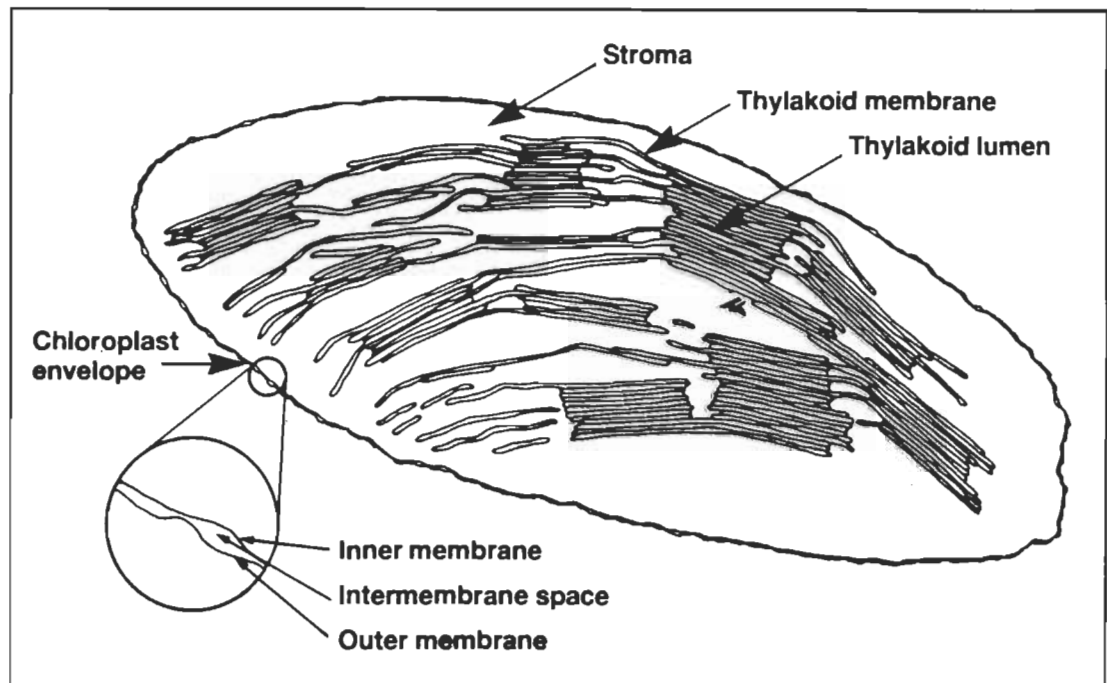
Des protéines de différentes tailles et de poids moléculaire très variés composent la membrane. Chaque protéine possède une fonction très particulière et est essentielle à l'intégrité et au fonctionnement de la membrane thylacoïdienne. Certaines sont associées aux pigments (collecteurs d'énergie), d'autres sont liées aux activités des photosystèmes, d'autres encore semblent indispensables aux accolements membranaires et d'autres enfin ont des propriétés enzymatiques très précises (réductase, ATPase etc).

La membrane thylacoïdienne est formée de protéines synthétisées soit au niveau du chloroplaste par des génomes chloroplastiques, soit au niveau du noyau. ADN, ARN, ribosomes et plusieurs enzymes se retrouvent dans le chloroplaste et constituent tout le matériel nécessaire pour la synthèse des protéines. Toutes ces molécules sont présentes dans le stroma lors de la transcription et la translation. Le chloroplaste possède 85 gènes pour la transcription et translation de protéines, par contre cela n'est pas suffisant et plusieurs protéines de la membrane thylacoïdienne sont codées par les gènes nucléaires (Steinback et al., 1985; Murphy et Thompson, 1988). Une représentation de la membrane nous indique l'origine de chacune des protéines de structure.



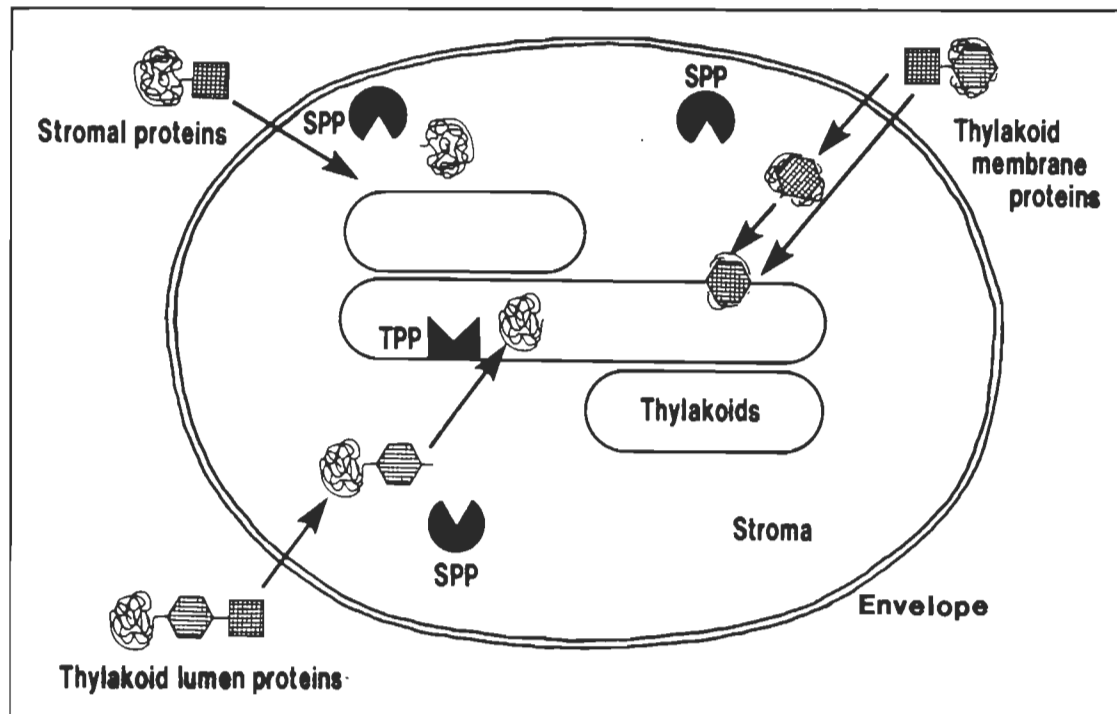
**FIGURE 3** Composition et origine des protéines de la membrane thylacoïdienne. Les protéines ombragées sont d'origine chloroplastique et celles claires d'origine nucléaire (Simpson et Von Wettstein, 1989).

Certains chercheurs (Chua et Schmidt, 1978; Schmidt et al., 1980) démontrèrent que ces protéines, synthétisées par le génome nucléaire, sont importées, après synthèse dans le chloroplaste. Ce transfert des protéines, du cytoplasme vers le stroma du chloroplaste, implique nécessairement l'existence de récepteurs très complexes, localisés sur la membrane du chloroplaste et responsables de la reconnaissance des protéines et de leur transport (Douce et Joyard, 1979; Pfisterer et al., 1982). Les protéines, destinées au chloroplaste et synthétisées par le noyau, ont deux membranes à traverser, soit celles qui délimitent le chloroplaste. Certaines protéines doivent de plus traverser une troisième membrane, celle du thylacoïde, avant d'atteindre la localisation finale (Weisbeek et al., 1991).



**FIGURE 4** Représentation de l'enveloppe du chloroplaste ainsi que de sa structure interne. (Smeekens et al., 1990)

Les protéines venant du cytosol et destinées au chloroplaste peuvent être orientées vers différents compartiments de l'organe. Certaines sont promises au stroma, d'autres sont des protéines pour la membrane thylacoïdienne, d'autres encore sont vouées au lumen.



**FIGURE 5** Mécanisme illustrant le transport des protéines d'origine nucléaire à l'intérieur du chloroplaste. Une protéine précurseur est nécessaire pour l'importation du polypeptide dans le stroma (représentée par le carré). Cette protéine sera enlevée par une peptidase du stroma (SPP). Les polypeptides destinées à la partie luménale du thylacoïde contient une information additionnelle localisée sur le N-terminal (représenté par un hexagone) essentielle à la translocation de la membrane thylacoïdienne. Cette partie sera elle aussi enlevée par une peptidase du thylacoïde (TPP) (Smeenkens et al., 1990).

La plupart des protéines étudiées qui vont vers le chloroplaste, sont précédées d'une protéine ayant un N-terminal de transition, pour l'adhésion au niveau de l'enveloppe. Ce peptide de transition contient toute l'information nécessaire à l'exportation vers l'organite. Une fois la protéine arrivée à destination, ce précurseur est éliminé par des peptidases du stroma. D'autres protéines, orientées vers la membrane ou vers le lumen possèdent de l'information supplémentaire essentielle pour la translocation de la membrane thylacoïdienne, ce précurseur sera aussi éliminé par des peptidases du thylacoïde.

La partie pigmentaire, se compose de photorécepteurs (ou pigments photosynthétiques), capables de transférer la photoénergie aux centres réactionnels des photosystèmes. La plupart, soit 99% de ces pigments contenus dans la membrane photosynthétique jouent le rôle de collecteur d'énergie lumineuse. Cette absorption de l'énergie sera traitée plus en détail à la partie 2.4.

Les plantes vertes possèdent des pigments photosynthétiques, les chlorophylles a et b, ainsi que des caroténoïdes (les carotènes et les xanthophylles). C'est la chlorophylle-a qui est directement impliquée dans la capture de la lumière tandis que les caroténoïdes sont considérés comme protecteurs des chlorophylles (Yamamoto , 1979).

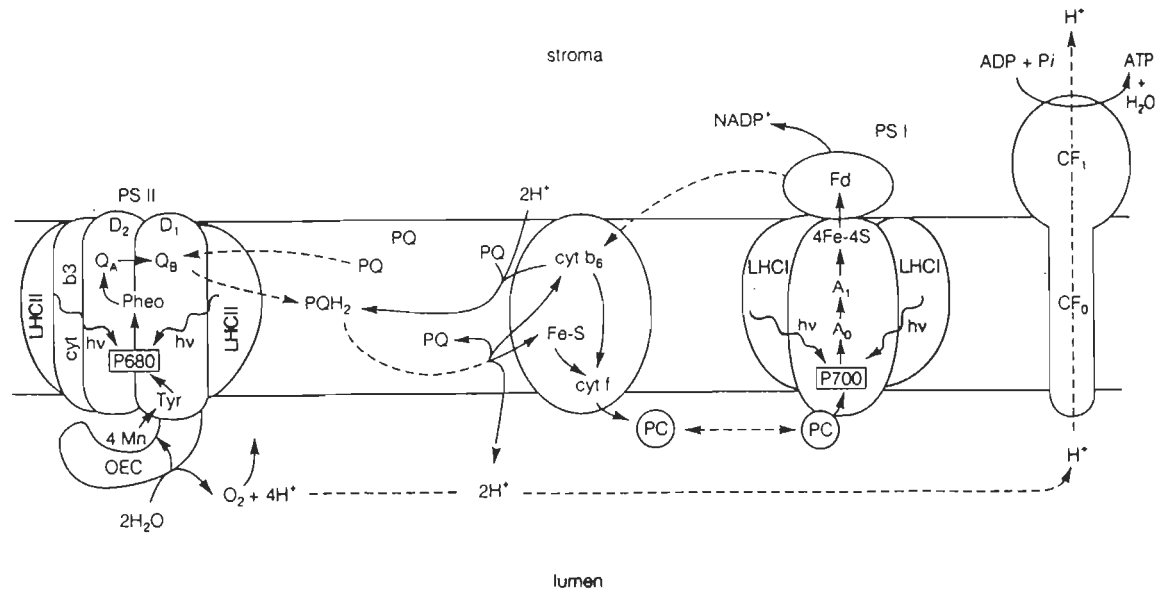
La partie lipidique est constituée de deux sortes de galactolipides dans des proportions de 2:1, soit le monogalactosyldiglycérade (MGDG) et le digalactosyldiglycérade (DGDG). La phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidylglycérol (PG), y sont aussi présentes dans un rapport de 1:3. Le rôle des lipides membranaires est fondamental, puisqu'il permet de maintenir une conformation définie et une orientation particulière des protéines (Siegenthaler et Rawler, 1986)



De telles molécules (protéines, pigments et lipides) possèdent des propriétés de solubilité, de polarisation et de conformation qui permettent un arrangement complexe et structuré, constituant le centre même du phénomène fondamental de la photosynthèse.

### **2.3 Organisation de la membrane thylacoïdienne**

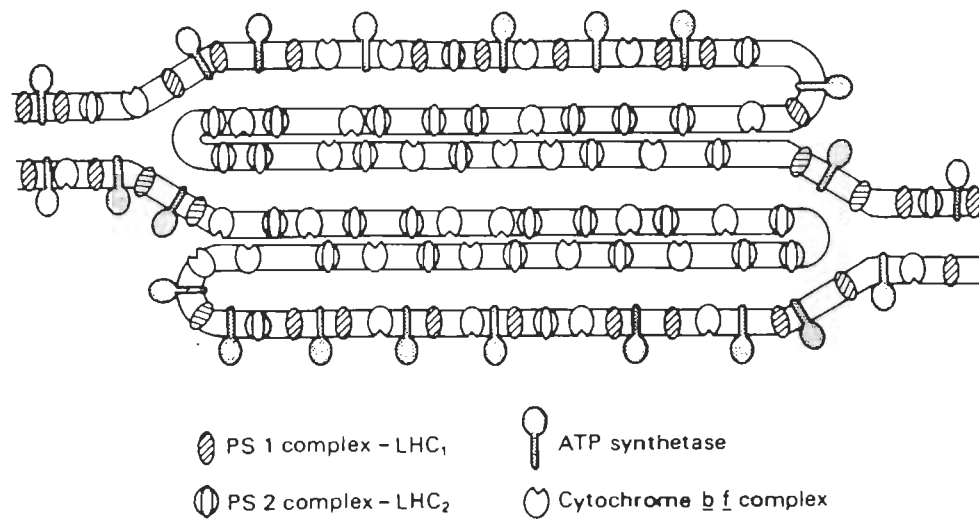
La membrane photosynthétique forme six complexes de polypeptides et de chlorophylles, soit le facteur de couplage  $CF_0CF_1$  (ATP synthétase), le cytochrome  $b_6/f$ , le centre réactionnel du photosystème I (PSI), le centre réactionnel du photosystème II (PSII), le complexe collecteur de lumière du PSI (LHCI) et le complexe collecteur de lumière du PSII (LHCII) (Lagoutte et Mathis, 1989; Govindjee et Coleman, 1990). Le rôle des deux complexes collecteurs de lumière est d'absorber l'énergie lumineuse. Une fois cette énergie captée, elle sera canalisée au niveau des photosystèmes PSI et PSII pour ainsi amorcer les réactions photochimiques. Les complexes peuvent être étudiés séparément, puisqu'ils sont stables en l'absence d'un ou de plusieurs autres complexes. Puisque l'étude se rapporte à l'activité photosynthétique et au dégagement d'oxygène, il est donc important d'orienter notre réflexion sur le PSII et le PSI. Ces deux photosystèmes sont de taille et de composition différentes, ce sont des regroupements de protéines et de pigments impliqués dans la capture de l'énergie ainsi que dans le transport d'électrons.



**FIGURE 6** Schématisation des complexes polypeptidiques constituant la membrane thylacoïdienne, soit le photosystème I, le complexe cytochrome  $b_6/f$ , le photosystème II et le complexe collecteur de lumière. (Hader et Tevini, 1987)

Les deux photosystèmes se trouvent distribués de façon non aléatoire au niveau de la membrane. Une étude en microscopie électronique fait constater que les PSI et les PSII ne sont pas dans des proportions de 1:1 et qu'ils sont distribués dans des régions bien précises de la membrane thylacoïdienne (Anderson et Anderson, 1981). Les lamelles du stroma, soit la région non empilée, contiennent, une quantité importante de photosystème I, et seulement entre 10 et 20% des complexes de PSII. Contrairement, les régions empilées sont enrichies en PSII et pauvres en complexes de PSI (Foyer, 1984). La partie expérimentale, de ce présent travail, se fera sur la membrane complète du thylacoïde, soit en présence de grana et de lamelle du stroma.





**FIGURE 7** Localisation sur la membrane thylacoïdienne des photosystèmes I et II ainsi que des complexes, collecteur de lumière et cytochrome b<sub>6</sub>/f

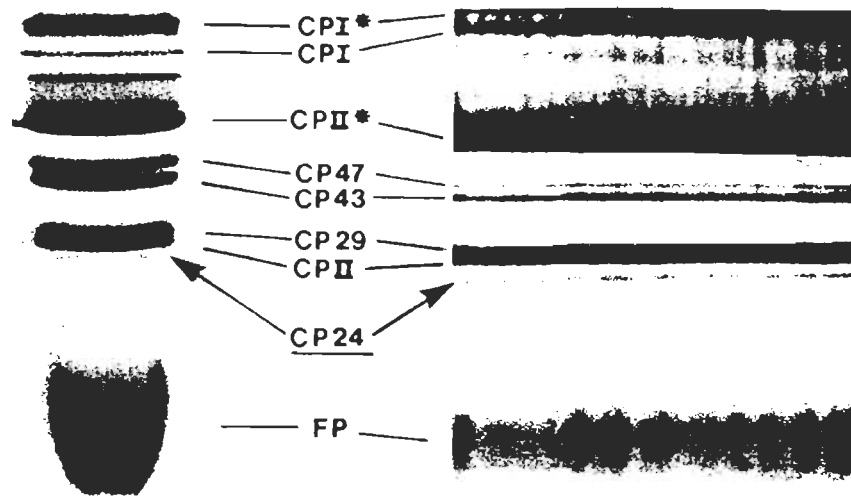
## 2.4 Structure des complexes pigmentaires

Les études en microscopie électronique ne donnent aucune information relative à l'organisation des pigments sur la membrane thylacoïdienne. Cependant d'autres techniques démontrent que les chlorophylles sont intégrées aux thylacoïdes en étant rattachées par des liaisons covalentes (hydrophobes) à des protéines (Junge, 1977). Le regroupement donne naissance à des complexes pigments-protéines qui sont le lieu où l'absorption de la lumière et de la conversion de l'énergie se produisent (Thornber, 1986).

La présence des chlorophylles permet de distinguer les complexes. Certains sont constitués de chlorophylle-a uniquement tandis que d'autres possèdent les chlorophylles a/b. Il y a aussi distinction des complexes par la composition en protéine. Ces protéines ont des poids moléculaires différents et sont d'origine diverses (chloroplastique ou nucléaire). Les complexes qui sont en relation directe avec le centre réactionnel, sont composés de chlorophylle-a et associés à des polypeptides, d'origine chloroplastique et de poids moléculaires variant entre 32-67 kDa (Machold, 1983). Les complexes de chlorophylles a/b, des complexes collecteurs de lumière, sont associés à des protéines d'origine nucléaire de poids moléculaires entre 20-30 kDa (Schmidt et al., 1981). L'étude des complexes pigments-protéines de la membrane thylacoïdienne est accessible puisqu'il est possible de les isoler, par l'ajout d'agents de surface actifs soit des détergents et ensuite les analyser par méthode électrophorétique, (dû à la différence des poids moléculaires des constituants).

Dans certaines conditions de solubilisation de la membrane, il est possible de retrouver par des méthodes de séparation électrophorétique jusqu'à 10 complexes pigments-protéines (Anderson et al., 1978; Camm et Green, 1980; Dunahay et Staehelin, 1984) (Figure 8)

L'isolation des complexes a donné naissance à plusieurs études qui ont portées sur les spectres d'absorption des chlorophylles (Anderson et al., 1978). L'attachement des chlorophylles aux protéines donne des spectres dont le maximum d'absorption est distinctif pour chaque type de complexe. Une perturbation de l'environnement entraîne des déplacements des maxima sur les spectres d'absorption (Miller et Carpentier, 1991).



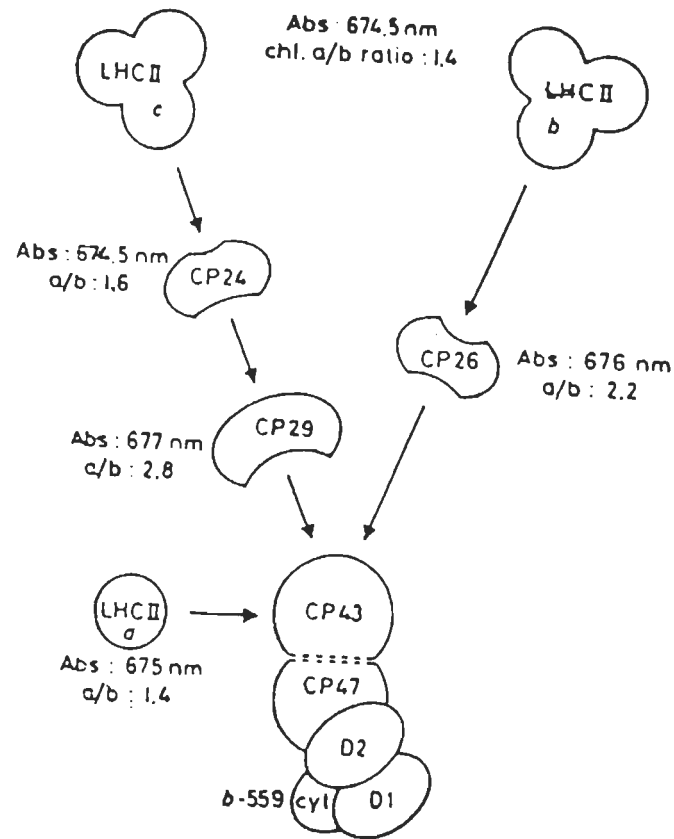
**FIGURE 8** Représentation des complexes pigment-protéine isolés de la membrane thylacoïdienne d'épinard sur gel d'électrophorèse non dénaturant. Les complexes protéiques (CP) dont CPI et CPI\* représente deux forme du complexe PSI, CPII et CPII\* sont des formes monomériques et oligomériques à partir des Chl a/b du light harvesting complexe. Les complexes CP47 et CP43 sont respectivement associés avec le centre réactionnel du PSII et avec l'antenne "interne" du PSII. Les complexes CP29 et CP24 sont aussi des complexes protéine-chlorophylle a/b ayant comme fonction d'être l'antenne du PSII. Les pigments libres sont représentés par FP (free pigment) (Dunanay et Staehelin, 1986).

Chaque complexe est rattaché soit aux centres réactionnels ou aux centres collecteurs de lumière de l'un ou l'autre des photosystèmes (PSI ou PSII) (**Tableau 1**).

**TABLEAU 1** Nomenclature des complexes pigment-protéine des plantes photosynthétiques. (Thornber et al., 1987)

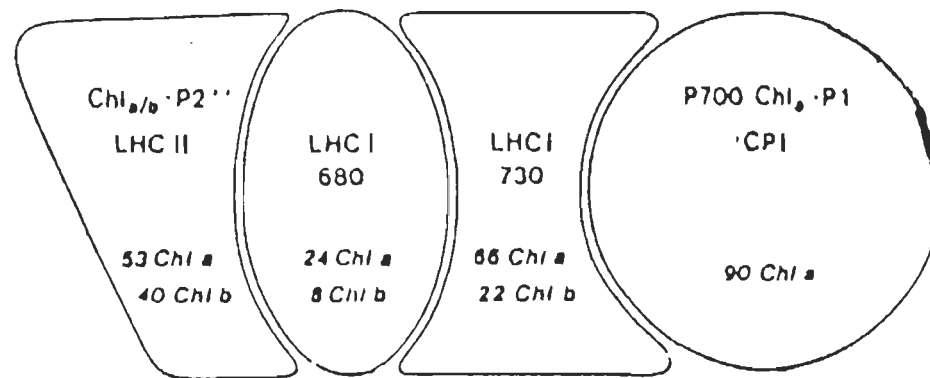
		Other names for complex:
PS I	CC I	{ CPI; PSI-65; Chl <sub>a</sub> -P1; P700-Chl <i>a</i> -protein; PSI reaction center;
	LHC I	
		CP O
PS II	CC II	CP III; CP47; Chl <sub>a</sub> -P2 CP IV; CP43; Chl <sub>a</sub> -P3
	CC II-RC	
	CC II $\alpha$	
	CC II $\beta$	CP29; Chl <sub>a/b</sub> -P1 { CP II; LHCP; LHC; Chl <sub>a/b</sub> -P2; Light-harvesting Chl <i>a/b</i> -protein
	LHC II	
	LHC II $\alpha$	
	LHC II $\beta$	CP24
	LHC II $\gamma$	

Ce sont les collecteurs de lumière CCLI et CCLII (LHCI et LHCII), en particulier les pigments de chlorophylle-a, qui sont responsables de l'absorption lumineuse. Ensuite l'énergie est transmise aux centres réactionnels. A ce niveau les chlorophylles-a de ces centres absorbent à 700 nm pour le complexe de PSI et à 680 nm pour le PSII. La propagation de l'énergie venant des collecteurs de lumière (CCL) et allant vers les centres réactionnels est différente pour les PSI comparativement aux PSII. Le CCL du PSII est formé de chlorophylles a/b pour la capture de l'énergie. Sa fonction est de distribuer cette énergie vers le centre réactionnel P<sub>680</sub> par des complexes pigmentaires intermédiaires comme le CP29, le CP26 et le CP24. L'énergie est alors transférée aux complexes CP43 et CP47 qui sont eux associés directement au centre réactionnel du PSII (P<sub>680</sub>).



**FIGURE 9** Représentation du complexe collecteur de lumière du PSII. (Bassi et al., 1990)

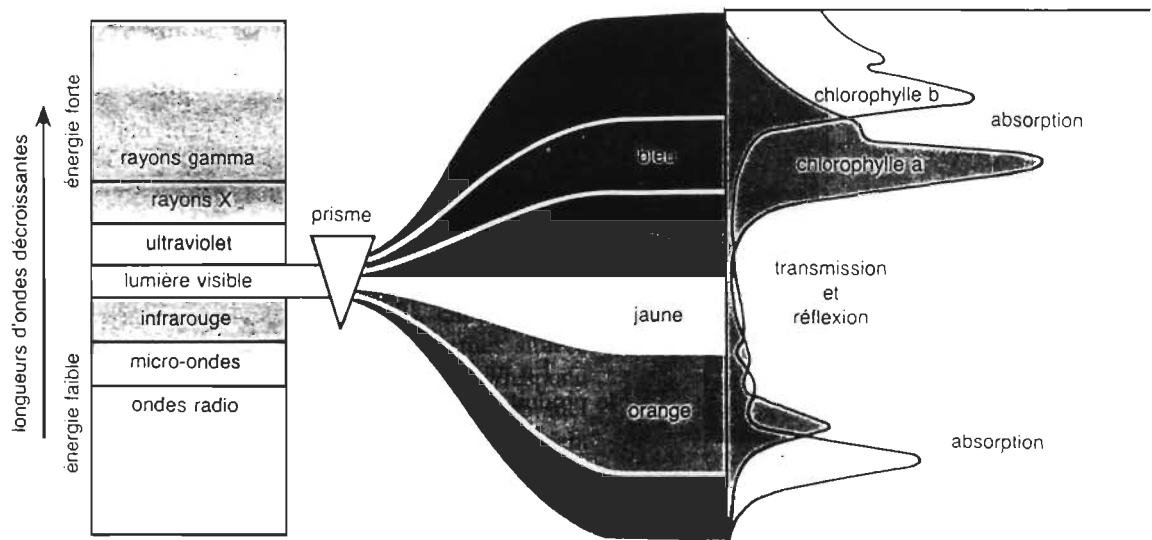
Pour le PSI, les collecteurs de lumière (CCLI) sont en contact direct avec ceux du PSII (CCLII). Une fois l'énergie captée par les CCI, elle est canalisée vers le centre réactionnel du PSI (CPI) pour permettre la continuité du transport d'électrons ( voir section 2.5 ).



**FIGURE 10** Représentation du complexe collecteur de lumière du PSI. (Bassi et al., 1990)

## 2.5 Chaîne de transport d'électrons.

Pour comprendre comment la lumière entraîne le transport d'électrons et ainsi conduit au phénomène de la photosynthèse, il faut d'abord connaître ses propriétés. Cette lumière se compose de particules (quanta ou photons) qui sont associées à des longueurs d'onde spécifiques. Une partie de ce spectre électromagnétique est constituée de la lumière visible (à l'œil) soit entre 390 et 760 nm. Seulement une faible portion de cette lumière visible peut être absorbée par la chlorophylle. Le spectre d'absorption des chlorophylles a et b montre une très faible absorption de la lumière verte (jaune/vert) entre 500 et 600 nm et une forte absorption de la lumière violette, bleue, orange et rouge.



**FIGURE 11** Représentation du spectre d'absorption des pigments de chlorophylle a et b.

Selon le principe de l'absorption de la lumière (appelé la loi de Stark Einstein) chaque molécule peut absorber un seul photon qui cause l'excitation d'un seul électron. Ainsi la molécule de pigment passe d'un état stable (ou fondamental) à un état excité. L'énergie de cette excitation est utilisée pour la photosynthèse, elle est captée et ensuite acheminée vers d'autres molécules voisines (Sauer, 1979).

Ce mécanisme photosynthétique peut se diviser en 5 phases ou étapes.

- 1 : Absorption lumineuse
- 2 : Photolyse de l'eau
- 3 : Transport d'électrons
- 4 : Photophosphorylation
- 5 : Fixation du dioxyde de carbone

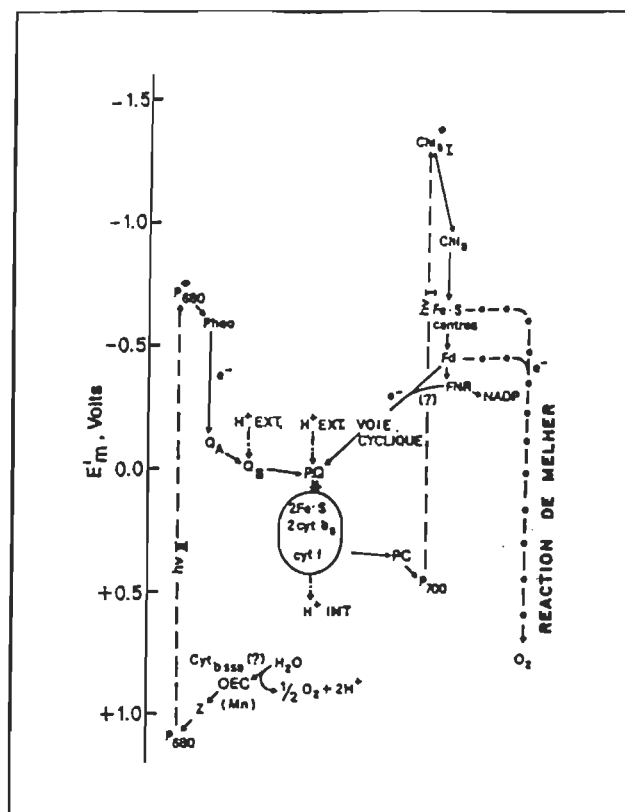
1. Premièrement la lumière est absorbée par les pigments photosynthétiques des photosystèmes et transférée à leur centre réactionnel, P<sub>700</sub> pour le PSI et P<sub>680</sub> pour le PSII où la lumière est convertie en énergie chimique.

2. Cette énergie permet par la suite le clivage d'une molécule d'eau. La photolyse de l'eau permet de libérer quatre électrons, quatre protons et une molécule d'oxygène (facilement détectable).



3. Depuis longtemps les grandes lignes du fonctionnement du mécanisme de transport d'électrons ont été tracées. Les transferts du PSII vers le PSI, via une série de transporteurs, sont généralement représentés par le schéma en "Z" (Hill, 1960) (**Figure 12**).





**FIGURE 12** Représentation du transport d'électrons selon le schéma en Z.

Les électrons arrachés aux molécules d'eau sont transférés d'un intermédiaire à l'autre, par des molécules qui ont des propriétés d'oxydo-réduction et qui se comportent comme des agents de transfert de charges électriques, pour arriver finalement à un accepteur d'électrons, le  $NADP^+$  qui donne la forme réduite  $NADP^-$  ( $NADPH$ ).

4. Le processus de photophosphorylation permet la synthèse de l'ATP par l'action de l'ATP-synthétase.

5. Le mécanisme de fixation du carbone, est le processus par lequel le dioxyde de carbone est fixé et réduit avec l'utilisation de l'ATP et du NADPH. Les processus réactionnels 1 à 4 ont lieu au niveau de la membrane thylacoïdienne et sont associés à la phase lumineuse. Par contre la fixation du  $\text{CO}_2$  se fait au niveau du stroma et est associée à la phase obscure.

## CHAPITRE 3

### STRESS THERMIQUE

Les biologistes ont été longtemps fascinés par la croissance de certains organismes végétaux dans des conditions désertiques, à des températures très élevées (Brock, 1978; Aragno, 1981). Les plantes sont généralement sensibles à des changements de quelques degrés seulement au-dessus ou au-dessous de leur température de croissance qui est très élevée pour les plantes désertiques ou relativement plus faible chez les plantes retrouvées dans les régions tempérées. Chaque espèce ou variété de plante possède une température minimale au-dessous de laquelle la croissance est impossible, une température optimale qui représente la température idéale de croissance, une température maximale au-dessus de laquelle la croissance est interrompue et qui peut même entraîner la mort de la plante. Si nous nous rapprochons de ces températures maximales, les espèces végétales seront dans des conditions de choc thermique.

Il est important de préciser ce que nous considérons, dans cette étude, comme choc thermique pour le matériel végétal étudié. Bien entendu, une faible variation de température seulement peut influencer la biochimie des cellules et ainsi être considérée comme étant un stress thermique. D'un autre côté, une augmentation de température de 10° à 15°C au-dessus de la température ambiante de croissance entraîne des modifications au développement habituel de la plante et ceci sans être dans des conditions létales: cela constitue le stress thermique.

### 3.1 Conséquences d'un choc thermique

Un changement de température bouleverse la croissance des organismes végétaux dont le métabolisme est modifié pour faire face à cette agression. La stratégie choisie par un organisme vivant pour s'adapter aux changements de température dépend énormément du temps pendant lequel se déroule la variation de température, soit le choc thermique (Mazliak, 1981).

Si la variation est graduelle, continue et relativement lente, l'organisme développe une stratégie d'adaptation à long terme: il peut changer la quantité de certains enzymes, varier l'importance de certains pools métaboliques, modifier la constitution de ses biomembranes (autant lipidique que protéique), etc.

Si la variation est brusque, l'organisme ne peut mettre en jeu qu'un faible nombre de réactions d'ordre physico-chimique qui interviennent essentiellement au niveau des liaisons faibles: changements dans la structure tertiaire et quaternaire des protéines, modifications de la fluidité des membranes, altérations des complexes pigmentaires et/ou synthèse rapide de nouvelles protéines, appelées protéines du choc thermique (HSP).

#### 3.1.1 Changements structuraux au niveau de la membrane thylacoïdienne

L'exposition de matériel végétal aux températures élevées a démontré des perturbations fonctionnelles et structurales irréversibles à la membrane thylacoïdienne. (Al-Khatib et Wiest, 1990; Mukohata et Yagi, 1973a,b; Krause et Santarius, 1975; Santarius, 1975; Gounaris et al., 1983, 1984)

En général, lors d'un choc thermique, il y a des changements dans la stabilité, la composition et la fonction du plasma et de la membrane thylacoïdienne (Benzioni et Itai, 1973; Klein et Ferguson, 1987; Süss et Yordanov, 1986; Wu et Wallner, 1984). L'exposition à des températures élevées perturbe la structure du thylacoïde en diversifiant directement ou indirectement les protéines membranaires (Thomas et al., 1986; Wiest, 1986), en perturbant l'organisation lipidique (Gounaris et al., 1983) et en déstabilisant les interactions lipide-protéine.

Certaines études démontrent, comme conséquences physiologiques d'un choc thermique, une diminution de l'activité photosynthétique du chloroplaste (Berry et Bjorkman, 1980), tout en conservant par contre l'intégrité de l'enveloppe de cet organe (Krause et Santarius, 1975). Les études analysant l'influence de la température sur l'activité photosynthétique, et plus précisément sur la fixation du  $\text{CO}_2$ , démontrent une diminution graduelle de la photosynthèse avec l'augmentation de la température (Bauer et al., 1975; Berry et Bjorkman, 1980). En général (tout dépend de l'espèce à l'étude), il y a une certaine protection de l'activité photosynthétique allant jusqu'à des températures de  $30^\circ\text{C}$ , pour entraîner, par la suite, une diminution de l'activité en fonction de l'augmentation de la température et ainsi atteindre l'inhibition à  $40^\circ\text{C}$  (Bar-Tsur et al., 1985). D'autres observations indiquent que la membrane thylacoïdienne (qui est le centre de l'activité photosynthétique), retrouvée à l'intérieur du chloroplaste, semble un peu moins sensible à l'exposition à la chaleur comparativement à une membrane complètement isolée de son milieu car, sous des conditions de stress thermique, les thylacoïdes isolés du chloroplaste amènent une inactivation totale du transport d'électrons ainsi que de la photophosphorylation cyclique (Santarius, 1973). Cette différence de stabilité entre la membrane isolée et in-vivo peut-être expliquée en

supposant que les composants du le stroma du chloroplaste jouent un rôle dans la protection du thylacoïde lors de l'acclimatation à la chaleur (Krause et Santarius, 1975). Malgré tout, cette membrane demeure extrêmement sensible à la chaleur; que celle-ci soit analysée chez la plante entière ou encore totalement isolée, il y a diminution de l'activité photosynthétique. Mais comment cette membrane est-elle perturbée et à quel niveau?

Le premier site éprouvé par un choc thermique est la membrane thylacoïdienne et plus particulièrement le PSII, qui est le photosystème le plus sensible à l'effet de la chaleur (Mohanty, 1987). Par contre, le PSI est considéré comme résistant à toute élévation de température (Sabat et Mohanty, 1989; Boucher et al., 1990; Boucher et Carpentier, 1992). La susceptibilité du PSII face à un traitement à la chaleur est provoquée par une inactivation du complexe de dégagement d'oxygène (incapacité de réaliser la photolyse de l'eau). Les travaux du Dr Sabat réalisés en 1986, démontrent que le complexe de dégagement d'oxygène est relativement plus sensible à l'effet de la chaleur que la chaîne entière de transport d'électrons. Ainsi, par l'utilisation de donneurs artificiels d'électrons, comme le 1,5-diphenylcarbazine ou l'ascorbate, il est possible de rétablir le transport d'électrons malgré l'inhibition créée par un stress thermique (Sabat et al., 1986). D'autres travaux sur le sujet indiquent que le complexe antennique du PSII est particulièrement susceptible aux dommages thermiques (Krause et Santarius, 1975; Schreiber et Berry, 1977). Ces transformations de l'appareil photosynthétique au niveau du PSII sont étudiées par fluorescence de la chlorophylle. Il a été observé que la fluorescence émise par la chlorophylle décroissait lorsque les chloroplastes étaient traités à des températures allant de 20-48°C. Cette fluorescence apporte de l'information directe sur l'aspect énergétique de la membrane. Lorsque  $Q_A$  est sous forme réduite, la fluorescence est élevée tandis que sous l'état oxydé, il y a une baisse de cette fluorescence. Ainsi, par l'étude de fluorescence, il a été affirmé que l'effet de température provoque une baisse de la fluorescence de la

Chl-a associée au PSII, qui indique alors une inhibition directe au niveau de ce photosystème (Schreiber et Armond, 1978; Downton et Berry, 1982; Bilger et Schreiber, 1990). Les travaux de Havaux réalisés en 1991, démontrèrent une inhibition de l'activité du PSII (analyse du dégagement d'oxygène) et par contre une certaine stimulation du PSI, dû à une redistribution de l'énergie en faveur de ce photosystème (PSI), lors d'une exposition à la chaleur. Ces études confirment ainsi les travaux précédents (Ivanov et Velitchkova, 1990; Velitchkova et al., 1989; Stidham et al., 1982; Armond et al., 1978). L'intérêt de ses recherches s'est orienté vers l'implication de la lumière lors du stress thermique (Havaux et al., 1991). L'interprétation du rôle de la lumière lors d'un choc thermique a été modifiée plus d'une fois. Les premières études sur des chloroplastes isolés, incubés à de hautes températures, ont indiqué que la présence de lumière produit des effets nuisibles sur la chaîne de transport d'électrons (Ageeva, 1977). Selon Havaux, la présence de lumière ( $30 \text{ W.m}^{-2}$ ) interagit avec la réponse des photosystèmes et protège l'activité photochimique contre l'effet de la chaleur. Le stress thermique, à la noirceur, augmente la capacité du transport cyclique d'électrons au niveau du PSI et diminue l'activité du PSII. Par contre, une illumination des plantes lors d'un stress thermique réduit la stimulation du transport cyclique et permet ainsi au PSII de s'activer (Havaux et al., 1991)

Le stress thermique est habituellement accompagné d'une combinaison d'autres stress comme le stress à la lumière (selon l'intensité lumineuse) ou encore le stress hydrique, comme on en retrouve dans certains climats désertiques. De récents travaux publiés en 1992 par Havaux, montrent que le stress hydrique au niveau des plantes intactes, intensifie considérablement la résistance du PSII aux stress thermiques et cela en présence ou en l'absence de lumière (Havaux, 1992). Mais comment le stress hydrique conduit-il à une protection du PSII face aux dommages que provoque le stress thermique? Le stress hydrique augmenterait la stabilité du PSII à la chaleur par le renforcement des interactions entre les protéines du

PSII et les lipides environnants. Cette hypothèse repose sur certaines autres études traitant uniquement du stress hydrique. Cette condition de stress altérerait la composition lipidique de la membrane thylacoïdienne (Ferrari-Iliou et al., 1984; Prabha et al., 1985).

L'implication des lipides lors du stress thermique fera l'objet de la prochaine section.

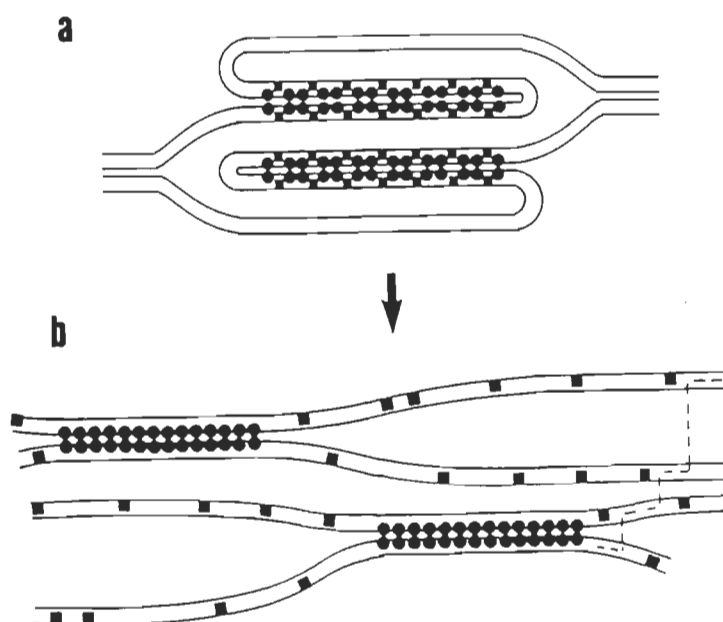
### 3.1.2 Altération de la composition lipidique du thylacoïde:

Les fluctuations thermiques créent des variations de la fluidité membranaire liées aux changements d'état physique (séparation de phases, transitions d'un état ordonné vers un état désordonné des lipides) (Mazliak, 1981). Ces changements sont causés par le degré de saturation des lipides dans la membrane chloroplastique (Pearcy, 1978; Raison et al., 1982).

Certaines études ont démontré qu'un choc thermique provoque une décroissance du rapport monogalactosyl diacylglycérol (MGDG) / digalactosyl diacylglycérol (DGDG) et augmente l'incorporation de DGDG (avec acides gras saturés) au niveau du thylacoïde. Il y a alors décroissance de la fluidité membranaire et, de ce fait, décroissance de la perméabilité passive des ions dans les membranes (Süss et Yordanov, 1986).

La morphologie normale de la membrane thylacoïdienne, en des empilements que l'on nomme grana, résiste jusqu'à une température de 35°C. Entre 35° et 45°C, Gounaris et al. (1983,1984) ont montré que l'incubation de chloroplastes cause un désempliment complet des grana et l'apparition de sites d'attachement entre les surfaces membranaires (Sundbdy et Andersson, 1985) (**Figure 14**).





**Figure 13** Modèle illustrant l'effet de la dissociation du complexe collecteur de lumière du photosystème II (LHCII) lors de l'organisation de la membrane dans des conditions de stress thermique. Le PSI n'est pas représenté sur ce schéma pour des raisons de clarté, (●) représente les complexes collecteurs de lumière, (■) les protéines du centre réactionnel du PSII (Gounaris et al., 1984)

Un échauffement des membranes provoque une augmentation de l'énergie cinétique moyenne des molécules, une rupture des liaisons hydrogènes, une transition de l'état de gel-cristallin vers un état désordonné (fluide) des chaînes aliphatiques et un renforcement des liaisons hydrophobes. Heureusement les membranes biologiques ne contiennent pas seulement qu'une espèce de lipide (ou phospholipide) mais plutôt plusieurs types de lipides qui se différencient par leurs têtes polaires et par leurs chaînes aliphatiques, ce qui permet l'intégrité possible de ces membranes (Mazliak, 1981; Süß et Yordanov, 1986). Toujours selon les travaux de Gounaris réalisés en 1984, s'il y a diminution de l'activité photosynthétique durant un stress thermique (voir section 3.1.1) c'est principalement dû à une réorganisation structurale de la membrane thylacoïdienne résultant d'un désempliment des grana (dissociation ainsi du complexe collecteur de lumière au niveau du PSII), suite aux modifications des lipides formant la structure membranaire.

Pour la protection de la membrane face à ces modifications lipidiques apportées par le stress thermique, certains chercheurs ont observé qu'une hydrogénation de la membrane thylacoïdienne entraîne une résistance thermique de cette membrane en empêchant d'éventuels "désempliments" des grana. Ainsi, l'augmentation des lipides saturés au niveau du thylacoïde stabilise le PSII face au stress thermique (Thomas et al., 1986; Vigh et al., 1989). D'autres études ont démontré que la présence de sucre, selon la concentration et le type de sucre, protège la membrane thylacoïdienne (isolée) durant le stress thermique (Back et al. 1979; Santarius et Bauer, 1983; Al-khatib et Wiest, 1990). La stabilisation de la membrane à la chaleur est possible via un effet d'orientation des molécules d'eau qui augmentent la résistance des interactions hydrophobes de la membrane.

L'acclimatation ou les modifications des plantes à différentes températures élevées de croissance résulte, selon toutes les études analysées précédemment, en un changement dans la saturation

des lipides de la membrane thylacoïdienne et/ou en un changement dans les rapports lipides-protéines de cette membrane (Chapman et al., 1983) qui entraîne une désorganisation de la membrane (Al-Khatib et Wiest, 1990).

### **3.1.3 Modifications possibles au niveau des complexes pigmentaires:**

Comme déjà mentionné auparavant, l'exposition de feuilles ou de chloroplastes à des températures au-dessus de 40-45°C amène une perte quasi totale de l'activité photosynthétique. L'étude de l'émission de fluorescence de la chlorophylle-a sous de telles conditions de stress indique que le complexe collecteur de lumière (CCL ou LHCI) et le centre réactionnel du PSII sont particulièrement susceptibles aux dommages thermiques (Armond et al, 1978; Schreiber et al., 1976; 1977; 1978). Ces études démontrent que des températures élevées conduisent à une réorganisation fonctionnelle irréversible du CCL au niveau du PSII.

De plus, une incubation des chloroplastes à des températures élevées en présence de lumière cause, selon certaines études un blanchiment sélectif des pigments photosynthétiques (Gounaris et al., 1983; Thomas et al., 1984). Selon les études de Gounaris réalisées en 1983, l'exposition des chloroplastes au stress thermique (à 40°C) en présence de lumière conduit à un "blanchiment" substantiel dans les régions rouges et bleues du spectre. En absence de lumière le spectre d'absorption montre des maxima à 440, 490 et 680 nm. La perte d'absorption à 680 nm (stress en présence de lumière) reflète un "blanchiment" de la chl-a associée au P700 (principal complexe du PSI), lequel possède son maximum d'absorption dans cette région de longueurs d'ondes (Thornber, 1975). La chl-b, possédant son maximum d'absorption à 650 nm, ne présente aucun

signe de "blanchiment" qui laisserait supposer que le complexe collecteur de lumière (LHC), associé au PSII, serait touché dans ces conditions de stress. Ce résultat est en corrélation avec les travaux de Havaux vus précédemment et qui annoncent que le PSII est protégé durant le stress thermique par la présence de la lumière.

### 3.1.4 Synthèse des protéines de choc thermique:

En 1962, Ritossa rapporte, suite à des études sur la *Drosophila*, qu'un choc thermique entraîne l'activation de différents gènes, ce qui conduit à la synthèse de plusieurs protéines. En 1974, toujours en utilisant la *Drosophila*, Tissieres et ses collaborateurs ont démontré pour la première fois la formation de protéines correspondant à un choc thermique, soit les protéines de choc thermique ou HSP (Nover et al., 1989). Il fut également prouvé que tous les organismes produisent ces protéines spécifiques (HSP) en réponse à une élévation de température. Des protéines spécifiques sont aussi synthétisées lors de certains autres stress, comme un choc aux températures froides, stress de déshydratation, etc (Lindquist et Craig, 1988). Physiologiquement et génétiquement, les résultats indiquent que la production de ces protéines spécifiques durant un stress, soit les HSP, est essentielle pour la survie d'une cellule (Chen et al., 1990), jouerait le rôle de protecteurs contre les dommages provoqués par la chaleur (Bauer et Senser, 1979).

Durant le choc thermique, soit une variation de température de 10 à 15°C au-dessus de la température ambiante de croissance, la synthèse d'un nouveau groupe de protéines (HSP) est privilégiée aux dépens de la synthèse des protéines normalement synthétisées (Kimpel et Key, 1985). Durant le stress, l'extrême sensibilité des ribosomes du chloroplaste entraîne une élimination des protéines synthétisées par le génome chloroplastique (Feierabend et

Mikus, 1977; Ellis, 1981). Cette réponse est réversible puisqu'un retour à des températures "habituelles de croissance" permet, après trois heures, une réapparition des protéines "normales". (Key et al., 1981)

### 3.1.5 Origine des protéines de choc thermique:

La synthèse des nouveaux polypeptides, en réponse à un stress thermique, est possible par l'alternance d'un gène d'expression, (Sachs, 1986). Suite à des expériences utilisant des anticorps spécifiques et des gènes sondes, il est maintenant évident que les HSP appartiennent à des familles de protéines. Pour tous les organismes étudiés, ces protéines sont codées par des familles de gènes, par exemple le gène HSP 70 kDa et le HSP 90 kDa chez la *Drosophila* (Lindquist, 1988). Jusqu'ici, cinq familles peuvent être définies: la famille HSP90 (80-95 kDa), la famille HSP70 (63-78 kDa), la famille HSP60 (53-62 kDa) reliée aux organelles, la famille HSP20 (14-30 kDa) et la famille reliée à l'ubiquitine (8.5 kDa). Chaque famille code pour diverses protéines qui se retrouveront par la suite dans différentes parties de la cellule.

Bien que les plantes synthétisent une série de HSP de poids moléculaires élevés, la capacité translationnelle est consacrée à la synthèse des HSP de faibles poids moléculaires (LMW) regroupés entre 14 et 30 kDa (Mansfield, 1987).

La provenance des protéines du choc thermique a été identifiée comme d'origine nucléaire. Il a donc été démontré par des expériences effectuées en présence de cycloheximide (antibiotique) que la synthèse des HSP peut-être inhibée in vivo par le cycloheximide, celui-ci empêchant la synthèse de protéines provenant du génome nucléaire (Vierling, 1986). Les HSP ont ainsi une origine nucléaire et peuvent se retrouver soit dans le cytoplasme cellulaire soit au niveau

du chloroplaste. C'est par les travaux de Kloppstech en 1985, que les premières protéines du stress thermique furent localisées dans le chloroplaste (Kloppstech et al., 1985). Indépendamment et relativement au même moment, d'autres groupes de recherche parviennent à la même constatation (Vierling et al., 1986; Sub et Yordanov, 1986). Par les études de Glaczinski en 1988, seulement deux polypeptides ont été reconnus comme étant des protéines du choc thermique codées au niveau du noyau lors de stress thermique et retrouvées dans le chloroplaste (Glaczinski et Kloppstech, 1988). Pour permettre le transfert de ces protéines du cytoplasme vers le chloroplaste, la synthèse des protéines se produit par la duplication d'un gène nucléaire, pour une protéine cytoplasmique, laquelle acquiert une séquence amino-terminale suffisante pour diriger par la suite cette protéine au niveau du chloroplaste (Vierling, 1988) (voir section 2.2). Les protéines précurseurs de 26 et 30 kDa sont alors transportées dans le chloroplaste où, par processus de maturation, ils formeront les protéines du choc thermique de 22 et 25 kDa.

### **3.1.6 Localisation des protéines du choc thermique:**

Comme mentionné auparavant et pour comprendre et élucider le rôle possible des HSP, il est essentiel d'étudier la localisation intracellulaire de celles-ci. La localisation de ces protéines a été longtemps controversée. Par exemple, certains rapports affirment qu'elles sont d'origine chloroplastique (Krishnasamy, 1988) ou nucléaire (Vierling et al., 1986), qu'elles sont liées à la membrane thylacoïdienne (Kloppstech et al., 1985) ou retrouvées libres dans le cytosol chloroplastique (Chen et al., 1990), ou encore associées à des ribosomes ou des prosomes au niveau du cytoplasme (Lindquist, 1988).

La majorité de ces protéines du choc thermique, en particulier celles de faibles poids moléculaires, ont été localisées dans

le cytosol. Durant le choc thermique, elles sont à l'état libre, ou associées au cytosquelette (Lim, 1984). D'autres études ont démontré une incorporation des HSP dans les granules du choc thermique (HSG), qui sont des agrégats de protéines présents dans le cytoplasme, et détectables au microscope électronique. Ces agrégats sont principalement composés de sous-ensembles de HSP (Nover, 1983; 1984; Neumann, 1984). Ces études sur les agrégats de HSP, démontrent que le rôle des HSG est d'emmagasinier ou de protéger le ARN<sub>m</sub> prévenant ainsi sa dégradation lors du stress thermique (Nover 1989). Lorsque les températures reviennent à la normale, les HSG se dispersent et s'associent étroitement aux organelles actives dans la synthèse de protéines, comme les polysomes (Neumann, 1989). Des études plus récentes ont dépisté la présence de HSG au niveau du chloroplaste du pois (Chen 1990). Ces HSG, d'environ 200 kDa, sont des complexes de HSP, plus précisément d'agrégats de protéines de choc thermique de 21 kDa (Glaczinski, 1988; Vierling, 1988, 1989), qui possèderaient un rôle de protection analogue aux HSG présents dans le cytoplasme (Chen, 1990).

L'existence de HSP spécifiques aux chloroplastes a été démontrée par plusieurs groupes différents (Kloppstech, 1985, 1986; Vierling, 1986, 1988, 1989; Süss, 1986; Restivo, 1986; Schuster, 1988). Différents rapports énoncent que les HSP de faible poids moléculaire, tout spécifiquement les HSP 21, sont localisées au niveau du chloroplaste et sont clairement contenues, à des températures inférieures à 38°C, dans la partie soluble (Chen, 1990; Clarke, 1992). Par contre, les études de Schuster (1988) ont démontré que les HSP seraient localisées dans la membrane thylacoïdienne et suggèrent, de ce fait, qu'elles interagissent directement avec le PSII pour prévenir ou réparer les dommages dus à la chaleur (Schuster 1988). Dans cette même orientation, les études de Glaczinski en 1988 ont rapporté que la majorité des HSP sont liées à la membrane thylacoïdienne à des températures supérieures à 38°C (Glanczinski et Kloppstech, 1988). La transition entre la constatation des protéines accolées ou non accolées

à la membrane est très étroite, allant entre des températures de 36 à 40°C selon l'espèce végétale. Les modifications lipidiques et protéiques de la membrane survenues lors du stress thermique faciliteraient l'association des protéines de stress avec la membrane. La liaison des protéines du choc thermique à la membrane, par contre, ne peut être

confirmée dans les études de Vierling qui considèrent cette liaison comme le résultat d'agrégaions des HSP, sous forme de granules, plutôt que d'une association avec la membrane (Vierling et al., 1986; Vierling, 1990).

### **3.2 Thermotolérance et protéines du choc thermique**

Les physiologistes du monde végétal sont depuis longtemps familiers avec le phénomène d'adaptation au stress thermique, c'est-à-dire l'acquisition d'une tolérance ou résistance à la chaleur que les espèces végétales préconisent (Sapper, 1935, Yarwood, 1961, Alexandrov, 1970). La principale raison qui suscite l'intérêt durable de l'étude des stress physiologiques, et en particulier le choc thermique, est que les plantes qui sont fixées à leur habitat naturel, ne peuvent pas échapper aux conditions de stress. Il est primordial de comprendre et d'expliquer ce phénomène de thermotolérance qui rend les plantes aptes à supporter une élévation de température. Le mécanisme de protection contre les températures élevées n'a pas encore été élucidé. Par contre, avec la détection et la caractérisation des HSP, les aspects cellulaires de la réponse au stress thermique et le rôle possible de ces HSP pour l'induction de la thermotolérance sont devenus les champs d'études de prédilection depuis ces dernières années (Al-Khatib, 1990; Barnes, 1990; Mackey, 1990; Clarke, 1990; Krishnan, 1989; Marmioli, 1989; Bonham-Smith, 1987; Süß, 1986; Burke, 1985; Xiao, 1985; Barry, 1983; Santarius, 1979).



### 3.2.1 Induction de la thermotolérance:

Selon la procédure utilisée pour administrer le choc thermique, il y aura différentes perspectives de l'induction de la thermotolérance (Nover, 1990). Il existe des différences évidentes des états de thermotolérance observés:

- a) après un court et léger choc thermique.
- b) après une longue adaptation (graduelle).
- c) après un sévère choc thermique appliqué durant plusieurs heures (Boon, 1986).

Des travaux réalisés en 1977 par Pearcy démontrent que la température de croissance des plantes a un effet substantiel sur la performance photosynthétique de ces plantes (Pearcy et al. 1977; Pearcy, 1977). Ces études sur l'induction de la thermotolérance par une longue adaptation montrent que la croissance de plants à 23°/18°C (jour/nuit) en comparaison avec une culture à 43°/23°C a été très susceptible à l'effet d'une augmentation de la température. L'analyse de l'absorption du CO<sub>2</sub> demeure constante jusqu'à l'exposition des plantes à 30.9°C pour la culture à base température. Cependant, l'exposition des plantes cultivées à température élevée supporte l'effet de la chaleur jusqu'à une température de 40.9°C. Ces études démontrent donc la possibilité de l'acquisition d'une tolérance à la chaleur.

Selon certaines autres études (Marmioli et al., 1989), pour acquérir cette adaptation (ou thermotolérance), il est primordial de provoquer d'abord la synthèse des HSP. Cette synthèse est obtenue en faisant subir aux spécimens un prétraitement à la chaleur (de courte durée) de une heure à 34°C (les prétraitements diffèrent

légèrement par la température et la durée selon l'auteur). La synthèse de protéines du choc thermique est alors observée par des techniques d'électrophorèse qui démontrent la présence de protéines de différents poids moléculaires, 81, 69, 37, 31, 27, 21 et 17 kDa (les poids moléculaires ainsi que le nombre de protéines de choc thermique retrouvées varient selon l'espèce végétale). Cette variation dans la composition protéique permettrait à nos spécimens biologiques, selon ces études, de présenter une thermoprotection lors d'un second choc thermique à une température normalement létale ou tout simplement à une température qui empêche habituellement la croissance normale de l'espèce végétale. Cette thermotolérance est caractérisée par la capacité des spécimens pré-traités à continuer leur croissance (étude des vitesses de croissance) lors d'un retour aux températures normales (25°C) (Seemann et al., 1986). Il est à préciser que cette thermotolérance est inexistante chez le spécimen témoin n'ayant pas été soumis à des petites élévations de température durant leur croissance.

L'induction de la thermotolérance est possible et des études sur l'activité photosynthétique (fixation du CO<sub>2</sub>) ainsi que sur la croissance des plantes concrétise ce phénomène. L'explication de cette résistance à la chaleur est attribuée à des causes différentes selon l'auteur. Certains préconisent l'influence des HSP, d'autres des modifications lipidiques ou encore une réorganisation de la membrane.

### **3.2.2 Relation entre l'apparition des HSP et l'expression de la thermotolérance.**

Il n'y a pas de fonction spécifique qui a été établie pour chacune des protéines de choc thermique. Par contre, certaines études viennent confirmer un rôle spécifique à quelques protéines. Plusieurs

protéines de stress thermique, comme celles provenant des familles HSP60, HSP70 et HSP 90, sont connues pour être des protéines ou molécules "chaperones". Ces polypeptides sont classés parmi les protéines qui jouent un rôle dans le transport, le repliement et l'assemblage de certaines autres protéines. Ainsi les chaperones aident d'autres protéines, synthétisées au niveau du noyau, à traverser certaines membranes telle que les membranes mitochondriale et chloroplastique, pour permettre à la protéine de gagner son emplacement définitif. Ces chaperones facilitent le repliement des protéines (formation de structure tertiaire) et aussi permettent la formation de structures multimériques par l'assemblage de protéines (Rothman, 1989; Gething et Sambrook, 1992). Beaucoup d'études élaborées sur le HSP70 ont permis de concrétiser son rôle dans la cellule. Le HSP70 facilite la translocation de protéines à travers les membranes d'organites telle que le réticulum endoplasmique ainsi que de la mitochondrie (Deshaies et al., 1988). Un homologue de ce HSP70 a été aussi identifié pour le chloroplaste (Marshall et al., 1990) et localisé à l'extérieur de l'organite ainsi que dans le stroma. Celui-ci permet la translocation de certaines protéines dans le chloroplaste. Ces HSP70, localisés au niveau du chloroplaste ont été confirmés par plusieurs auteurs et chez différentes espèces, tels l'épinard (Ko et al., 1992) et le pois (Marshall et Keegstra, 1992). De toutes récentes études suggèrent que le HSP70 dans le stroma du chloroplaste aurait comme fonction d'entraîner l'intégration de l'apoprotéine précurseur du complexe collecteur de lumière (au niveau du PSII) dans la membrane thylacoïdienne (Yalovsky et al., 1992; Tsugeki et Nishimura, 1993). Par contre, plusieurs autres protéines de stress n'ont pas de fonction qui leur soit attribuée, seulement des hypothèses qui confèrent à certaines HSP un rôle dans la protection contre les dommages entraînés par un choc thermique (Mc Alister, 1980; Key, 1985; Schlesinger, 1986). Les HSP doivent jouer un rôle lors du stress thermique, puisque leur synthèse est activée à la chaleur. De plus la protéine de HSP21 est une protéine synthétisée seulement lors du stress thermique (Chen et al., 1990) ainsi elle a sûrement une fonction bien particulière. Les HSP

sont-ils à l'origine de l'acquisition de la thermotolérance ? Si oui, comment agissent-ils ? A quel niveau interagissent-ils ?

Les recherches les plus nombreuses et les plus importantes sur l'implication des HSP ont été produites par Marmiroli en 1986 - 1989 ainsi que Krishnan en 1989. (Lin, 1984; Wu, 1984; Xiao, 1985; Bienz, 1987; Key, 1983, 1985; Kimpel, 1985; Linqvist, 1986; Schlesinger, 1986; Schuster, 1988; Schoffl, 1984; Ougham, 1986). Ces recherches démontrent une certaine corrélation entre l'accumulation de HSP chez les plantes et leur adaptation à tout autre augmentation de température. Les cinétiques de thermotolérance induites par un choc thermique sont en corrélation avec les cinétiques de synthèse des HSP (Howarth, 1990). D'autres études de vitesse de croissance sur le blé (Krishnan, 1989), sur les fèves de soya (Lin, 1984), ainsi que sur des plantules (Goycoolea et Cardemil, 1991), réalisées dans des conditions de pré-taitement légèrement différentes, convergent toutes vers un même résultat. Ces recherches n'ont pas identifié la localisation de ces HSP, ni de quelle façon ils interagissent pour créer l'adaptation et permettre la croissance de l'espèce malgré le choc thermique. Cependant, ils sont tous en accords sur le fait que les HSP ont une tâche à jouer dans l'acquisition de cette thermotolérance.

Puisque la présence de ces protéines pourrait être à l'origine de l'acquisition de la thermotolérance, il est indispensable de localiser ces HSP. Est-ce que la présence des HSP dans la partie soluble (stroma) suffit à permettre la croissance des plantes malgré un choc thermique? Les HSP ont-ils une localisation plus précise pour entraîner la thermotolérance, par exemple au niveau de la membrane thylacoïdienne qui est à l'essence même de la survie des espèces végétales?

## CHAPITRE 4

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 4.1 Préparation du matériel biologique

##### **4.1.1 Culture de l'orge:**

Le Matériel biologique utilisé dans cette étude est une culture d'orge réalisée sur vermiculite, sans autre ajout. La pousse se déroule sous des conditions contrôlées de température et d'illumination. Une phase lumineuse à 24 °C est suivie d'une phase sombre de 8 h à 20 °C. La croissance est menée jusqu'au jour 7, dans des conditions d'humidité adéquates.

##### **4.1.2 Traitement du choc thermique:**

L'augmentation de la température pour le choc thermique s'effectue durant la phase lumineuse de croissance. Les plants d'orge sont ainsi déposés dans une chambre de croissance pré acclimatée à 40 °C. Ce traitement est d'une durée de 3 h et pour empêcher une déshydratation des plants nous avons recours à des périodes fréquentes d'arrosage.

#### **4.1.3 Incorporation d'antibiotiques:**

Dans cette étude nous observons l'influence de certains antibiotiques sur le phénomène photosynthétique de nos plants d'orge. Il faut tout d'abord introduire ces antibiotiques aux plants. Pour permettre l'incorporation, il est primordiale premièrement de couper les plants d'orge à la racine et de les déposer par la suite dans la solution antibiotique. La coupe des plants permet une meilleur pénétration des antibiotiques par osmose. Les antibiotiques utilisées sont le chloramphénicol et le cycloheximide, tous deux solubilisés soit à 5 mM ou 15 mM dans un alcool. Le solvant qui a été utilisé dans ces expériences est le méthanol.

#### **4.1.4 Incorporation de la radioactivité:**

Pour permettre une bonne et rapide incorporation de la radioactivité dans nos plants d'orge, nous devons procéder à une coupe des plants à la racine. Ces plants sont ensuite déposés dans une solution de 10 mM Tris-HCl pH 7.5, contenant 20  $\mu\text{Ci/ml}$  de  $^{35}\text{S}$ -methionine. Cet acide aminé a pour but de s'incorporer aux protéines nouvellement synthétisées. Nous avons observé qu'après 15 min de trempage, 50 % de la radioactivité totale incorporée se retrouve par osmose, au bout de la feuille d'orge.

##### **i) Compteur à scintillation:**

Le dosage de la radioactivité, aussi bien lors de la préparation des solutions que une fois la radioactivité incorporée aux plantes, est effectué par un compteur à scintillation de marque LKB

Wallac 1215 RackBeta. L'échantillon à analyser (solutions, bouts de feuille, extractions des membranes etc) doit être déposé sur un papier filtre (pour les échantillons en solution) et ensuite déposé dans un petit récipient de plastique contenant préalablement une solution à scintillations. Cette solution comporte un solvant, le toluène et un soluté, soit un composé organique de la série aromatique, comme le PPO et le POPOP. Cette solution organique a pour but d'absorber l'émission de radioactivité et de se retrouver ainsi sous l'état de molécules excitées. Le retour de celle-ci à l'état fondamental est observé par l'émission de photons. La quantité de photons alors émise est proportionnelle au nombre d'émissions radioactives. L'émission de photons est détectée au moyen d'un tube photomultiplicateur (MPT) très sensible, qui amplifie le signal et génère un voltage pulsé proportionnel au nombre de photons émis.

#### **4.2 Extractions et purifications du matériel biologique**

Toutes les extractions suivantes sont réalisées à partir de feuilles d'orge âgées de 7 à 8 jours. Les extractions sont de plus effectuées rapidement sur la glace (pour ainsi empêcher la dégradation du matériel) et en présence d'un éclairage vert (pour empêcher le processus photosynthétique de se faire).

Pour chacune des méthodes d'extraction, toutes les centrifugations sont effectuées à 4°C dans une centrifugeuse Sorval RC-5B avec un rotor de type SS-34 à godets fixes.



#### 4.2.1 Extraction des cellules:

Les plantes sont soumises à une période de noirceur de 24 h suivie d'une période d'éclairement de 2 h avant l'isolation des cellules. Les feuilles sont coupées finement et incubées, avec agitation, dans un tampon contenant 300 mM de sorbitol, 12.5 mM de  $K_2SO_4$ , 1 % de sulfate dextran, 0.00075 % de pectolyase et 100 mM d'HEPES-KOH pH 7.3. Ensuite les cellules sont filtrées sur filtres de nylon de 100  $\mu m$  et de 20  $\mu m$ . Les cellules sont replacées en suspension dans un tampon constitué de 100 mM d'HEPES-KOH (0.5M) pH 7.8, 100 mM de Tricine KOH pH 7.8 et 200 mM de sorbitol et ensuite le tout est centrifugé à 1500 x g pendant 5 min. Les culots sont mis en suspension dans un petit volume du tampon formé de 100 mM d'HEPES-KOH pH 7.8, 250 mM de sorbitol, 2 mM de  $CaCl_2$ , 1 mM de  $MgSO_4$ , 5 mM de  $KNO_3$ , 0.5 mM de  $KH_2PO_4$ , 0.01 mM de  $CuSO_4$  et 0.2 % de BSA.

#### 4.2.2 Extraction des chloroplastes:

L'utilisation de 50 g de feuilles est nécessaire pour cette extraction. L'homogénéisation est obtenue dans 300 ml de tampon contenant 6 ml de la solution suivante: sorbitol 660mM, 20 mM de KCl, 2 mM de EDTA et 100 mM HEPES-KOH ( pH 7.9 ) et de 294 ml de sorbitol à 330 mM pour obtenir finalement une solution d'extraction de 300 ml. Le résultat de l'homogénéisation est filtré sur du coton fromage et centrifugé à 2000 x g pendant 100 sec. Les culots sont alors mis en suspension dans 80 ml du tampon d'homogénéisation et centrifugés à 2000 x g pour une durée de 90 sec. Il y a resuspension des culots dans 1 ml du tampon contenant 330 mM de sorbitol, 10 mM de KCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de  $MgCl_2$ , 1 mM de  $MnCl_2$ , 1 % de BSA et 50 mM du tampon HEPES-KOH ( pH 7.9 )



#### 4.2.3 Extraction des membranes thylacoïdiennes:

Dans un malaxeur commercial, environ 50 g de feuilles d'orge, lavées et asséchées, sont broyées dans un tampon d'homogénéisation constitué de 330 mM de sorbitol, 5 mM de  $MgCl_2$  et 20 mM de Tes-NaOH (pH 7.5) dans un volume final de 300 ml. L'homogénat est ensuite filtré sur des couches de coton fromage et centrifugé à 2000 x g pour une min. Le culot est resuspendu dans le tampon d'homogénéisation 20 fois dilué et ensuite centrifugé à 4000 x g pour une min. Finalement le culot est resuspendu dans un tampon contenant 50 mM de Tes-NaOH (pH 7.5), 300 mM de sorbitol, 2 mM de  $MgCl_2$ , 1 mM de  $NH_4Cl$  et 2 mM de EDTA pour obtenir une concentration finale de 2 mg Chl/ml.

#### 4.2.4 Extraction des complexes protéiques:

L'extraction des complexes protéiques peut se faire à partir d'une extraction de thylacoïdes de PSI ou de PSII. Lors de la dernière centrifugation de l'extraction de la membrane thylacoïdienne, les culots sont resuspendus dans 2 mM de Tris-maléate pH 7.0 et incubés dans la glace à l'obscurité pour une période de 10 min, suivi d'une centrifugation de 15 min à 4000 x g. Les culots sont resuspendus dans 2 mM de Tris-maléate pH 7.0 et 10 % de glycérol. Une deuxième centrifugation de l'échantillon est nécessaire de 15 min à 4000 x g. Le culot est resuspendu dans le tampon final formé de 2 mM de tris-maléate pH 7.0, 0.88 % d'octyl glucoside, 0.22 % de SDS, et 10 % de glycérol, dans un rapport de 20/5/1 ( octyl glucoside/SDS/Chl ). Une incubation de 5 min à l'obscurité est requise avant une dernière centrifugation de 5 min à 2000 x g. Les complexes protéiques sont recueillis finalement dans le surnageant.

#### 4.2.5 Extraction des protéines totales:

Deux méthodes d'extraction des protéines totales ont été utilisées. La première d'après la méthode de Lin et al. (1984) et la seconde d'après celle de Terao (1989). Une seule feuille suffit pour ce genre d'extraction.

Selon la méthode de Lin, la feuille est broyée dans 50 mM de Tris-HCl pH 8.5 contenant 2 % de SDS, 2 % de mercaptoéthanol et 1 mM de PMSF. Le tout est centrifugé à 5000 x g pour 30 min et le filtrat est traité avec 5 volumes d'acétone à - 20°C pour une nuit. Le précipité formé est alors séché au lyophilisateur et les protéines totales peuvent être resuspendues dans un tampon pour étude.

Selon l'autre méthode, la feuille est homogénéisée dans un tampon contenant 50 mM de tricine-NaOH pH 7.8, 2 mM de  $MgCl_2$ , 10 mM de NaCl et 2 mM de PMSF. L'homogénat est centrifugé à 2000 x g pendant 10 min. Le précipité est lavé deux fois dans le même tampon d'homogénéisation pour récupérer les protéines solubles du surnageant. Les protéines insolubles sont obtenues après un traitement du culot à 25°C pendant 30 min avec 125 mM de Tris-HCl pH 6.8 contenant 2.5 % de SDS et 5 % de mercaptoéthanol. Les protéines sont isolées du surnageant après une centrifugation de 10 min à 2000 x g.

### 4.3 Techniques biochimiques

Les méthodes biochimiques employées sont les électrophorèses pour la séparation de nos polypeptides à étudier. Ces protéines peuvent se séparer et se distinguer les unes des autres grâce au tamis d'acrylamide qui constitue le gel d'électrophorèse. Le gel est formé par

la polymérisation d'un monomère d'acrylamide  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$  en une longue chaîne de polyacrylamide et est lié par l'inclusion d'un co-monomère bifonctionnel soit le N,N'-methylene-bis-acrylamide  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ . La réaction de polymérisation est initiée par le persulfate d'ammonium qui active un second composé, le TEMED. A son tour le TEMED active un monomère d'acrylamide qui réagit avec un monomère non activé pour ainsi former une chaîne de polymérisation tridimensionnelle. La concentration utilisée d'acrylamide détermine la longueur de la chaîne du polymère tandis que la concentration de bis-acrylamide détermine l'étendue des liaisons entre les chaînes du polymère. Ainsi les deux concentrations influencent les propriétés physiques du gel, comme sa densité, son élasticité et la dimension de ses pores.

La mobilité électrophorétique d'une molécule dépend à la fois de sa charge nette et de sa dimension (en relation avec son poids moléculaire). Une protéine possédant une charge nette très élevée aura tendance à se déplacer plus rapidement (dû au champ électrique appliqué) qu'une protéine de faible charge. Par contre, pour une même charge nette, une protéine de faible dimension se déplacera beaucoup plus vite qu'une protéine possédant un volume imposant (dû aux forces de friction).

Deux types d'électrophorèse sont utilisés, l'électrophorèse dite dénaturante, soit celle contenant un détergeant du type SDS ou LDS qui ont pour effet de dénaturer les polypeptides et l'électrophorèse non dénaturante en absence de ces détergeants pour l'étude des complexes de protéines.

### 4.3.1 Electrophorèse SDS-Page (dénaturante):

Les gels d'acrylamides sont coulés entre deux plaques de verre et ensuite fixés sur un bassin de plexiglas pour la migration. Les échantillons à analyser sont déposés sur un gel (de résolution) à gradient de 10 à 17.5 % d'acrylamide contenant un tampon de Tris-HCl SDS pH 8.8, une quantité de sucrose (pour la formation du gradient), 1.8 % de persulfate d'ammonium et 0.04 % de TEMED. Le gel d'empilement est de 5 % en acrylamide et contient un tampon de Tris-HCl SDS pH 6.8, 63 % de H<sub>2</sub>O, 0.2 % de persulfate d'ammonium et 0.04 % de TEMED. Le temps de polymérisation complet du gel est d'environ 1 h. Le tampon de migration contient 25 mM de Tris, 200 mM de glycine et 0.1 % de LDS. L'alimentation électrique, de type ISCO model 494, fournit un courant constant de 18 mA et le temps de migration varie entre 5 et 6 h. Toutes les migrations sont effectuées à 4°C.

### 4.3.2 Electrophorèse non dénaturante:

Comme déjà mentionné, une électrophorèse non dénaturante ne contient pas de détergent du type SDS ou LDS qui pourrait causer une dénaturation des protéines. De plus, les échantillons ne subissent pas le traitement au mercaptoéthanol qui briserait les liaisons disulfures entre les acides aminés avant la migration.

La migration des complexes protéiques se fait sur un gel à 10 % d'acrylamide, contenant 1.3 M de Tris-HCl pH 9.8, 13,5 % de H<sub>2</sub>O, 1.6 % de persulfate d'ammonium et 0.07 % de TEMED. Tandis que le gel d'empilement est de 5 % d'acrylamide contenant 100 mM de Tris-HCl pH 6.1, 63 % de H<sub>2</sub>O, 3.7 % de persulfate d'ammonium et 0.16 % de TEMED. Le temps de polymérisation du gel est d'environ 1 h 30 min.

### **4.3.3 Analyse des électrophorèses:**

#### **i) Techniques de coloration.**

Après leur migration sur un gel d'acrylamide, la plupart des protéines (sauf à l'exception des complexes protéiques sur gels non dénaturants) peuvent être détectées seulement par des techniques de coloration, ou encore au moyen de marqueurs radioactifs.

#### **A. Coloration au bleu de coomasie:**

Le gel est déposé une nuit dans une solution de bleu de coomasie (0.05 %) contenant 7 % d'acide acétique et 50 % de méthanol. Le gel est ensuite décoloré dans une autre solution formée de 7 % d'acide acétique et 20 % de méthanol jusqu'à ce que les bandes des protéines soient bien perceptibles.

#### **B. Coloration à l'argent:**

Le gel d'acrylamide est d'abord fixé dans une solution à 50 % en méthanol pour 1 h. Par la suite, le gel est lavé à l'eau distillée deux ou trois fois. La solution de coloration contient 20 % de nitrate d'argent et elle est ajoutée goutte à goutte à une solution contenant 0.08 % d'hydroxyde de sodium et 0.2 M d'hydroxide d'ammonium. Le gel est trempé (avec agitation) dans cette solution pendant 1 min et dans l'eau distillée 5 min. Le gel est ensuite développé par une solution contenant 0.005 % d'acide citrique et 0.02 % de formaldéhyde jusqu'à ce que les bandes apparaissent. Il est alors lavé dans l'eau distillée pour finalement être déposé dans un bain d'arrêt (du développement) contenant une solution de méthanol à 50 %.

## **ii) Densitométrie.**

Les gels d'électrophorèse une fois colorés sont déposés dans le densitomètre qui effectue la lecture de chacune des bandes à l'aide d'un laser hélium-néon (faisceau monochromatique à 633 nm). La portion de lumière non absorbée par l'échantillon parvient au détecteur et produit un photocourant qui est proportionnel à la quantité de lumière détectée.

Les densitogrammes sont produits au moyen d'un densitomètre laser LKB 2222-020 de type UltroScan XL. Les données sont traitées sur microordinateur par le programme Gelscan (Pharmacia LKB).

## **iii) Autoradiographie.**

La technique d'autoradiographie est utilisée pour détecter la radioactivité incorporée dans les protéines qui sont séparées par électrophorèse. Premièrement le gel est coloré et ensuite séché entre deux feuilles de cellophane sous vide. Une première lecture du gel est prise au densitomètre avant de déposer celui-ci dans une cassette d'amplification du signal radioactif qui contient un film photographique de type X-OMAT pour l'obtention d'une résolution des protéines radioactives. La durée du contact entre le gel et le film à -80°C dépend de la quantité de radioactivité déposée sur le gel. Les films photographiques sont ensuite développés au centre de radiologie de l'hôpital Ste-Marie à Trois-Rivières et analysés pour une seconde fois par densitométrie.

#### **4.4 Techniques biophysiques**

##### **4.4.1 Spectrophotométrie UV-visible et détermination de la chlorophylle:**

Suite aux extractions des membranes thylacoïdiennes il est primordial de déterminer la proportion en chlorophylle que possède l'extrait. Cette analyse des pigments permettra de régulariser les quantités de membranes utilisées dans nos études. Les mesures d'absorbance, pour la détermination de la chlorophylle, sont prises sur un spectrophotomètre SPECTRONIC modèle 601 à simple faisceau à 545 et à 663 nm selon la méthode de Arnon (Arnon, 1949).

Lorsque les complexes protéiques de la membrane thylacoïdienne sont isolés et séparés par électrophorèse, une étude individuelle est possible. Chaque bande est alors découpée et passée au spectrophotomètre, pour obtenir sa constitution en Chl a et b. Des spectres d'absorption par balayage sont effectués de 400 à 750 nm par un spectrophotomètre PERKIN-ELMER modèle 553 à double faisceaux.

##### **4.4.2 Electrode à oxygène et activité photosynthétique:**

Une fois la membrane thylacoïdienne extraite des plants d'orge (voir méthode d'extraction), il est possible de la replacer dans des conditions idéales pour obtenir une activité photosynthétique normale (lorsque les membranes photosynthétiques sont intègres et isolées parfaitement). L'activité photosynthétique est évaluée par le dégagement d'oxygène lors de la photolyse de l'eau au niveau du centre réactionnel du PSII. Ce dégagement d'oxygène est capté par

une électrode de type Clark qui est reliée à un moniteur YSI modèle 53 pour nous donner l'information sur la qualité de nos membranes. Nous pouvons obtenir des valeurs de dégagement d'oxygène allant jusqu'à 200  $\mu\text{mol d'O}_2/\text{mg Chl.h}$ .

Les mesures de dégagement d'oxygène sont prises dans une cellule thermostatée à 21°C (maintenue constante à l'aide d'un bain de marque Cole Parmer) qui contient un tampon formé de Mes-NaOH 20 mM à pH 6.5, 1 mM de NaCl et de 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{MgCl}_2$ . Il est essentiel d'utiliser un accepteur artificiel d'électrons comme le 2,5-dichloro-p-benzoquinone à 0.18M (DCBQ) pour observer un dégagement d'oxygène. Le DCBQ est un accepteur au niveau du transfert entre  $\text{Q}_\text{B}$  et le bassin de plastoquinones. L'extrait de membrane est utilisé à une concentration de 11  $\mu\text{g}$  de Chl/ml pour un volume total dans la cellule de 3 ml. La solution est désoxygénée à l'aide d'un barbotage à l'azote 1 min. Comme source lumineuse employée un projecteur de type halogène au quartz qui est utilisé à une intensité maximale de 150 W.

#### 4.4.3 Microscope optique et intégrité des chloroplastes:

L'intégrité des chloroplastes s'observe à l'aide d'un microscope optique (modèle Wild) seulement à 1000 X en immersion dans l'huile. L'utilisation des colorants comme le bleu de coomasie, dans une solution de chloroplastes, est nécessaire pour permettre une distinction des organites intègres de ceux éclatés lors de l'extraction. Ainsi, il est possible de déterminer si la double membrane du chloroplaste est brisée ou non. Lorsque la membrane a cédé, lors de l'isolation du chloroplaste, le colorant peut s'introduire dans le cytoplasme de l'organite. Une membrane bien conservée cèle le chloroplaste contre l'entrée du colorant. Il est alors possible de déterminer un pourcentage relatif de l'intégrité des chloroplastes.



Une autre méthode, plus précise, permet de faire ce même calcul. Il est possible de déterminer l'intégrité des chloroplastes par le dégagement d'oxygène de ces derniers. Les chloroplastes sont déposés dans la cellule de dégagement d'oxygène, en présence de 330 mM de sorbitol, 2 mM de EDTA, 1 mM de  $MgCl_2$  et de 50 mM de HEPES-KOH pH 7.6. La solution contient aussi 200 mM de DL-glyceraldéhyde qui prévient le dégagement d'oxygène par le  $CO_2$  présent dans l'échantillon. Le ferricyanure de potassium ( 50 mM ), qui est utilisé comme accepteur d'électrons, ne traverse pas la double membrane du chloroplaste. Ainsi une comparaison du dégagement d'oxygène est possible entre un échantillon de chloroplastes intacts et un autre dont les chloroplastes ont été volontairement éclatés. Il est alors possible de calculer un % d'intégrité des organites dans notre extraction.

#### **4.4.4 Infra-rouge à transformé de Fourier:**

Les études sont réalisées sur un appareil infra-rouge à transformé de Fourier (FTIR) de type Bomem DA3.2 avec détecteurs MCT, refroidi à l'aide d'un système de circulation d'eau et d'azote liquide. La technique employée par le FTIR est la méthode la plus avancée en spectroscopie infra-rouge. Les études effectuées sur cet appareil permettent d'accéder à une échelle plus large de nombres d'onde soit de 400 à  $4000\text{ cm}^{-1}$ . La radiation absorbée par une molécule, cause des vibrations aux différentes liaisons de cette molécule par la transition entre l'état fondamental et excité.

### **i) Préparation des échantillons.**

Pour obtenir de meilleurs résolutions des spectres d'infrarouge, les échantillons sont traités dans le but d'éliminer la plus grande quantité d'eau possible. Puisque cette dernière possède des bandes d'absorption considérables à  $3400\text{ cm}^{-1}$  et  $1640\text{ cm}^{-1}$ , il est alors préférable d'éliminer toute l'eau possible qui altérerait une lecture convenable des spectres de nos membranes thylacoïdiennes. Ainsi nos membranes sont mises en présence d'un tampon de resuspension, préparé avec du  $\text{D}_2\text{O}$ , pour 2 h, pour ensuite être centrifugées à  $4000 \times g$  et resuspendues de nouveau dans le même tampon. Les échantillons de membranes sont prêts à être déposés sur des cellules de  $\text{BaF}_2$  pour une nuit dans un dessiccateur et à l'obscurité. La lecture des spectres s'effectue lorsque les échantillons sont complètement asséchés.

## CHAPITRE 5

### RÉSULTATS ET DISCUSSION

#### PARTIE I

L'exposition de plantes à une élévation de température entraîne des modifications vérifiées sur la composition lipidique et protéique de la membrane photosynthétique. Plusieurs études confirment que l'effet d'un stress thermique appliqué directement sur le thylacoïde isolé entraîne des modifications extrêmes qui auront comme conséquence de provoquer l'inactivation de l'appareil photosynthétique. Ainsi cette membrane thylacoïdienne ne montre aucun signe de tolérance à la chaleur. La membrane photosynthétique isolée de son milieu ne peut obtenir aucune aide provenant du cytoplasme de la cellule ou même du chloroplaste. De plus, dans ces conditions elle ne semble pas être en mesure de fournir des modifications structurales comme protection à la chaleur. Les altérations qu'elle subira consisteront en des désorganisations lipidiques (désempilements des grana) ainsi que la dissociation de protéines ou de complexes protéiques nuisibles à son intégrité et à sa fonction. Est-ce que ces transformations sont aussi inévitables et radicales "in vivo" au niveau de la plante entière? Ainsi, est-ce que le thylacoïde (non isolé) obtient une aide de son environnement cellulaire ou chloroplastique pour sauvegarder son intégrité ? Dans ce travail nous ferons subir un stress thermique à des plantules d'orge et en vérifierons l'effet au niveau de la membrane thylacoïdienne

## **5.1 Modifications structurales de la membrane photosynthétique**

Une élévation de température apporte des changements physiques et structuraux aux protéines de l'appareil photosynthétique. Par exemple, plusieurs chercheurs ont identifié une dissociation du LHCII associée au centre réactionnel du PSII (Schreiber et Armond, 1978; Armond et al 1980; Krause et Weis, 1984) ainsi qu'une modification à la conformation de la protéine D1 associée elle au centre réactionnel du PSII des thylacoïdes (Wiest, 1986). Notre analyse des altérations structurales se pratique suite à l'application du stress thermique sur la plante entière. Dans un deuxième temps l'extraction et la préparation de la membrane sont réalisées pour une étude par FTIR

Les analyses en FTIR serviront de contrôle sommaire dans la détermination d'un changement conformationnel possible de la membrane apporté lors du stress thermique.

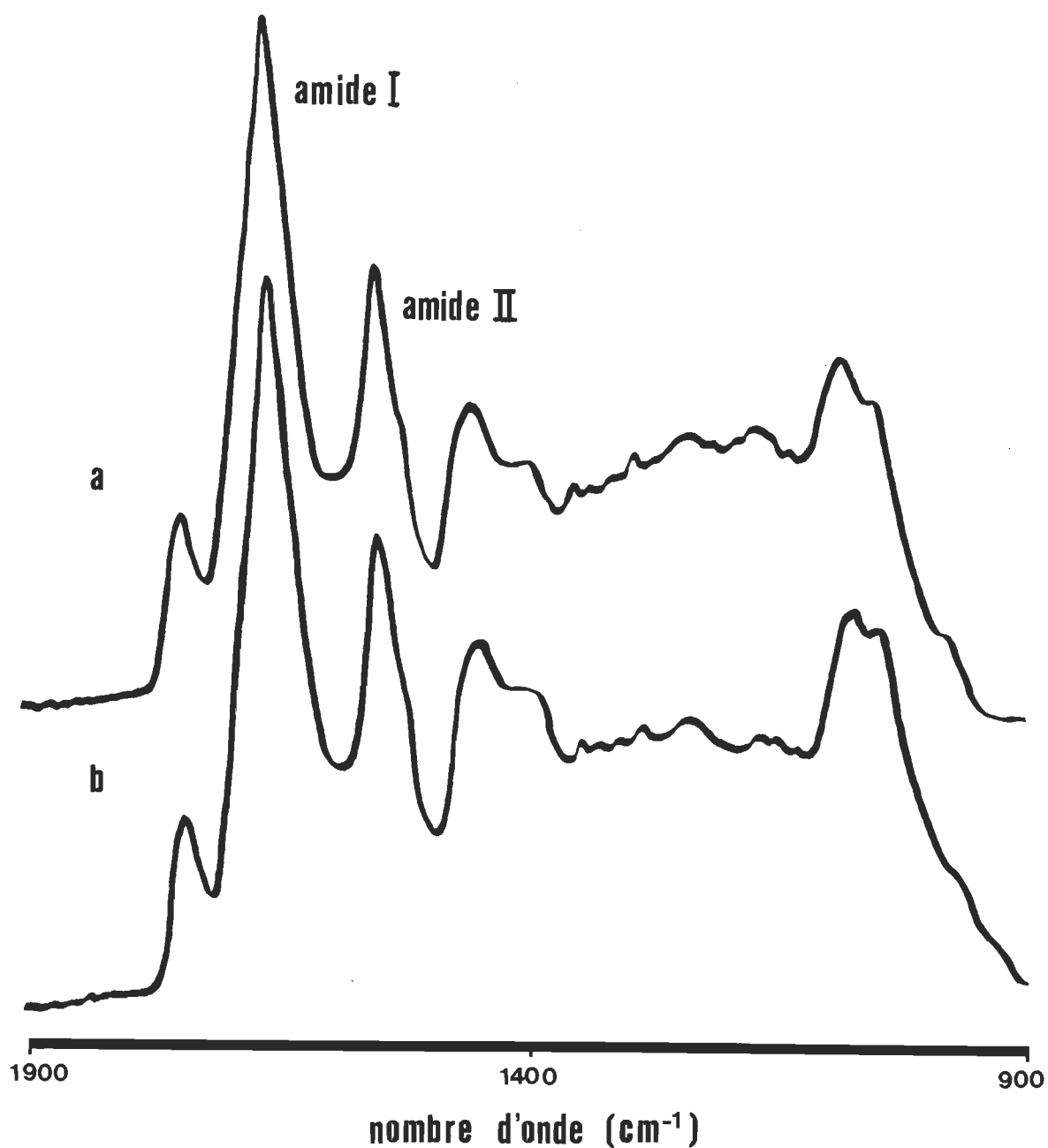
### **5.1.1. Etude des changements conformationnels des protéines de la membrane thylacoïdienne par FTIR:**

Des changements conformationnels au niveau de la membrane et des protéines qui la constitue, peuvent être observés en se basant sur un spectre infra-rouge en localisant les bandes amides, soit amide I et amide II (He, 1991; Navedrik, 1989). Des transformations telles que des changements de conformation  $\alpha$  et  $\beta$  des protéines sont analysées par l'étude de ces deux bandes. Ainsi, les fréquences de transition des deux bandes amides sont dépendantes de

la conformation secondaire des protéines (Susi, 1986; Surewicz, 1988; Jackson, 1989). Dû à la complexité du matériel utilisé (soit l'analyse de la membrane thylacoïdienne), les bandes amides I et II sont en fait des chevauchements des maxima de plusieurs vibrations. Il serait par contre possible par des déconvolutions des spectres, d'analyser la structure secondaire (Kauppinen; 1981; Yang, 1985; Byler, 1986). Les deux spectres obtenus ne démontrent aucune transformation apparente et majeure des thylacoïdes provenant de plantes acclimatées à la chaleur en comparaison avec les témoins (**Figure 14**). Les protéines membranaires semblent conserver leur intégrité face à l'augmentation de la température, puisque la bande amide I (structure  $\alpha$ ) se retrouve à  $1657\text{ cm}^{-1}$  dans chacun des spectres et la bande amide II (structure  $\beta$ ) à  $1547\text{ cm}^{-1}$  n'est pas délocalisée. Par contre des études sur la membrane thylacoïdienne isolée démontre que celle-ci subit des altérations à des températures élevées, en répondant par une augmentation en structure  $\beta$  (He, 1991). Une soustraction de ces spectres est nécessaire pour obtenir plus d'information sur les variations des structures secondaires des protéines. Cependant cette démarche n'a pu être effectuée.

### 5.1.2. Etude des complexes pigments-protéines:

Dans cette partie du travail les complexes pigment-protéine seront étudiés afin de vérifier les modifications apportées par un choc thermique. Suite aux extractions de ces complexes (voir méthode d'extraction section 4.3.4), ils sont premièrement analysés par électrophorèse et deuxièmement, chaque complexe est étudié individuellement par spectroscopie.

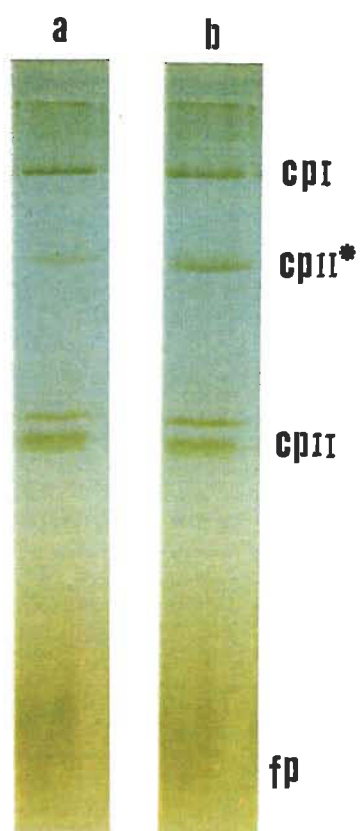


**FIGURE 14** Spectre infra-rouge (FTIR) de la membrane thylacoïdienne isolée (a) de plants d'orge non acclimatés (témoin 23°C) ou (b) de plants d'orge acclimatés à 40°C. La bande amide I est observée à 1657 cm<sup>-1</sup> et la bande amide II à 1547 cm<sup>-1</sup>.

L'extraction des complexes à partir de plants d'orge permet d'isoler quatre groupements de protéines et pigments (**Figure 15 et 16**). De ces groupements, nous nous intéressons à trois seulement, soit les complexes du PSI (CPI) et du PSII (CPII\*, CPII). Les CPII\* et CPII constituent respectivement la forme agrégée et non agrégée de l'antenne pigmentaire du photosystème II. L'analyse de l'électrophorèse par densitométrie nous signale une légère réduction de 20% des pigments appartenant au PSI (CPI) ainsi qu'une diminution de 49% des pigments associés au PSII (CPII) pour les plants d'orge acclimatés à la chaleur. Le stress thermique apporte donc une agrégation de ces complexes, agrégation qui est plus prononcée chez le PSII que chez le PSI. Cette observation n'est pas surprenante étant donné que plusieurs études ont démontré que le PSII demeure le photosystème le plus susceptible à l'effet de la chaleur. Cette étude des effets du stress thermique au niveau de la membrane thylacoïdienne, nous permet de confirmer la sensibilité du PSII. Suite à l'analyse du densitogramme, nous observons par ailleurs une augmentation du complexe CPII\* suite au stress thermique. Cette augmentation de la forme agrégée du PSII de 48% est en corrélation avec la diminution de 49% du CPII. Il est possible que cette augmentation soit reliée à la susceptibilité du PSII au stress thermique.

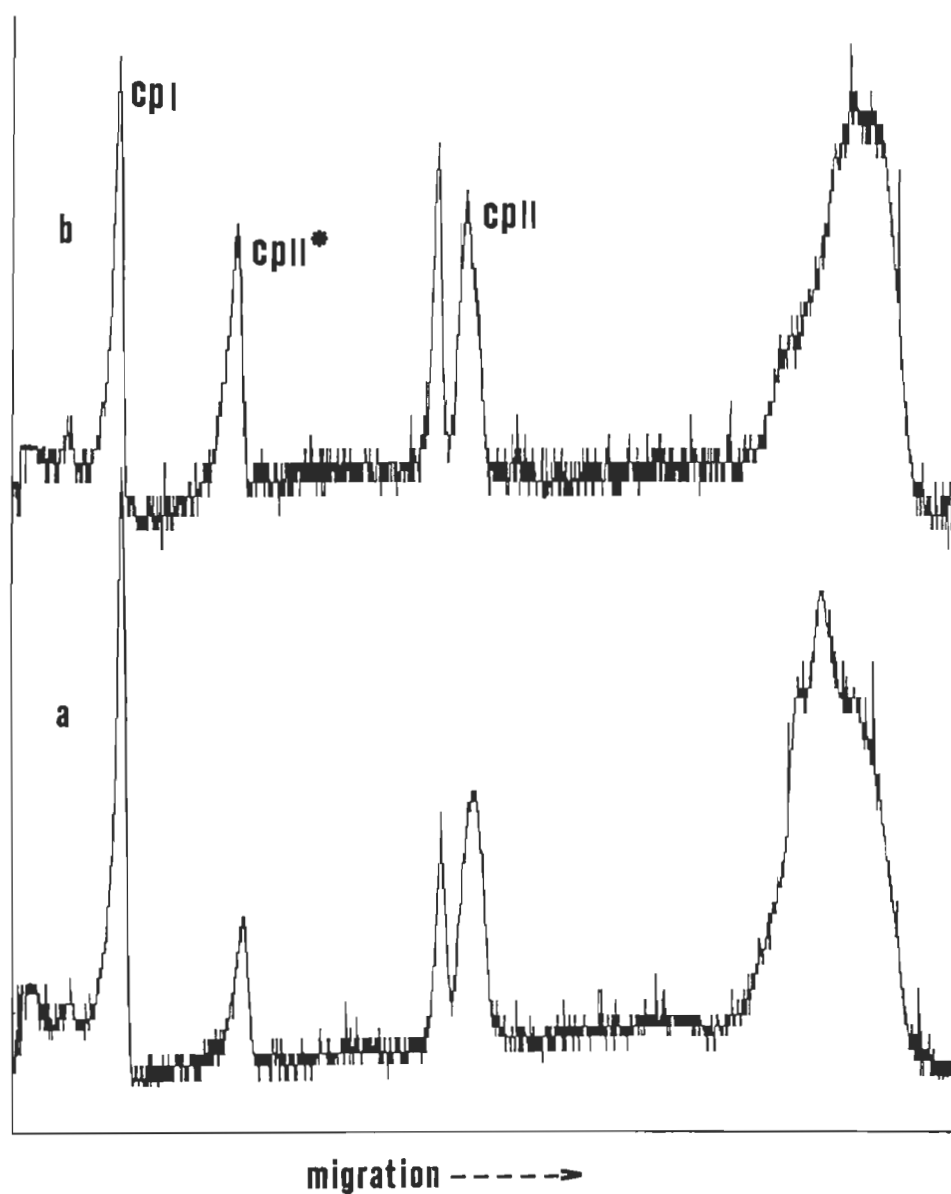
L'examen des complexes pigment-protéine en spectroscopie atteste que le complexe CPI associé au PSI n'est pas perturbé par le choc thermique (**Figure 17**). Aucun changement ou modification dans la forme des spectres ou dans la position des maxima d'absorption n'est remarqué. L'absorption de lumière par la chlorophylle se retrouve à des longueurs d'onde de 430 et 670 nm pour les complexes CPI provenant de membranes acclimatées ou non acclimatées à la chaleur. La diminution de l'absorption de lumière par la chlorophylle est expliquée premièrement par la dégradation de la chlorophylle lors du stress thermique et deuxièmement par l'inhibition de la synthèse



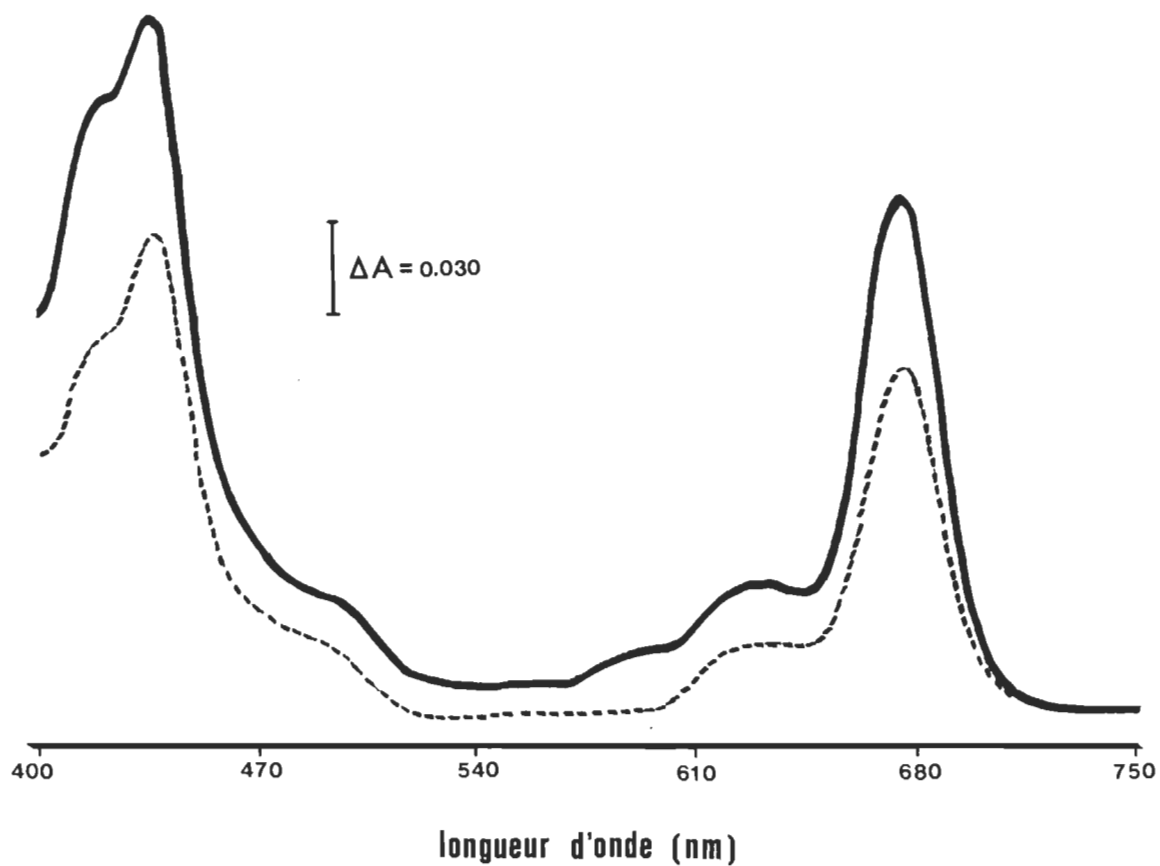


**FIGURE 15** Isolation des complexes pigment-protéin sur gel non dénaturant, la bande (a) représente les complexes isolés de plants d'orge non acclimatés à la chaleur et la bande (b) les complexes isolés de plants acclimatés à 40°C.





**FIGURE 16** Analyse par densitométrie des complexes pigment-protéine provenant, (a) de plants non acclimatés à la chaleur (b) de plants acclimatés à 40°C.

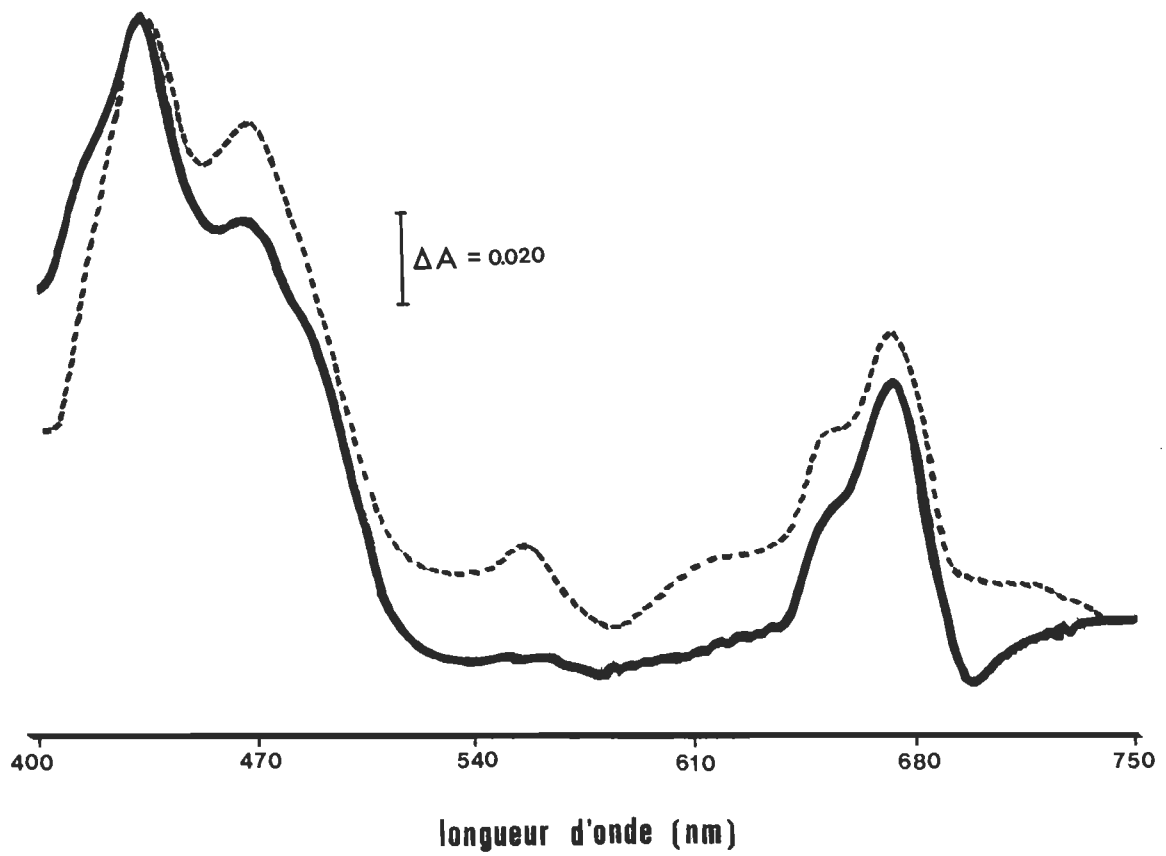


**FIGURE 17** Spectre d'absorption du complexe pigment-protéine (CPI) isolé de plants non acclimatés à la chaleur (trait continu) ou isolé de plants acclimatés à 40°C (tireté).

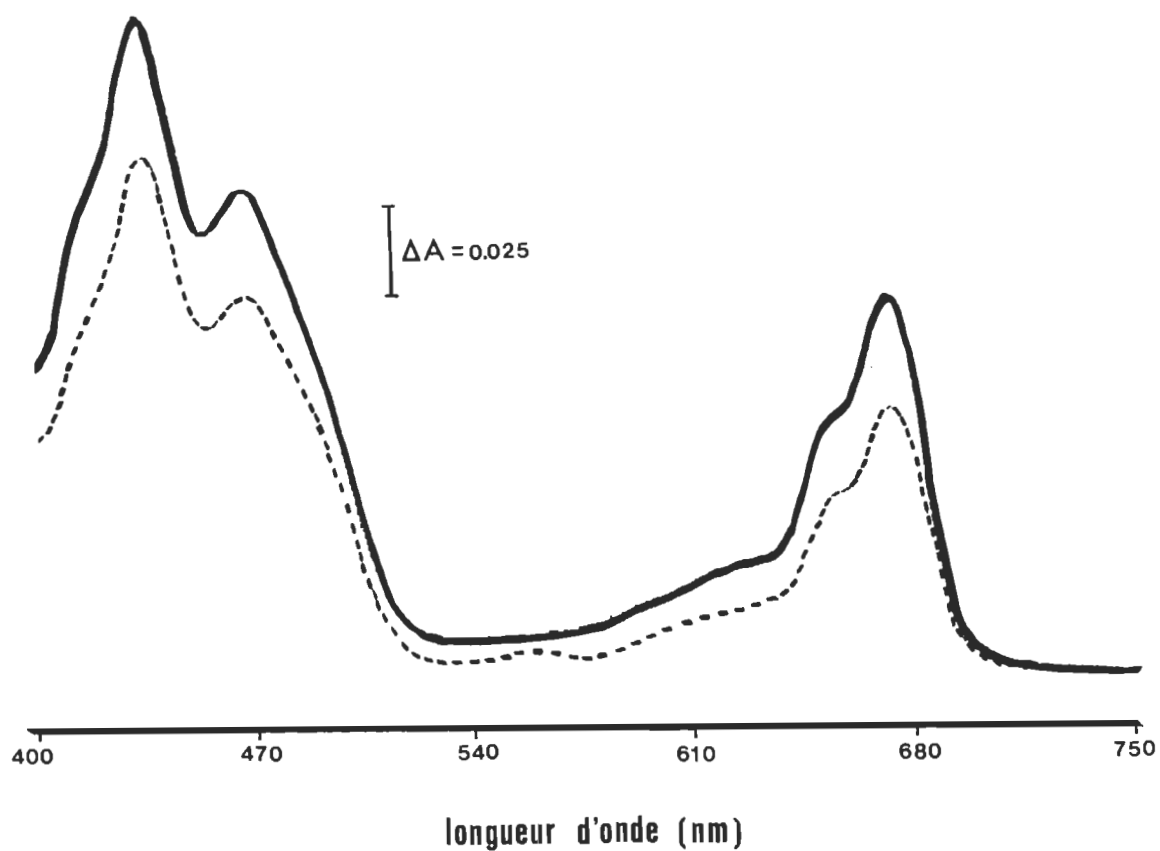
des protéines membranaires lors de l'élévation de température. Puisqu'il n'y a plus de renouvellement des protéines, nous observons une absence de régénération des complexes après leur dégradation. Le spectre suivant (**Figure 18**) représente le complexe CP<sub>II</sub><sup>\*</sup> associé au PS<sub>II</sub>; nous pouvons constater par ce spectre l'augmentation de la forme agrégée du PS<sub>II</sub>. Aucun changement dans la position des maxima d'absorption n'a été observé. En particulier les maxima d'absorption de la Chl-a se retrouvent à 430 et 670 nm tandis que les maxima pour la Chl-b sont notés à 465 et 655 nm, chez les deux types d'extraits membranaires. Le complexe CP<sub>II</sub> (ainsi que les pigments libres) comme le CP<sub>I</sub> a lui aussi subi, par l'effet du stress thermique, une diminution d'absorption de lumière par les Chl a et b. (**Figure 19 et 20**). Chez le complexe CP<sub>II</sub>, comme pour tous les autres complexes, aucune variation dans les maxima d'absorption de la chlorophylle n'a été constatée. Les Chl-a des deux extraits membranaires se retrouvent à des longueurs d'onde de 430 et 670 nm et de 465 et 655 nm pour la Chl-b.

Ces dégradations apportées par le stress thermique influencent-elles l'activité photosynthétique? Ces variations des complexes pigment-protéine dans la plante entière sont-elles aussi néfastes sur la fonction du thylacoïde que portent à croire les études réalisées sur la membrane isolée?

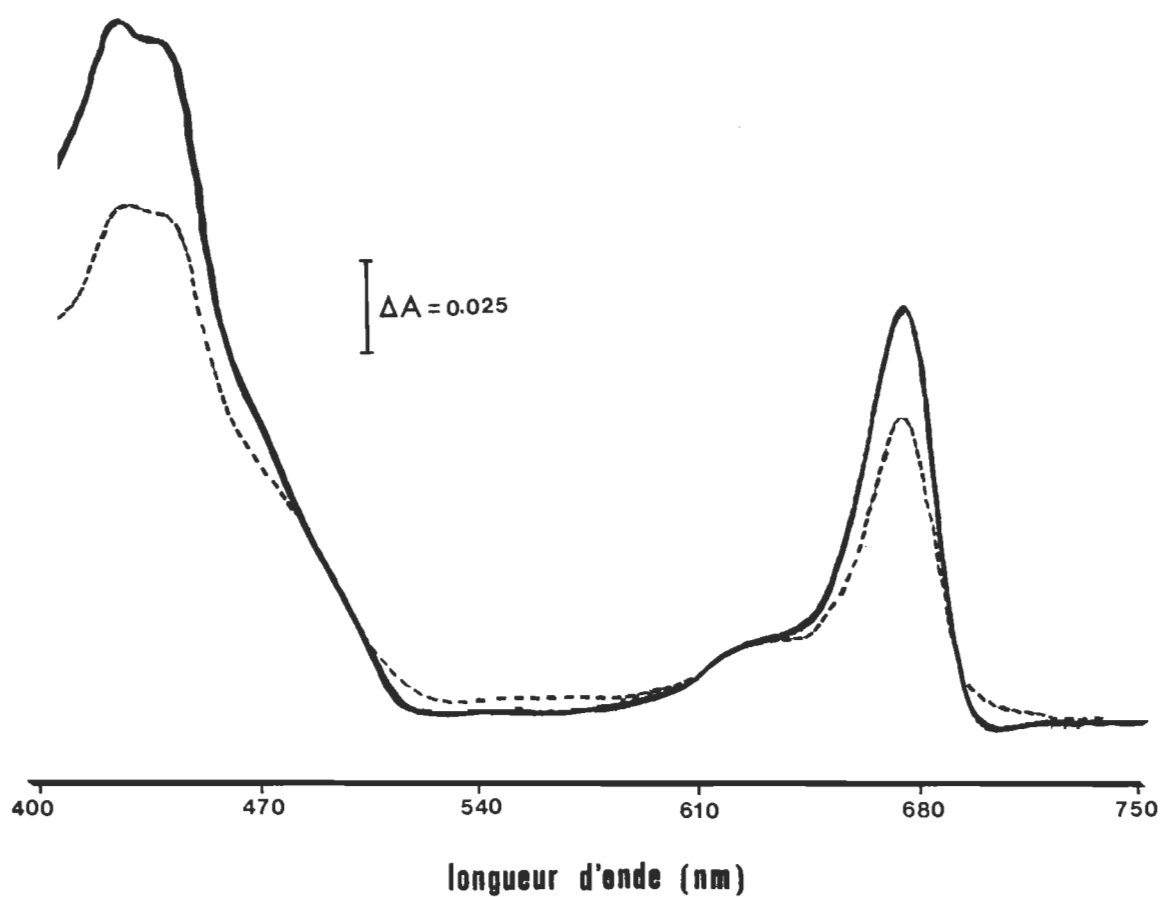
Avant d'étudier l'effet du stress thermique sur la fonction photosynthétique du thylacoïde, nous allons d'abord analyser sa composition polypeptidique plus en détail. Des variations dans la constitution en protéines peuvent influencer l'activité photosynthétique.



**FIGURE 18** Spectre d'absorption du complexe pigment-protéine (CPII\*) isolé de plants non acclimatés à la chaleur (trait continu) ou isolé de plants acclimatés à 40°C (tireté).



**FIGURE 19** Spectre d'absorption du complexe pigment-protéine (CPII) isolé de plants non acclimatés à la chaleur (trait continu) ou isolé de plants acclimatés à 40°C (tireté).



**FIGURE 20** Spectre d'absorption des pigments libres (FP) obtenus de plants non acclimatés à la chaleur (trait continu) ou de plants acclimatés à 40°C (tireté).

## PARTIE II

Nous savons qu'une des réponses apportées par la plante lors d'une élévation de température est de changer sa composition en protéines. Plusieurs études ont démontré une diminution de certains polypeptides lors d'un stress thermique. D'autres études indiquent par contre qu'une série de protéines est synthétisée lors du stress. Ce sont les protéines de choc thermique. Certaines de ces protéines sont nouvellement synthétisées et d'autres sont simplement synthétisées de façon plus abondante. En fait, la présence des protéines du choc thermique a été signalée depuis longtemps. Par contre, la localisation de ces protéines n'est pas encore arrêtée, puisque certains groupes de chercheurs indiquent que les HSP se retrouvent accrochées à la membrane thylacoïdienne tandis que certains autres les qualifient comme étant des protéines solubles retrouvées dans le stroma du chloroplaste (Kloppstech et al., 1985; Chen et al., 1990). Le premier objectif de cette partie est de vérifier la présence d'une ou plusieurs HSP au niveau de la membrane thylacoïdienne. Nous nous intéressons particulièrement à cette membrane et à ses modifications possibles lors du stress, puisque premièrement, elle est le centre vital de l'espèce végétale et deuxièmement, que les travaux effectués antérieurement ainsi que ceux réalisés dans ce présent travail sont rattachés directement à l'activité photosynthétique.

### **5.2 Présence des HSP au niveau de la membrane photosynthétique**

Plusieurs extraits de membranes thylacoïdiennes ont été préparés et par la suite analysés par des techniques

électrophorétiques. Nous retrouvons deux types de membranes, soit les thylacoïdes témoins qui ont été isolés d'orge croissant à 23°C et les thylacoïdes isolés de plants d'orge acclimatés à un choc thermique de 40°C pour une période de trois heures. Nos premiers résultats d'électrophorèse semblent indiquer l'inexistence de changement dans la composition en polypeptides des membranes thylacoïdiennes avant ou après un stress thermique. Si nous observons l'électrophorèse suite à une coloration au bleu de coomasie, nous ne pouvons remarquer aucune perte ou gain de protéines lors d'une élévation de température (**Figure 21**). Une étude plus complète de ce gel a été effectuée par une analyse en densitométrie qui démontre cependant de légères variations dans la composition de la membrane (**Figure 22**). Ces variations quantitatives des protéines sont représentées dans le tableau suivant (**Tableau 2**). Nous constatons une diminution d'environ 10% de chaque protéine membranaire isolée de plants acclimatés. Cependant les protéines associées au PSII semblent peu affectées par le stress thermique, puisqu'aucune diminution n'est apportée pour les protéines du centre réactionnel ainsi que pour les protéines du complexe de dégagement d'oxygène (33, 22 et 17 kDa). Des études ont démontré qu'il y a 60% des protéines de la membrane qui sont éliminées par un stress thermique à 42°C après 3 jours, pour seulement 40% chez les feuilles exposées à 22°C. Cette baisse de 40% est l'élimination normale en protéines suscitée par la sénescence des feuilles (Ferguson et al., 1993). Par contre un stress thermique appliqué pendant seulement 3 h n'apporte qu'une faible diminution des protéines membranaires (5%), suite à nos analyses du densitogramme. Est-ce que cette baisse dans la composition de la membrane influence l'activité photosynthétique? C'est ce que nous allons évaluer dans les expérimentations suivantes. Par contre, ce qui nous intéresse n'est pas l'élimination des protéines membranaires



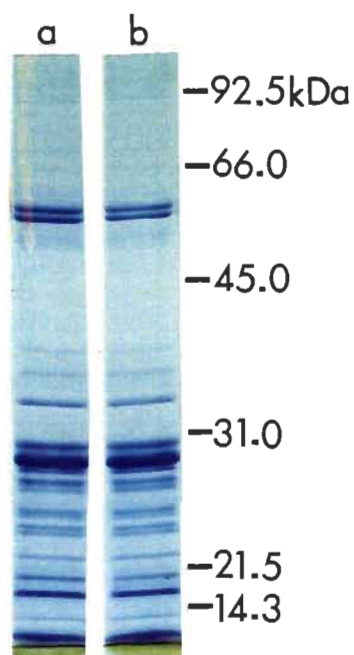
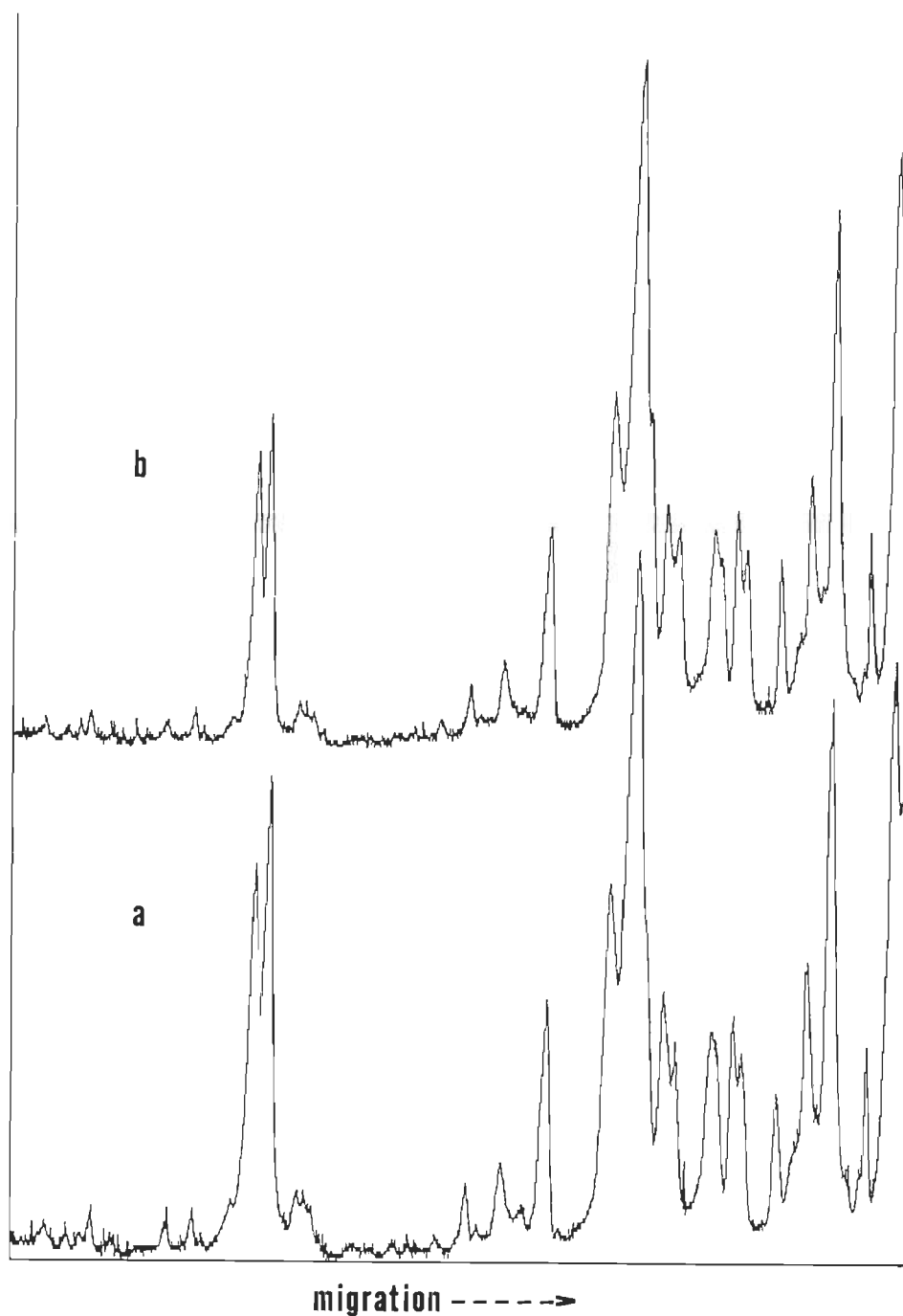


FIGURE 21 Composition polypeptidique de la membrane thylacoïdienne isolée (a) de plants d'orge non acclimatés à la chaleur (temoin à 23°C) (b) de plants d'orges acclimatés à 40°C pendant 3h. Chaque puit contient 20 $\mu$ g de Chl d'extrait membranaire. Utilisation de la technique de coloration au bleu de coomasie.



**FIGURE 22** Analyse par densitométrie de la composition polypeptidique de la membrane thylacoïdienne isolée (a) de plants d'orge non acclimatés à la chaleur (temoin à 23°C) (b) de plants d'orges acclimatés à 40°C pendant 3h.

**TABLEAU 2** Analyse quantitative des protéines membranaires suite au densitogramme, pour les membranes isolées de plants d'orge acclimatés ou non acclimatés à la chaleur. Le pourcentage de dissociation représente la quantité de protéine éliminée des membranes isolées des plants acclimatés en comparaison avec des plants non acclimatés. L'erreur relative sur les mesures est de 3%.

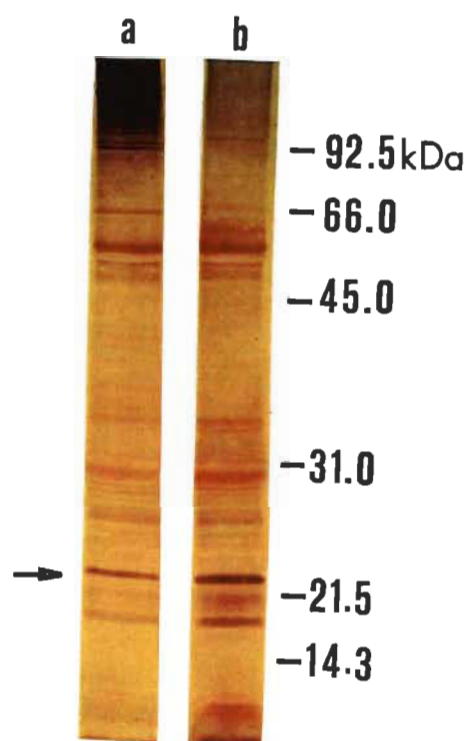
PROTÉINES	ASSOCIÉE AU	P.M. (kDa)	POURCENTAGE DE DISSOCIATION
1	PSII	34	1
2	PSII	32	1
3	PSII	23	3
4	PSII	17	5

durant le stress, mais celles qui sont synthétisées et qui sont susceptibles d'être accrochées à la membrane pour apporter à celle-ci une adaptation possible.

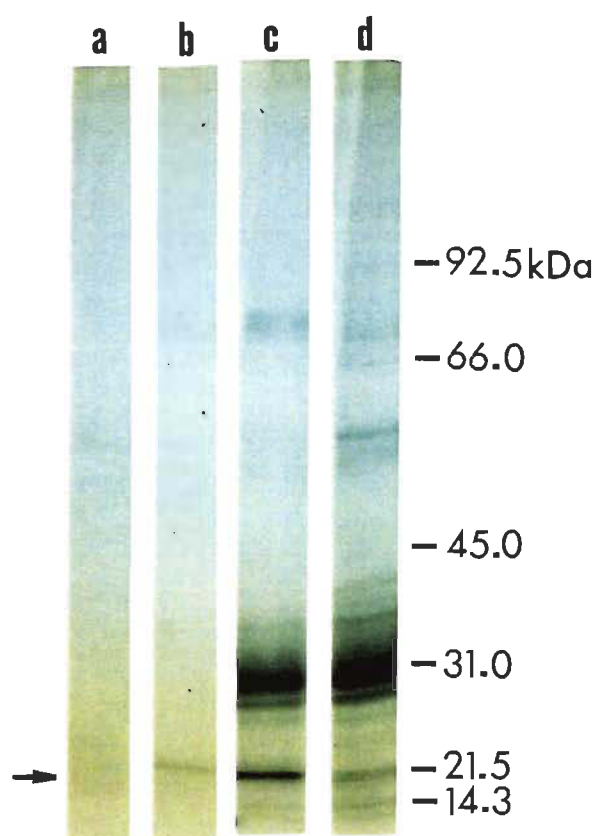
Cependant les résultats contradictoires des études de Santarius (1979) démontrèrent l'inexistence de modification dans la composition polypeptidique des membranes thylacoïdiennes, soit aucune perte ou gain en protéines. Par contre, ces observations donnèrent lieu à une conclusion un peu trop hâtive en excluant les protéines synthétisées lors d'un choc thermique comme responsables de l'acquisition de l'acclimatation ou de la résistance des plantes à la chaleur (Santarius 1979). Des analyses plus précises ainsi que des techniques de révélation ou de coloration des polypeptides plus efficaces doivent être entreprises pour l'identification de protéines nouvellement synthétisées (HSP).

Des techniques de coloration plus précises, telle que la coloration au nitrate d'argent, ont permis de suspecter la présence possible d'une protéine d'environ 21 kDa, comme étant une protéine de choc thermique (**Figure 23**). Cette protéine semble fixée sur la membrane malgré les nombreux lavages de cette dernière. Par cette technique de coloration nous pouvons aussi apercevoir certaines pertes ou baisses dans la synthèse de protéines telles que les protéines de 92 et 66 kDa.

Pour plus de certitude face à l'intégration de la protéine de 21 kDa à la membrane thylacoïdienne (suite à l'électrophorèse par coloration au nitrate d'argent), une incorporation d'acides aminés radioactifs a été utilisée pour permettre l'identification des protéines membranaires qui seront synthétisées lors du stress thermique et qui sont retrouvées au niveau de la membrane photosynthétique (voir Matériel et Méthodes 4.1.3). L'usage de méthionine-S<sup>35</sup> a permis d'identifier, par empreinte photographique des protéines marquées par la radioactivité (autoradiogramme), la présence de la protéine d'environ 21 kDa accolée au thylacoïde (**Figure 24**). Nous pouvons identifier



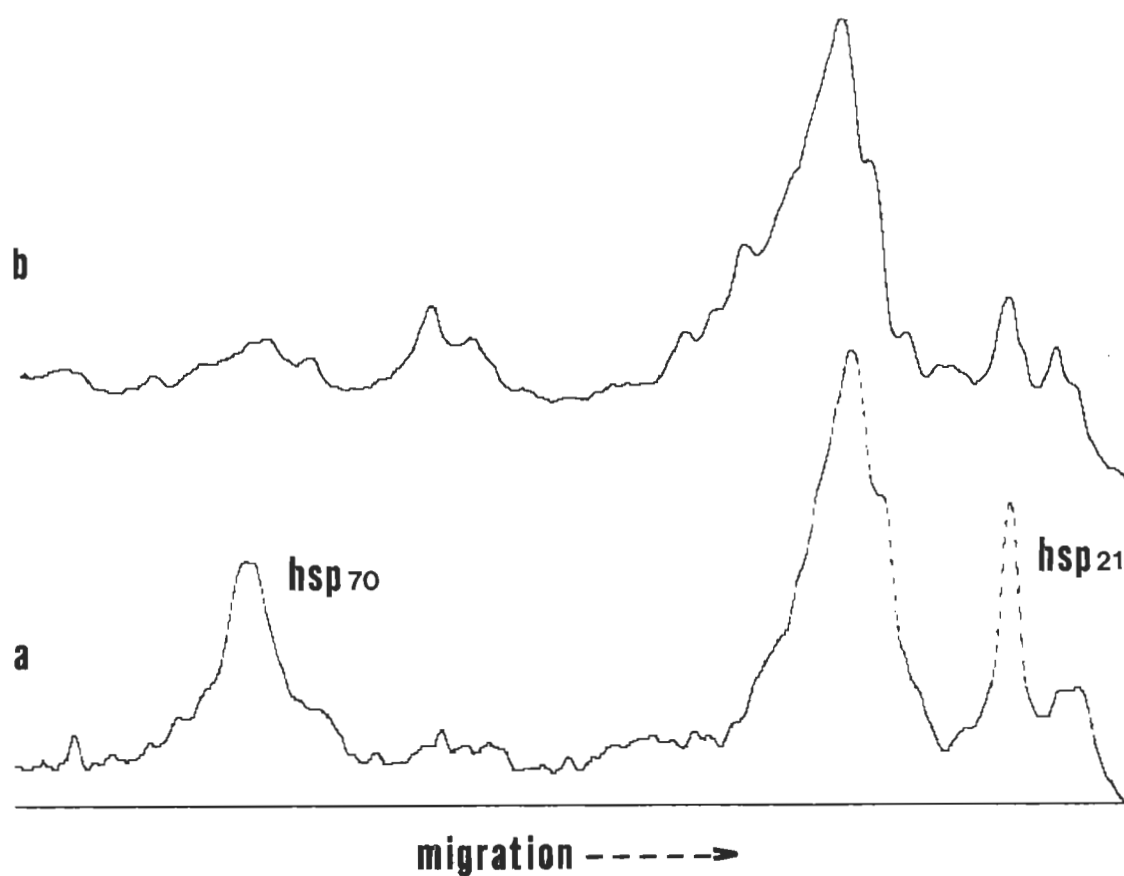
**FIGURE 23** Composition polypeptidique de la membrane thylacoïdienne isolée (a) de plants d'orge non acclimatés à la chaleur (temoin à 23°C) (b) de plants d'orges acclimatés à 40°C pendant 3h. Chaque puit contient 20 $\mu$ g de Chl d'extrait membranaire. Utilisation de la technique de coloration au nitrate d'argent.



**FIGURE 24** Autoradiogramme par marquage au  $^{35}\text{S}$ -methionine des protéines synthétisées lors (c) d'une acclimatation des plants à  $40^{\circ}\text{C}$  pendant 3 h. (d) d'une incubation des plants à  $23^{\circ}\text{C}$  (comme témoin). La colonne (a) représente la partie soluble lors de l'extraction de la membrane des plants non acclimatés à la chaleur, (b) la partie soluble de l'extraction de la membrane des plants acclimatés à  $40^{\circ}\text{C}$ .

grâce à ce gel, la diminution ou l'absence de synthèse de certaines protéines normalement retrouvées au niveau de la membrane telles que les protéines de 55 et 58 kDa. De plus, nous pouvons constater, par l'analyse du densitogramme (**Figure 25**), l'augmentation de 71% dans la synthèse d'une autre protéine, un polypeptide d'environ 70 kDa. La présence de cette protéine dans l'extrait membranaire est beaucoup moins évidente que celle de 21 kDa, si nous considérons seulement le résultat de l'autoradiogramme. Par contre l'analyse du densitogramme ne révèle que 62% d'augmentation de la synthèse de la protéine de 21 kDa. La présence de ce HSP70 au niveau du chloroplaste a été confirmée par plusieurs auteurs (Marshall et Keegstra, 1992; Yalovsky et al., 1992). Selon leurs études, nous prenons conscience du rôle possible de la protéine de 70 kDa. Cette dernière est une protéine "chaperon" nécessaire entre autre à l'intégration de l'une des protéines au niveau du LHC du PSII. Dans plusieurs recherches effectuées *in vivo*, la HSP70 se retrouve soluble dans le stroma du chloroplaste (Key et al., 1981; Marshall et al., 1990; Marshall et Keegstra, 1992). Il est connu qu'une protéine chaperon, une fois son travail accompli est dissociée des complexes protéiques par l'action d'une enzyme. Par nos conditions expérimentales, nous avons isolé la membrane thylacoïdienne de son milieu en empêchant possiblement ainsi l'action de dissociation de l'enzyme sur le HSP70; cela explique donc sa présence inattendue sur le thylacoïde. L'analyse de l'autoradiogramme nous dévoile donc la présence de deux protéines au niveau de la membrane, l'une étant plus abondante que l'autre. Cette intégration, des protéines de 21 kDa et 70 kDa, sur la membrane, est démontrée puisqu'une série de lavages et de centrifugations a été effectuée dans l'intention de confirmer leur assimilation. Cependant la possibilité que ces protéines se présentent sous formes d'agrégats non solubles de même densité que les membranes thylacoïdiennes est envisagée.

A la suite de ces résultats, nous conviendrons d'effectuer toutes nos expériences dans ces mêmes conditions, c'est à dire un stress de



**FIGURE 25** Analyse par densitométrie de l'autoradiogramme. (a) représente la membrane extraite de plants d'orge acclimatés à la chaleur, (b) représente la membrane extrait de plants d'orge non acclimatés (temoin à 23°C).



40°C pour une période de trois heures. Ces conditions permettent la synthèse des protéines de 70 et 21 kDa, et de plus il est évident qu'elles sont suffisantes pour observer ces protéines accolées à la membrane. Ce résultat serait de plus en corrélation avec ceux obtenus par Glaczinski et Kloppstech (1988) qui identifient la protéine de 21 kDa accrochée au thylacoïde. En contrepartie, cette observation vient contredire les études de Vierling (1989) qui indiquent la présence de cette protéine dans la partie soluble du chloroplaste. Il est évident que la HSP21 serait alors une protéine extrinsèque, son attachement à la membrane de façon superficielle permet d'expliquer la difficulté à l'obtenir encore rattachée à celle-ci lors d'une extraction.

Les conditions utilisées nous permettent d'observer la présence évidente des protéines HSP21 et HSP70 de choc thermique au niveau de la membrane thylacoïdienne. Est-ce que la présence de ces protéines entraîne une modification quelconque de l'activité photosynthétique? Nous verrons si la fonction de la membrane photosynthétique est perturbée lorsque les plants d'orge ont supporté une augmentation de température allant jusqu'à 40°C. Certaines études mentionnées au chapitre 3 et basées sur l'étude de la fixation du CO<sub>2</sub> chez les plantes entières indiquent une intégrité de l'activité photosynthétique, malgré un stress thermique. Dans le présent travail, nous voulons confirmer que la membrane thylacoïdienne conserve son activité une fois isolée de son milieu et une fois le stress thermique appliqué sur les plants d'orge.

### **5.3 Adaptation du PSII au stress thermique**

Plusieurs recherches ont été effectuées sur l'étude du comportement de la membrane thylacoïdienne isolée et entre autres du PSII, face à une situation de stress thermique (Santarius, 1973; Bauer et al., 1975; Berry et Bjorkman, 1980; Mohanty, 1987; Bilger et

Schreiber, 1990). De telles études arrivent à la conclusion que dans certains cas, un choc thermique provoque une inactivation du transport d'électrons. Ainsi, il n'y a aucune possibilité d'adaptation de la membrane isolée face à une augmentation de la température. D'autres études encore indiquent qu'un stress thermique même sur la plante entière provoque aussi une diminution de l'activité photosynthétique suite à la très grande sensibilité du PSII sous l'effet de la chaleur. Par contre, certaines recherches ont indiqué que la présence de lumière lors du stress thermique donnerait à la membrane une certaine résistance à la chaleur (Havaux, 1992). Les résultats de la section précédente indiquent que des modifications de la constitution polypeptidique de la membrane sont possibles suite à la synthèse de certaines protéines appelées protéines du choc thermique ou HSP. La synthèse de ces protéines lors d'une élévation de température pourrait constituer l'origine de l'adaptation de l'appareil photosynthétique.

La méthode de travail adoptée ici est d'étudier la membrane thylacoïdienne isolée de chloroplastes ou de plantes entières ayant subi un stress thermique à 40°C pendant 3 h. L'analyse de la condition de l'appareil photosynthétique se fait après le stress (suite à l'incubation de nos plants ou de nos chloroplastes à température élevée) et après l'extraction membranaire et non pendant le stress comme dans les études effectuées par plusieurs chercheurs. Cette approche permet de vérifier si le stress thermique apporte des modifications au niveau de la membrane elle-même et si ces modifications sont conservées après l'avoir extraite de son milieu. Si des moyens d'adaptation ont été réalisés, il est probable que l'activité photosynthétique ne soit pas perturbée. L'effet de la température sera étudié par rapport à l'activité photosynthétique manifestée par le dégagement d'oxygène au niveau du PSII.

i) Premièrement, des extractions membranaires provenant de plantes témoins à 23°C ainsi que de plantes ayant subi le stress thermique de trois heures à 40°C, ont été réalisées. On a par la suite

évalué, en terme d'activité photosynthétique, les deux types de membranes (Tableau 3). Les mesures de dégagement d'oxygène sont effectuées sur quatre extractions différentes et de pousses d'orge variées ce qui explique certaines variations d'activité.

Le stress thermique ne semble pas affecter l'activité photosynthétique. Soit que la membrane thylacoïdienne n'a pas été perturbée par la chaleur ou bien celle-ci c'est tout simplement adaptée. L'activité photosynthétique moyenne recueillie chez les thylacoïdes provenant de plants d'orge non acclimatés à 40°C (donc n'ayant pas subi de stress thermique) est de 175  $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl.h}$ , 171  $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl.h}$  sont dégagées par les membranes extraites de plants d'orge acclimatés à 40°C. Il est ainsi observé que la membrane photosynthétique est capable de poursuivre une activité considérable malgré un stress thermique. Cette résistance au choc thermique est probablement due à une modification ou adaptation de sa structure, mais de quel type d'altération? La présence de la protéine de 21 kDa (et celle de 70 kDa) constitue la modification majeure apportée à la membrane. Il a été mentionné dans un chapitre antérieur que l'implication de la lumière, lors d'un choc thermique, serait le facteur qui entraînerait la protection au PSII. Nos conditions de stress thermique s'effectuent en présence de lumière, ce qui pourrait confirmer la stabilité de ce photosystème. De plus, selon les travaux de Havaux (1992) discutés au chapitre 3, un stress hydrique lors d'un choc thermique serait aussi à l'origine d'une protection du PSII. Ce nouveau stress entraîne une protection par des modifications apportées à la structure lipidique. Comme dans ce travail, nous ne sommes pas intéressés par la partie lipidique du problème, nos conditions de stress thermique ont été réalisées en présence de plusieurs périodes d'arrosage. La résistance observée par le PSII suite à un stress thermique est-elle due simplement à la présence de la lumière ?

**TABLEAU 3**      Activité photosynthétique des membranes thylacoïdiennes extraites de plants d'orges non acclimatés (témoin à 23°C) et de plants d'orge acclimatés à 40°C pendant 3 h. Série de 3 mesures effectuées sur 4 extractions différentes.

---

<b>ACTIVITÉ PHOTOSYNTHÉTIQUE</b> $\mu\text{mol O}_2 / \text{mg Chl. h}$		
	<b>MEMBRANES NON ACCLIMATÉES</b>	<b>MEMBRANES ACCLIMATÉES</b>
<b>Extrait 1</b>	172 $\pm$ 10	186 $\pm$ 10
<b>Extrait 2</b>	179 $\pm$ 15	172 $\pm$ 10
<b>Extrait 3</b>	186 $\pm$ 10	174 $\pm$ 10
<b>Extrait 4</b>	164 $\pm$ 5	153 $\pm$ 10
<b>MOYENNE:</b>	175 $\pm$ 15	171 $\pm$ 10

---

Une modification dans les conditions expérimentales lors de l'administration du stress thermique a été apportée par le retrait de la lumière. L'activité du PSII des membranes extraites de plants acclimatés ou non en absence de lumière ne semble pas être modifiée par rapport à l'activité des membranes obtenues sous des conditions d'illumination lors du stress thermique (**Tableau 4**). Ainsi, la protection du PSII apportée seulement en présence de lumière dans les travaux de Havaux en 1992 n'est pas observée dans nos expérimentations. La lumière n'est pas requise pour l'adaptation aux effets de la chaleur. Une certaine tolérance de la membrane face à la chaleur et en l'absence de lumière a été observée par d'autres chercheurs (Schuster et al., 1988). Ils affirmèrent que le dégagement d'oxygène n'est pas inhibé de façon significative dans les cellules (*Chlamydomonas*) exposées à 42°C pour 3 h en l'absence de lumière. Cette étude ainsi que nos observations écartent la possibilité que seule la présence de lumière peut entraîner une conservation indéniable de l'activité photosynthétique.

La protection de ce photosystème est donc indépendante des conditions lumineuses et serait par contre dépendante d'une autre modification apportée par la chaleur.

ii) Est-ce que cette modification est apportée par la plante entière ou si le fait de traiter à la chaleur des chloroplastes isolés permet aussi à la membrane d'acquérir cette résistance? Les analyses suivantes ont été réalisées sur des membranes thylacoïdiennes extraites de chloroplastes non acclimatés ou acclimatés à la chaleur par une exposition à 40°C pendant 3 h. Premièrement il est indispensable d'analyser notre méthode d'extraction des chloroplastes à partir des plants d'orge. Ainsi une vérification de l'intégrité de ces organites est nécessaire. Par des mesures en dégagement d'oxygène, il est possible de vérifier l'état de nos chloroplastes extraits (voir Matériel et Méthode 4.4.3) (**Tableau 5**).

**TABLEAU 4**      Activité photosynthétique des membranes thylacoïdiennes extraites de plants d'orge témoin à 23°C, et de plants d'orge acclimatés à 40°C pendant 3 h. en l'absence de lumière. Série de 3 mesures effectuées sur deux extractions différentes.

ACTIVITÉ PHOTOSYNTHÉTIQUE $\mu\text{mol O}_2 / \text{mg Chl. h}$		
	MEMBRANES NON ACCLIMATÉES	MEMBRANES ACCLIMATÉES
Extrait 1	179 $\pm$ 10	172 $\pm$ 10
Extrait 2	164 $\pm$ 10	157 $\pm$ 10
MOYENNE:	172 $\pm$ 10	165 $\pm$ 10

**TABEAU 5** Pourcentage de chloroplastes intacts dans l'extrait calculé par une comparaison des activités photosynthétiques de chloroplastes (CHL) avant et après éclatement par choc osmotique. L'accepteur d'électrons utilisé dans ces mesures est le ferricyanure de potassium (50 mM). Les mesures sont effectuées suite à quatre extractions de chloroplastes. L'erreur sur les pourcentages de chloroplastes intacts est au maximum de 10 %.

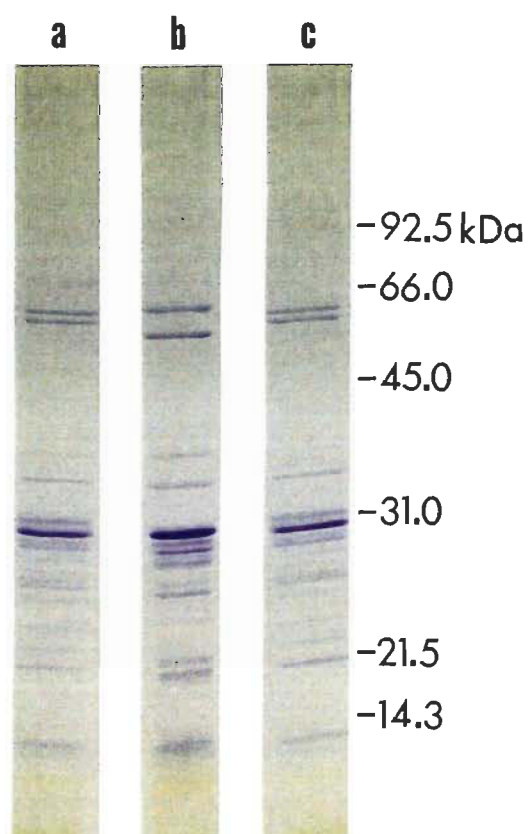
		ACTIVITÉ PHOTOSYNTHÉTIQUE $\mu\text{mol O}_2 / \text{mg Chl. h}$	POURCENTAGE DE CHL. INTACTS (%)
		AVANT ÉCLATEMENT	APRÈS ÉCLATEMENT
Extrait 1		47	115
Extrait 2		34	100
Extrait 3		41	125
Extrait 4		30	100

L'utilisation de chloroplastes intacts à 70% d'intégrité semble être convenable selon la littérature (Walker et al., 1987). Une fois que les chloroplastes ont été extraits des plants d'orge, une portion de cet extrait est placée à 23°C en présence de lumière comme témoin et un second échantillon est incubé à 40°C aussi sous illumination pour trois heures. De ces chloroplastes, une extraction de la membrane thylacoïdienne est effectuée. Avant de constater les conséquences du choc thermique sur l'activité photosynthétique de la membrane, un examen, par méthode électrophorétique, de la composition polypeptidique de la membrane isolée à partir de chloroplastes et de la membrane isolée de plants d'orge est nécessaire. Deux méthodes d'extraction des thylacoïdes à partir de chloroplastes ont été employées, soit en utilisant la même méthode et les mêmes tampons que lors d'une extraction à partir des plantes intactes (Goetze et Carpentier, 1990) ou par la méthode de Walker (Walker et al., 1987) (voir Matériel et Méthodes 4.2.2). Les résultats de l'électrophorèse nous montrent bien que par la méthode de Walker (colonne c), les membranes thylacoïdiennes sont susceptibles d'être comparées aux thylacoïdes isolés de plantes intactes (colonne a) (**Figure 26**). La composition en protéines de la membrane thylacoïdienne extraite par l'autre méthode (colonne b), nous montre l'absence de certaines protéines (telle que la 31 kDa) et la présence plus marquée de certaines autres (**Figures 27 et 28**). L'analyse des densitogrammes nous confirme le tout en démontrant une similitude entre la composition protéique des thylacoïdes extraits des chloroplastes par la méthode de Walker et ceux extraits de plants d'orge.

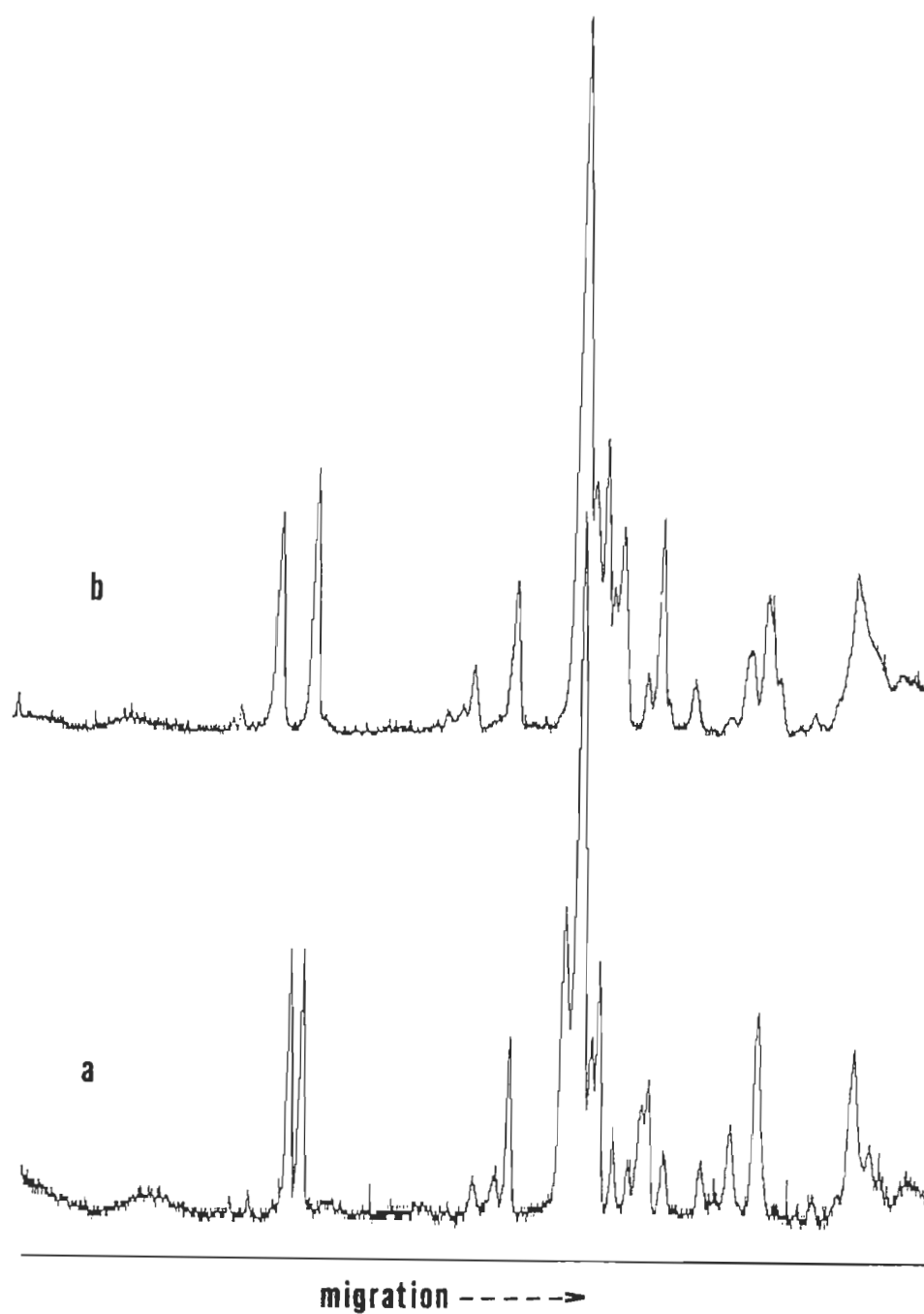
Suite à ces vérifications, l'activité des membranes thylacoïdiennes provenant de chloroplastes témoins et de chloroplastes traités au stress thermique, a été évaluée (**Tableau 6**).

L'activité photosynthétique moyenne retrouvée par les membranes isolées de chloroplastes (soit 117  $\mu\text{mol O}_2/\text{mg.Chl.h}$ ) est inférieure à l'activité des membranes provenant de plantes intactes

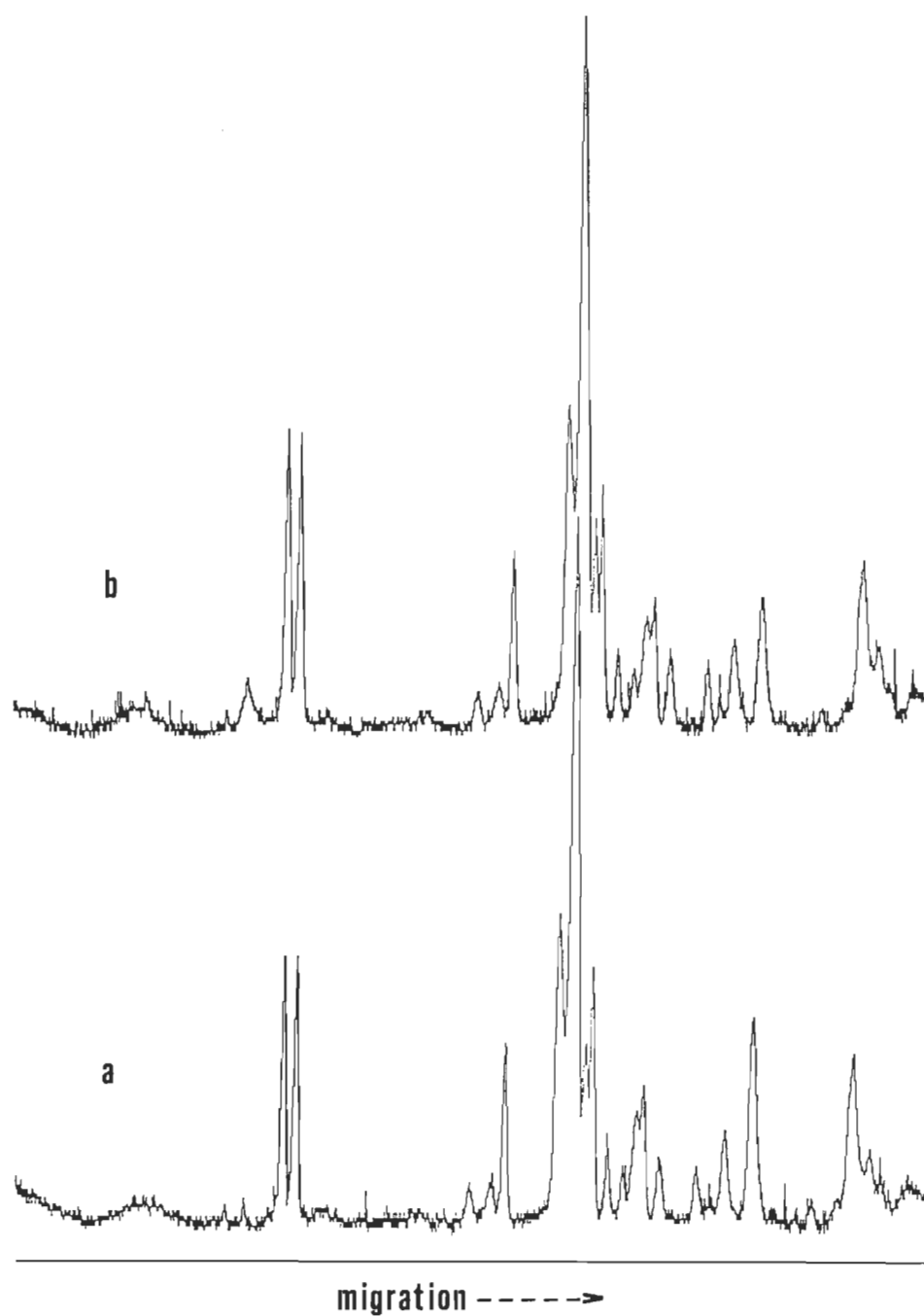




**FIGURE 26** Composition polypeptidique de la membrane thylacoïdienne extraite (a) de plants d'orge, (b) de chloroplastes par la même méthode de que l'extraction des thylacoïdes à partir de plants d'orge (c) de chloroplastes par la méthode de Walker. Chaque puit contient: 20 $\mu$ g de Chl. d'extrait membranaire.



**FIGURE 27** Densitogrammes comparant deux méthodes d'extraction de la membrane thylacoïdienne. (a) membranes extraites de plants d'orge, (b) membranes extraites à partir de chloroplastes selon la méthode d'extraction à partir de plants.



**FIGURE 28** Densitogrammes comparant deux méthodes d'extraction de la membrane thylacoïdienne. (a) membranes extraites de plants d'orge, (b) membranes extraites à partir de chloroplaste selon la méthode de Walker.

**TABLEAU 6**      Activité photosynthétique des membranes thylacoïdiennes extraites de chloroplastes témoins à 23°C et de chloroplastes ayant supporté un stress thermique à 40°C pendant 3 h. Série de 3 mesures effectuées sur trois extractions différentes.

<div> <div>-----</div> <div> <b>ACTIVITÉ PHOTOSYNTHÉTIQUE</b>  <math>\mu\text{mol O}_2 / \text{mg Chl. h}</math> </div> <div>-----</div> </div>		
	MEMBRANES NON ACCLIMATÉES	MEMBRANES ACCLIMATÉES
Extrait 1	117 $\pm$ 10	72 $\pm$ 10
Extrait 2	114 $\pm$ 5	93 $\pm$ 5
Extrait 3	120 $\pm$ 5	67 $\pm$ 5
MOYENNE:	117 $\pm$ 10	77 $\pm$ 10
-----		

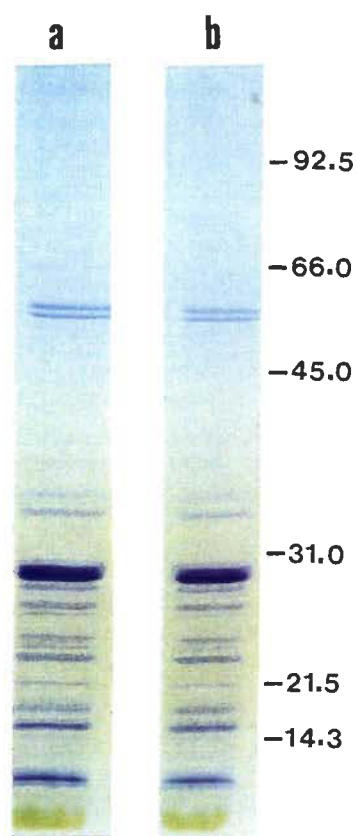
(175  $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl h}$ ). Cette baisse dans l'activité est probablement due à des manipulations supplémentaires apportées par l'extraction des chloroplastes suivie de l'extraction des thylacoïdes. Si nous comparons l'activité des deux types de thylacoïdes, nous constatons qu'elle est différente, du fait que l'activité moyenne des membranes isolées de chloroplastes traités à 40°C est de 77  $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl.h}$  est ainsi plus faible que l'activité des témoins 117  $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl.h}$ . Des études réalisées en 1977 par Ageeva, indiquent que la présence de la lumière lors du stress thermique sur les chloroplastes est nuisible à l'activité du PSII (Ageeva, 1977). Puisque les conditions de ce stress thermique sont effectuées sous illumination, il est compréhensible d'obtenir une baisse de l'activité photosynthétique de la membrane chez les chloroplastes traités à la chaleur. Une hypothèse serait que la lumière utilisée lors du stress thermique sur les chloroplastes entraîne une photoinhibition ou une dégradation de certains complexes pigment-protéine qui entraînerait une inhibition de l'activité photosynthétique. L'utilisation de la lumière sur la plante entière serait alors moins néfaste que sur le chloroplaste isolé. D'autres études, effectuées par Maison, démontrèrent aussi une baisse de l'activité du PSII (baisse du dégagement d'oxygène) lors d'une exposition des chloroplastes à la chaleur mais cette fois en l'absence de lumière. (Maison, 1977). Ainsi l'utilisation de la lumière, sur les chloroplastes, dans nos conditions expérimentales n'est pas nuisible à l'activité photosynthétique des membranes.

La résistance apportée chez les thylacoïdes isolés de plantes entières est donc une modification apportée par la cellule. Le chloroplaste seul ne peut y accéder. L'hypothèse formulée suite à ces observations donnerait à la présence des protéines de choc thermique de 21kDa ainsi que 70 kDa (tous deux d'origine nucléaire) accolées à la membrane un rôle principal dans la résistance du PSII face au stress thermique.

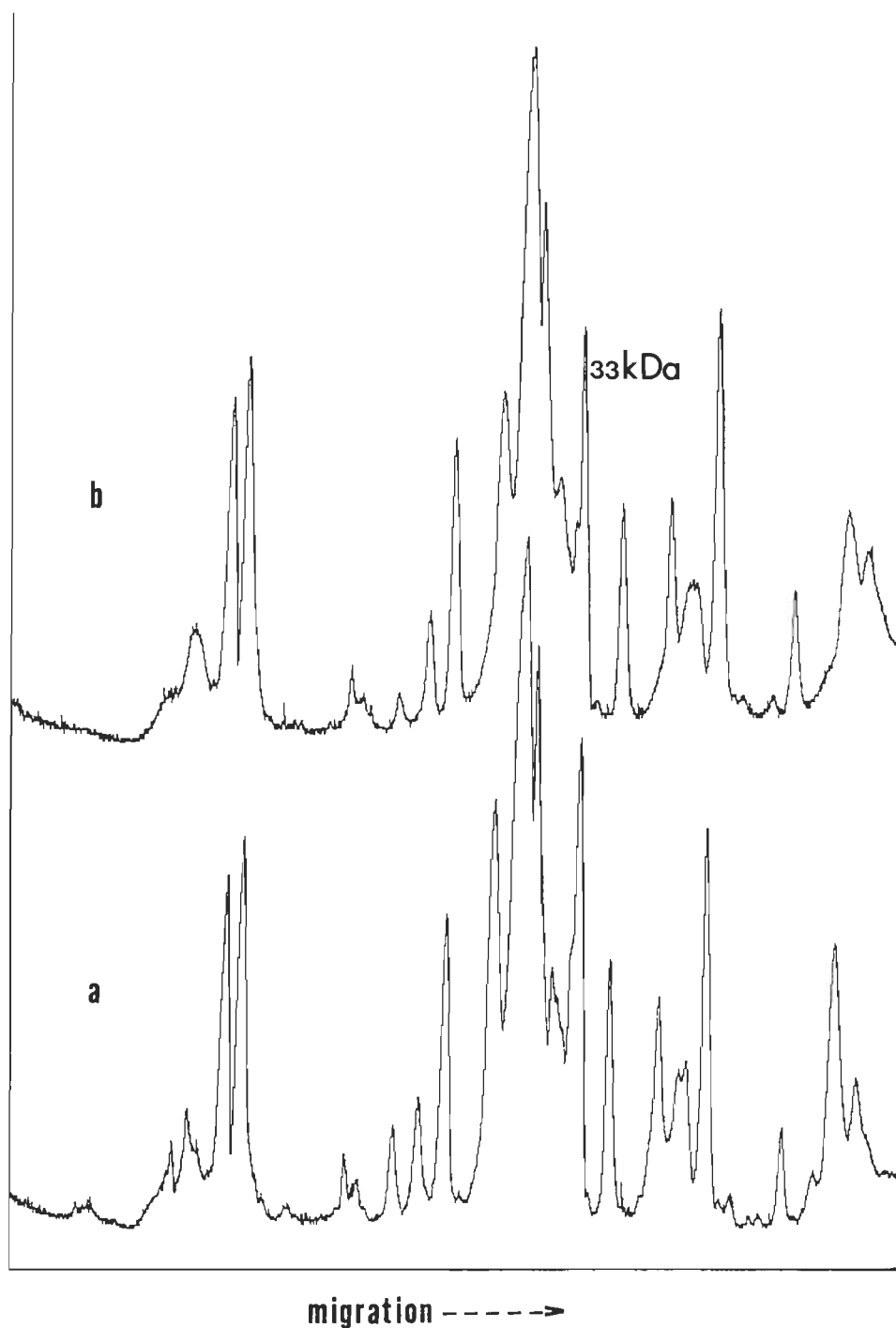
L'analyse de la composition polypeptidique de la membrane thylacoïdienne isolée de chloroplastes acclimatés ou non acclimatés, ne démontre pas de modifications apparentes. (**Figures 29 et 30**). Par contre une analyse du densitogramme révèle que certaines modifications polypeptidiques seraient probablement à l'origine de la diminution de l'activité photosynthétique observée précédemment (**Tableau 7**). La membrane thylacoïdienne isolée de chloroplastes acclimatés à 40°C subit une diminution polypeptidique de 5 à 15% selon les protéines. Par contre on observe une diminution drastique de 53% pour la protéine de 33 kDa, ainsi qu'une baisse de 30% pour la protéines de 17 kDa. Ces polypeptides constituent le complexe de dégagement d'oxygène. Ainsi l'absence ou la dissociation de ces protéines extrinsèques inhibe la fonction du PSII en empêchant la photolyse de l'eau de se réaliser. Des études sur la membrane isolée indiquent que ce complexe est susceptible à l'effet de la chaleur (Sabat et Mohanty, 1989). Par conséquent et contrairement à ce dont nous avons observé chez la membrane isolée de plants d'orge, le complexe n'est pas protégé sous l'effet de la chaleur.

Suite à nos observations précédentes sur la présence de protéines de stress thermique au niveau de thylacoïdes isolés de plants d'orge (Figure 24), nous pouvons suggérer que ces HSP soient à l'origine de la conservation ou de l'intégrité des protéines extrinsèques du centre réactionnel. Ces polypeptides (HSP), d'origine nucléaire, sont possiblement transportés à l'intérieur du chloroplaste pour interagir au niveau du complexe de dégagement d'oxygène. Puisque la synthèse des HSP est impossible lors de l'acclimatation des chloroplastes nous pouvons affirmer que c'est leur présence qui permet l'intégrité du complexe et par le fait même la conservation de l'activité photosynthétique dans la plante.

Par contre l'activité photosynthétique de 77  $\mu\text{mol O}_2$  / mg Chl.h, que nous pouvons quand même retrouver dans l'extrait membranaire de chloroplastes acclimatés est due aux complexes de dégagement



**FIGURE 29** Composition polypeptidique de la membrane thylacoïdienne isolée (a) de chloroplastes non acclimatés (b) de chloroplastes acclimatés à 40°C pour 3 h. Chaque puit contient 20 µg de Chl d'extrait membranaire.



**FIGURE 30** Densitogrammes représentant la composition polypeptidique de la membrane thylacoïdienne isolée (a) de chloroplastes non acclimatés (témoin à 23°C) (b) de chloroplastes acclimatés à 40°C pendant 3 h. Chaque puit contient 20 µg de Chl d'extrait membranaire.



**TABLEAU 7** Analyse quantitative des protéines membranaires suite au densitogramme, pour les membranes isolées de chloroplastes acclimatés ou non acclimatés à la chaleur. Le pourcentage de dissociation représente la quantité de protéine éliminée des membranes isolées des chloroplastes acclimatés en comparaison avec des chloroplastes non acclimatés. L'erreur relative sur les mesures est de 4%.

PROTÉINES	ASSOCIÉE AU	P.M. (kDa)	POURCENTAGE DE DISSOCIATION
1	PSII	34	11
2	PSII	32	53
3	PSII	23	—
4	PSII	17	30

d'oxygène non encore affectés au cours du traitement et peut-être aussi à la présence des deux autres protéines extrinsèques (soit 22 et 17 kDa) qui peuvent probablement maintenir une faible activité de dégagement d'oxygène malgré l'absence du polypeptide de 33 kDa.

#### 5.4 Thermotolérance:

La thermotolérance a été observée chez plusieurs espèces végétales, elle se caractérise par le fait que les organismes qui ont préalablement subi une acclimatation à la chaleur deviennent par conséquent tolérants à une température habituellement létale ou simplement à tout autre température élevée (Pearcy et al. 1977).

Les membranes que nous avons jusqu'à maintenant étudiées sont soit résistantes à l'effet d'un stress thermique (celles isolées de plants d'orge) ou susceptibles à cette augmentation de température (celles isolées de chloroplastes). Mais comment celles-ci vont réagir à un second stress thermique?

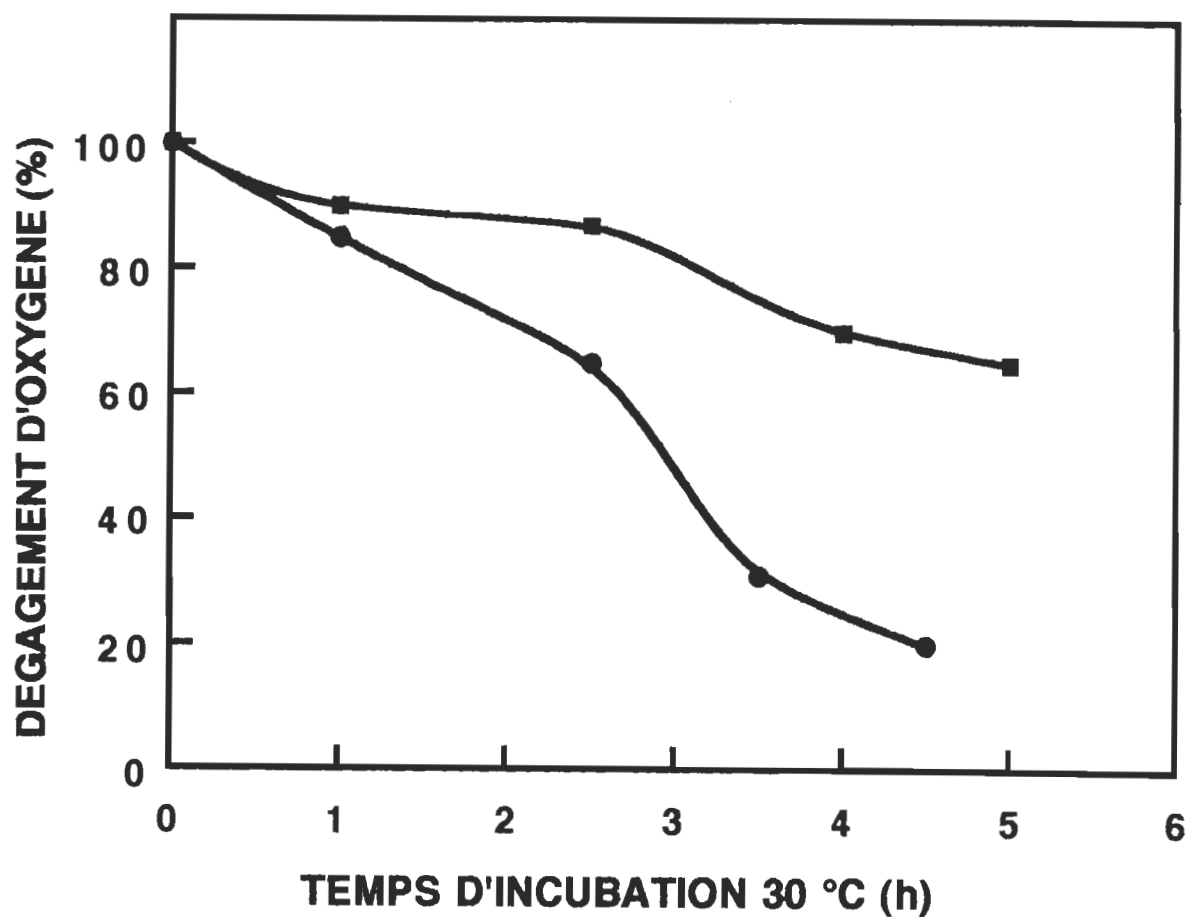
Suite à leur extraction, les membranes sont incubées dans un bain d'eau thermostatée à 30°C dans le but de vérifier leur stabilité en terme d'activité photosynthétique en fonction du temps d'incubation. L'étude de l'acclimatation de notre matériel biologique s'est effectuée non pas à une température habituellement létale, mais à une température quand même assez élevée ( 30°C ) pour observer l'influence de celle-ci sur l'activité photosynthétique.

Selon plusieurs auteurs, le stress thermique induit une décroissance du transport d'électrons, (suite à une dénaturation des protéines, à une variation de la fluidité de la membrane etc...) (Santarius, 1973, 1975; Al-Khatib, 1990). Nos résultats sur l'influence du temps d'incubation à 30°C de nos thylacoïdes non acclimatés à la

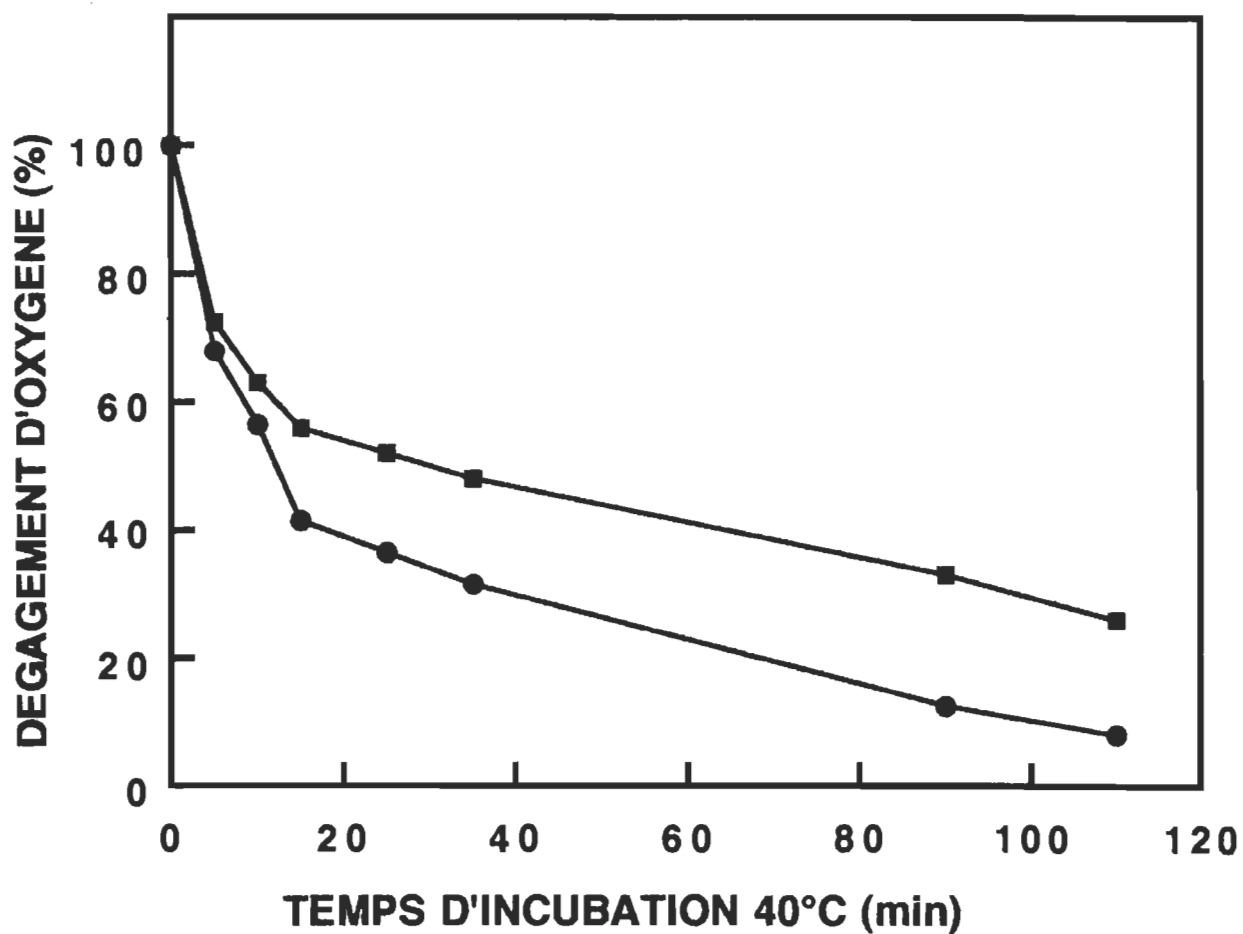
chaleur démontrent qu'il y a effectivement décroissance de l'activité photosynthétique (**Figure 31**). Nous constatons ainsi une inhibition du dégagement d'oxygène en fonction du temps d'incubation des thylacoïdes à 30°C. Il est important, par contre, de remarquer que les membranes provenant de plants acclimatés semblent plutôt supporter cette chaleur imposée plus facilement que le témoin. Après cinq heures d'incubation à 30°C, on constate seulement près de 40% d'inhibition pour les membranes isolées d'orge acclimatée à 40°C par contre 80% d'inhibition est remarquée pour les membranes provenant de plants d'orge non acclimatés (à 23°C). La conclusion est donc inévitable, il y a une certaine adaptation ou résistance de l'appareil photosynthétique provenant de plantules d'orge qui ont subi préalablement un stress thermique de trois heures à 40°C. Nous pouvons ici parler d'adaptation de la membrane puisque les résultats sont concluants en indiquant une résistance deux fois plus grande pour les membranes acclimatées à 40°C.

Nous avons vérifié la capacité de cette adaptation de l'appareil photosynthétique à des températures supérieures à 30°C. Les membranes (soit témoins et acclimatées) sont alors incubées dans un bain d'eau thermostatée à 40°C (**Figure 32**). Un stress thermique aussi fort affecte autant les membranes témoins que celles déjà acclimatées à la chaleur. Sous cette température élevée, les thylacoïdes sont surement déstabilisées par des modifications au niveau lipidique. L'adaptation acquise ne semble pas être suffisante pour empêcher l'inhibition de l'activité photosynthétique.

Une autre analyse fut d'observer le comportement des membranes thylacoïdiennes provenant de plantes acclimatées ou non acclimatées mais cette fois, en l'absence de lumière. L'attitude de ces thylacoïdes vis-à-vis une incubation à 30°C est semblable au comportement des membranes en présence de lumière (voir figure 31). Ainsi la présence de lumière lors du stress thermique n'est pas un facteur influençant l'adaptation de l'appareil photosynthétique. Il semblerait que les



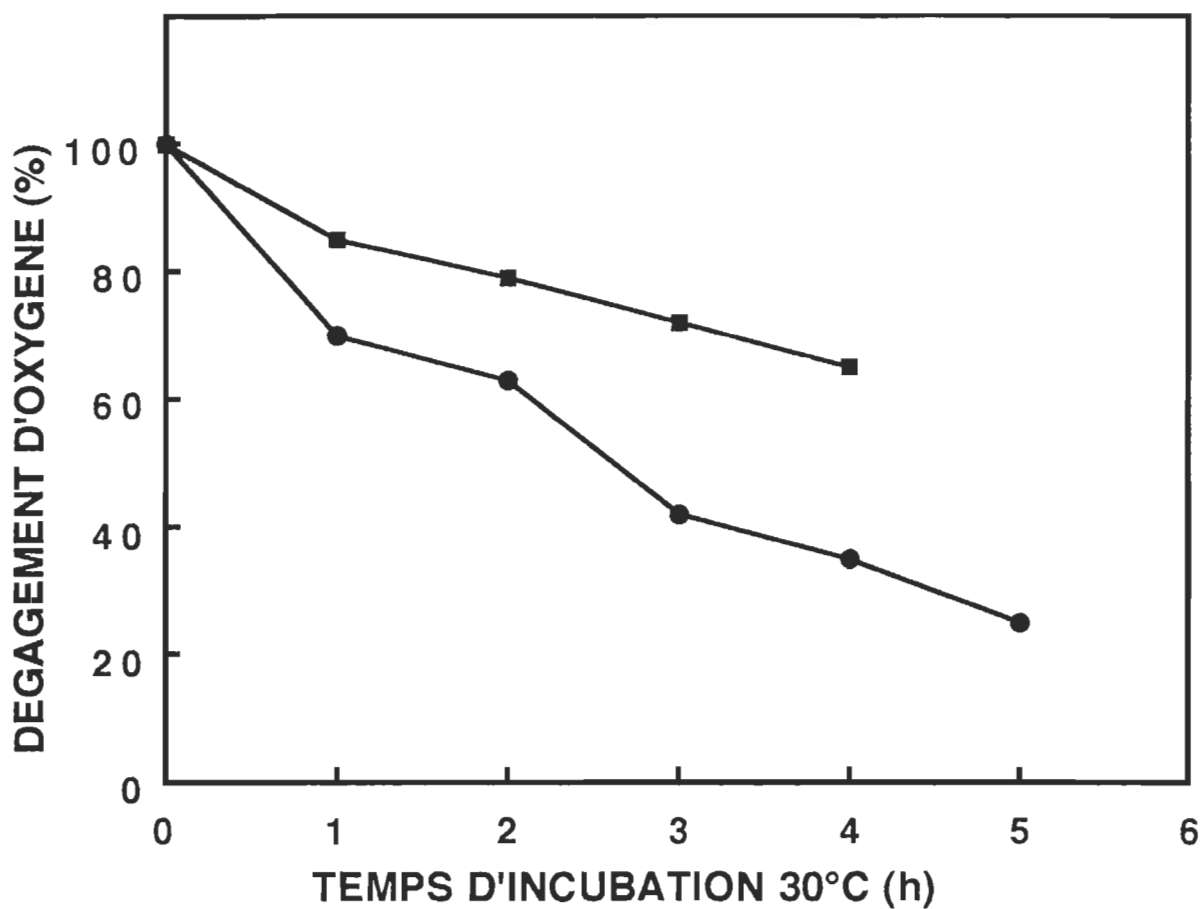
**FIGURE 31** Pourcentage de dégagement d'oxygène par la membrane thylacoïdienne en fonction du temps d'incubation à 30°C. ( ■ ) représente la membrane isolée de plants d'orge acclimatés à 40°C pendant 3 h ( ● ) membrane isolée de plants d'orge non acclimatés. L'erreur sur les mesures est au maximum de 5 %.



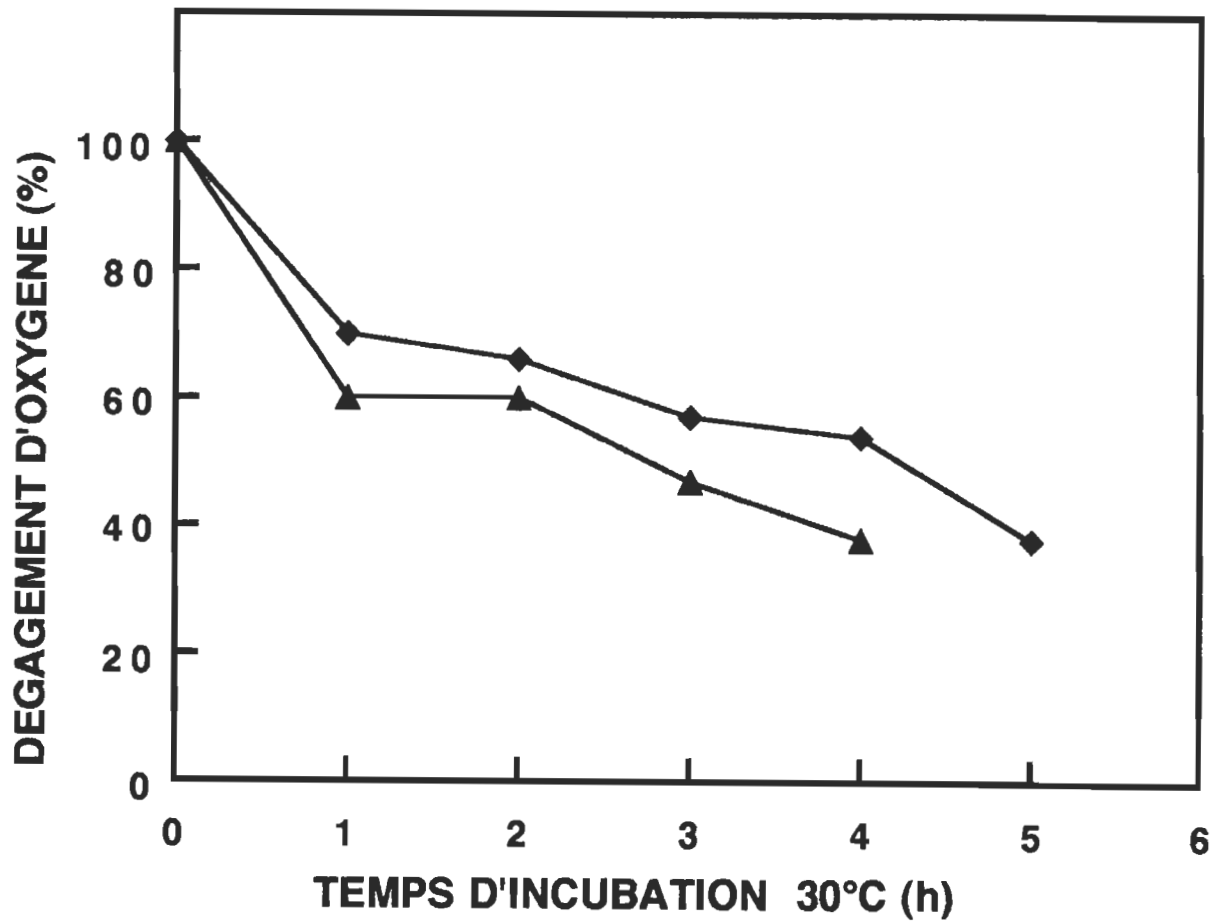
**FIGURE 32** Pourcentage de dégagement d'oxygène par la membrane thylacoïdienne en fonction du temps d'incubation à 40°C ( ■ ) représente la membrane isolée de plants d'orge acclimatés à 40°C pendant 3 h ( ● ) membrane isolée de plants d'orge non acclimatés. L'erreur sur les mesures est au maximum de 3%.

membranes acclimatées à 40°C en l'absence de lumière sont aussi bien préparées pour affronter une incubation à 30°C (**Figure 33**).

Est-ce que l'adaptation que nous venons de constater sur nos membranes acclimatées à partir de plants d'orge est présente chez celles isolées de chloroplastes acclimatés? Les thylacoïdes isolées de chloroplastes, soit témoins ou ayant subi une acclimatation à 40°C, sont alors soumis aux mêmes tests de résistance. L'adaptation des membranes provenant de chloroplastes acclimatés à 40°C semble inexistante (**Figure 34**). Ainsi nous pouvons constater une inhibition de l'activité photosynthétique des deux types de thylacoïdes en fonction du temps d'incubation à 30°C. Aucune stabilité pour la membrane acclimatée dans le chloroplaste n'est observée contrairement à l'adaptation obtenue à partir des plantes entières. Comment expliquer qu'une membrane dans son milieu naturel (plante intacte) peut se modifier ou apporter des changements dans sa composition membranaire, tandis que l'isolation des chloroplastes ne permet pas aux membranes d'accéder à ces modifications pour inciter une tolérance à la chaleur? Comme déjà mentionné dans le chapitre 3, l'implication des HSP lors du stress thermique pourrait être la source de l'acquisition de la thermotolérance chez la membrane photosynthétique. La synthèse des protéines du choc thermique, telles que HSP21 et HSP70 est d'origine nucléaire. Si l'adaptation à la chaleur est impossible pour la membrane acclimatée au niveau du chloroplaste isolé, c'est que la synthèse de protéines du choc thermique y est inexistante. Cette thermotolérance ou adaptation de la membrane à la chaleur, pourrait alors être associée à la présence des protéines du choc thermique. Dans notre cas, la présence des protéines de 21 kDa et 70 kDa fixées au niveau de la membrane thylacoïdienne nous laisse croire en leur rôle de protection. De plus les analyses des densitogrammes (**Figures 22 et 30**) démontrèrent que le complexe de dégagement d'oxygène de la membrane isolée de chloroplastes est perturbé par la dissociation de 53 % de la protéine de 32 kDa sous l'effet de la chaleur. Par contre la présence des protéines de stress



**FIGURE 33** Pourcentage de dégagement d'oxygène par la membrane thylacoïdienne en fonction du temps d'incubation à 30°C ( ■ ) représente la membrane isolée de plants d'orge acclimatés à 40°C pendant 3 h en absence de lumière ( ● ) membrane isolée de plants d'orge non acclimatés. L'erreur sur les mesures est au maximum de 3%.



**FIGURE 34** Pourcentage de dégagement d'oxygène par la membrane thylacoïdienne en fonction du temps d'incubation à 30°C ( ▲ ) représente la membrane isolée de chloroplastes acclimatés à 40°C pendant 3 h ( ◆ ) membrane isolée de chloroplastes non acclimatés. L'erreur sur les mesures est au maximum de 5%.



thermique semble être responsable de l'intégrité du complexe chez la plante entière. Ainsi l'absence des HSP explique l'impossibilité de l'appareil photosynthétique des chloroplastes à supporter une incubation à 30°C.

L'usage d'antibiotiques spécifiques permet d'inhiber la synthèse de protéines soit d'origine chloroplastique comme par l'utilisation du chloramphénicol ou de l'inhibition des protéines nucléaire par l'action du cycloheximide (ce dernier empêchant la synthèse des HSP). L'orientation de notre étude sur l'utilisation d'antibiotiques nous permet d'étudier l'implication possible des HSP lors de l'acquisition de la thermotolérance de nos membranes thylacoïdiennes chez la plante intacte.

#### **5.4.1 Thermotolérance en présence d'antibiotiques spécifiques.**

Par ces expériences nous voulons vérifier si la stabilité de l'activité photosynthétique observée en 5.3 est aussi possible en présence d'antibiotiques. L'utilisation du chloramphénicol sera pour permettre l'inhibition des protéines provenant du génome chloroplastique (Lindholm et al., 1987; Greer et al., 1986). C'est un inhibiteur spécifique qui, en se fixant à la sous-unité 70S des ribosomes chloroplastiques, bloque l'activité de l'enzyme peptidyl transférase (Vezquez, 1974). Tandis que l'utilisation du cycloheximide sera pour accéder à l'inhibition des protéines nucléaires exclusivement. Cet antibiotique apporte une inhibition de la translation au niveau de la sous-unité 80S des ribosomes (Schuster et al., 1988).

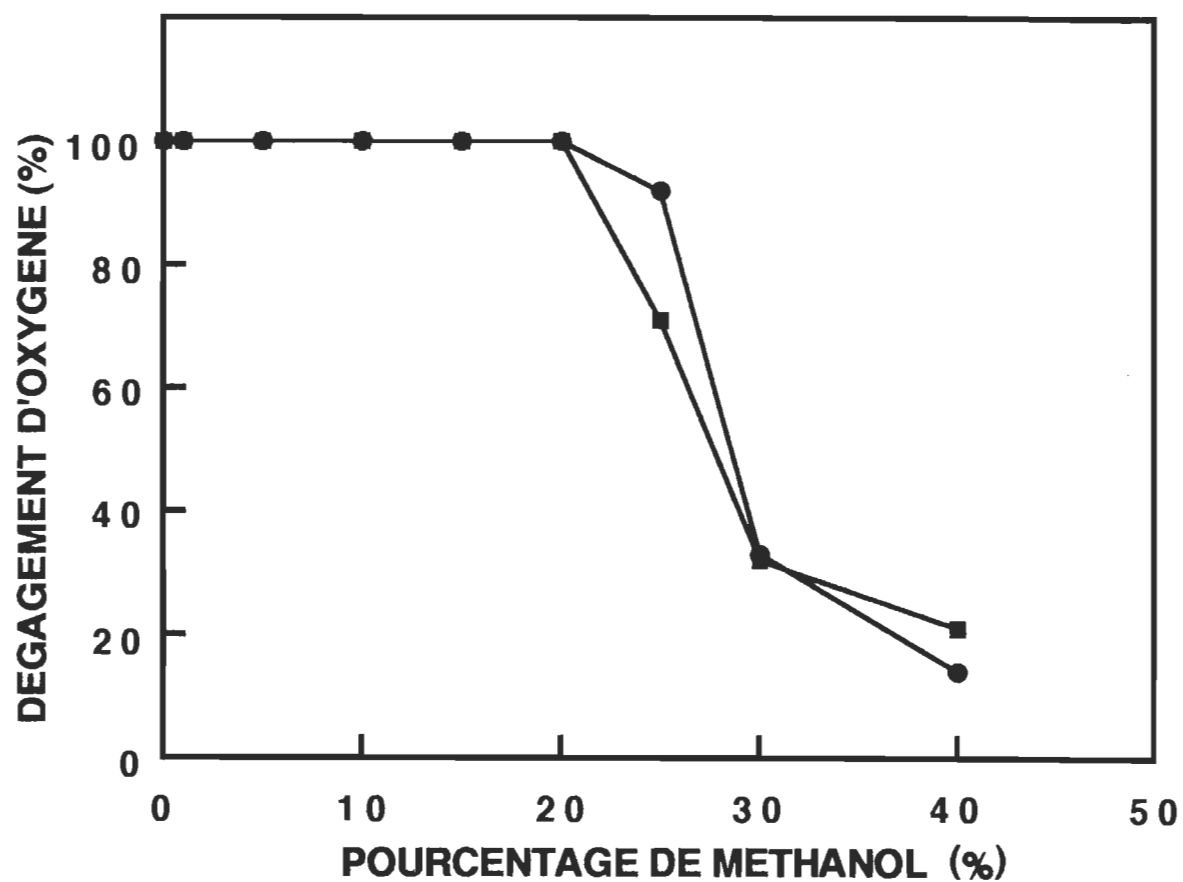
Les plants d'orge sont traités en présence d'antibiotiques selon les méthodes décrites en 4.1.3. Puisque le méthanol a servi de solvant pour la mise en solution des deux types d'antibiotiques, il est

primordial de vérifier si celui-ci modifie la membrane thylacoïdienne tant sur le plan structurel que fonctionnel.

Premièrement, nous avons mis directement en contact le méthanol et les membranes isolées (membranes témoins et acclimatées) pour par la suite, vérifier l'effet de ce solvant sur l'activité photosynthétique (**Figure 35**). Jusqu'en présence de 20% de méthanol, les membranes thylacoïdiennes ne semblent pas être affectées par le solvant. Par contre, pour des concentrations supérieures nous observons une décroissance proportionnelle à la quantité de méthanol utilisée. Ceci est probablement dû à une modification sur le plan lipidique de la membrane. De plus, nous notons que la membrane acclimatée à la chaleur est aussi susceptible à la présence de méthanol que la membrane non acclimatée. Ce qui indique que la présence des HSP au niveau de l'appareil photosynthétique (qui semblent être les responsables de l'adaptation à la chaleur) ne permet pas une résistance de la membrane à un stress au méthanol puisque ce dernier a comme effet de solubiliser les lipides membranaires. Nous observons donc une dissociation complète de la membrane.

Deuxièmement, nous mettons en contact le méthanol et les plants d'orge coupés à la racine. Cette incubation des plants pour une période de 3 h nous permettra de constater si la présence de méthanol perturbe l'activité photosynthétique en solubilisant les lipides membranaires. Ainsi, dix tiges seront déposées dans chacune des éprouvettes contenant des quantités différentes de solvant. Le solvant pénètre par capillarité dans les feuilles d'orge. Une extraction des membranes thylacoïdiennes sera ensuite effectuée séparément pour chaque série d'éprouvettes (**Tableau 8**).

Il semblerait que des volumes absorbés par les plantes allant jusqu'à 500 $\mu$ l de solvant pour environ 10 feuilles d'orge n'altère pas vraiment la capacité de dégagement d'oxygène compte tenu des écarts



**FIGURE 35** Pourcentage de dégagement d'oxygène par la membrane thylacoïdienne en présence de différents pourcentages en méthanol ( ■ ) représente la membrane isolée de plants d'orge acclimatés à 40°C pendant 3 h ( ● ) membrane isolée de plants d'orge non acclimatés. L'erreur sur les mesures est au maximum de 3%.

**TABEAU 8**      Activité photosynthétique des membranes thylacoïdiennes provenant de plants d'orge déposés dans des quantités différentes de méthanol pour 3 heures. Tout le volume de solvant utilisé a été absorbé par les feuilles. Ces mesures ont été effectuées sur quatre extractions différentes.

---

VOLUME DE MÉTHANOL UTILISÉ ( $\mu$ L)	ACTIVITÉ PHOTOSYNTHÉTIQUE ( $\mu$ mol O <sub>2</sub> / mg Chl. h)
0	179 $\pm$ 5
100	172 $\pm$ 5
250	164 $\pm$ 10
500	157 $\pm$ 10

---

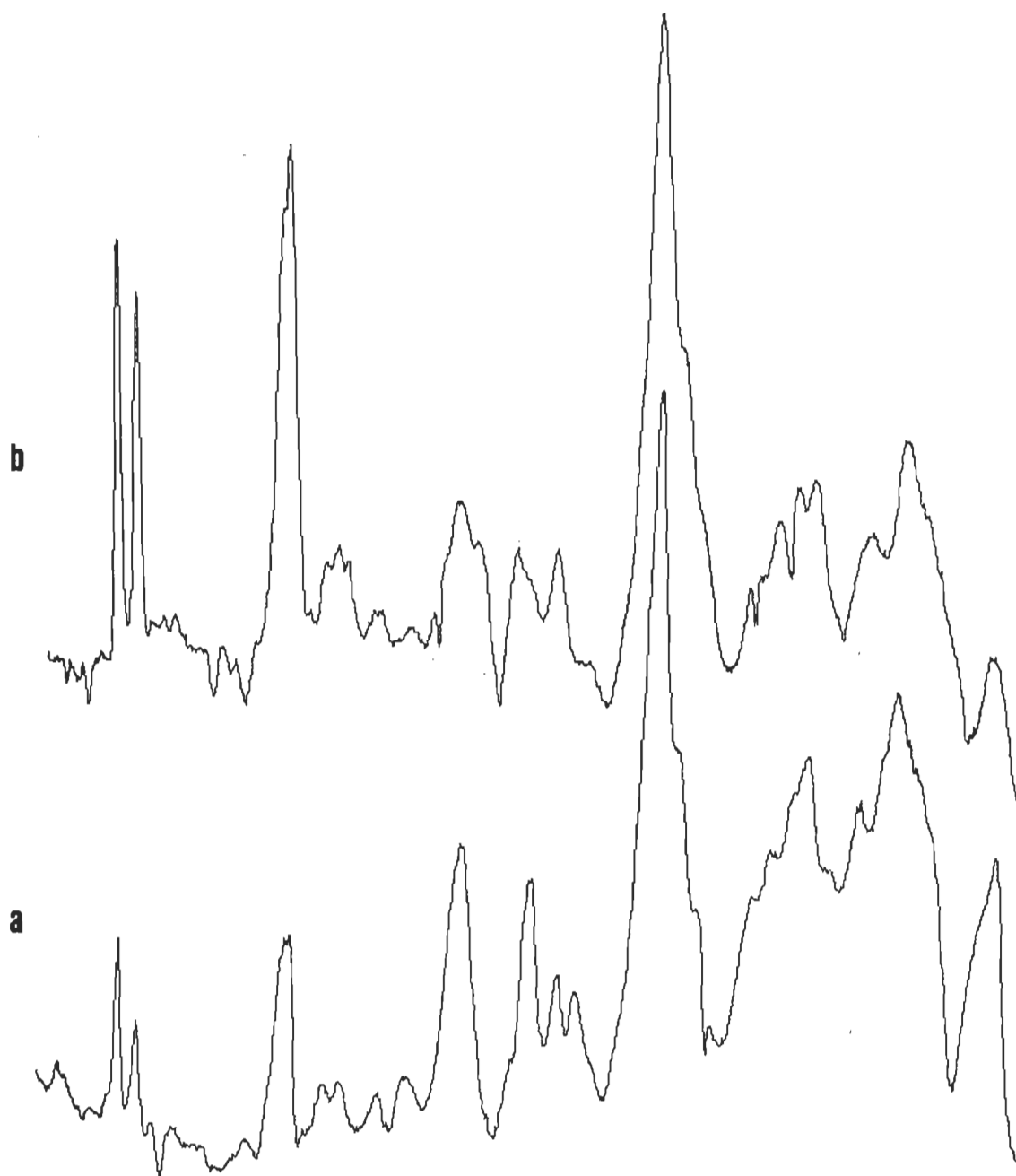
dans les mesures d'activité. Une analyse par l'électrophorèse de la membrane permet de constater par contre certaines variations dans la composition en polypeptides; cependant, celles-ci n'impliquent pas des polypeptides du complexe de dégagement d'oxygène et ne semblent pas avoir affecté l'activité photosynthétique (**Figure 36**).

Troisièmement, le dernier test à effectuer avec le méthanol est de vérifier si l'acquisition de la thermotolérance de la membrane photosynthétique face à une incubation à 30°C (observée en 5.3) est possible lorsque les plants sont acclimatés en présence de méthanol.

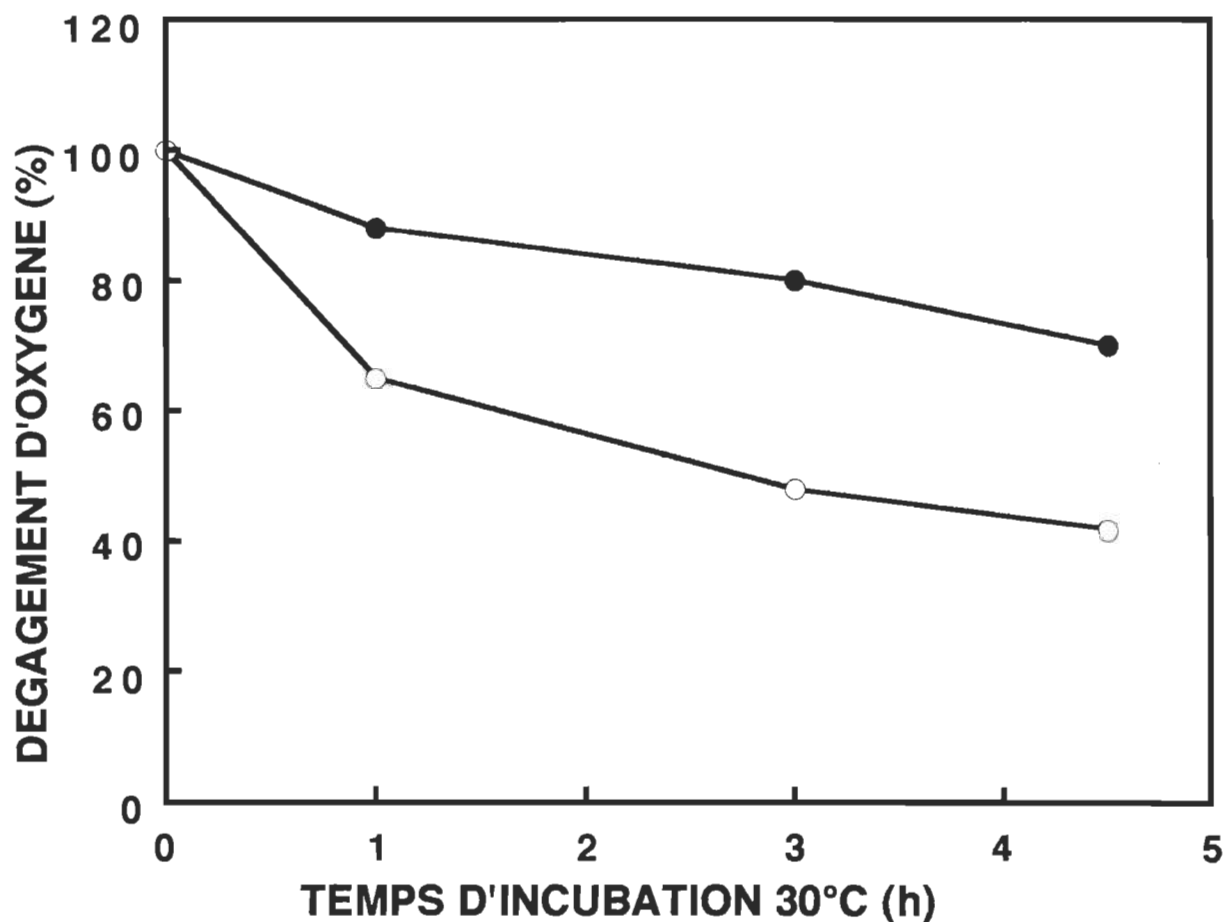
Une série d'éprouvettes, contenant chacune dix tiges d'orge coupées et trempées dans 500  $\mu$ l de méthanol, sont placées dans une chambre de croissance à 40°C, tandis qu'une autre série déposée à 23°C servira de témoin (**Figure 37**). La cinétique du pourcentage de dégagement d'oxygène obtenue en fonction du temps d'incubation des membranes est similaire à la figure 31. Ces deux graphiques démontrent une stabilité des membranes thylacoïdiennes acclimatées à 40°C en fonction d'une incubation à 30°C. Après 4.5 h l'activité restante de la membrane acclimaté est de  $77 \pm 3 \%$  si nous comparons la même expérience mais en absence de méthanol l'activité retrouvée est de  $74 \pm 5 \%$ . Par ce test, nous pouvons conclure que la présence de méthanol n'a eu aucune influence sur le plan fonctionnel de la membrane et que le mécanisme d'adaptation n'a pas été inhibé par le solvant. Nous pouvons donc passer à l'analyse des antibiotiques qui seront solubilisés dans ce 500  $\mu$ l de méthanol pour dix tiges d'orge.

### **i) Influence du chloramphénicol**

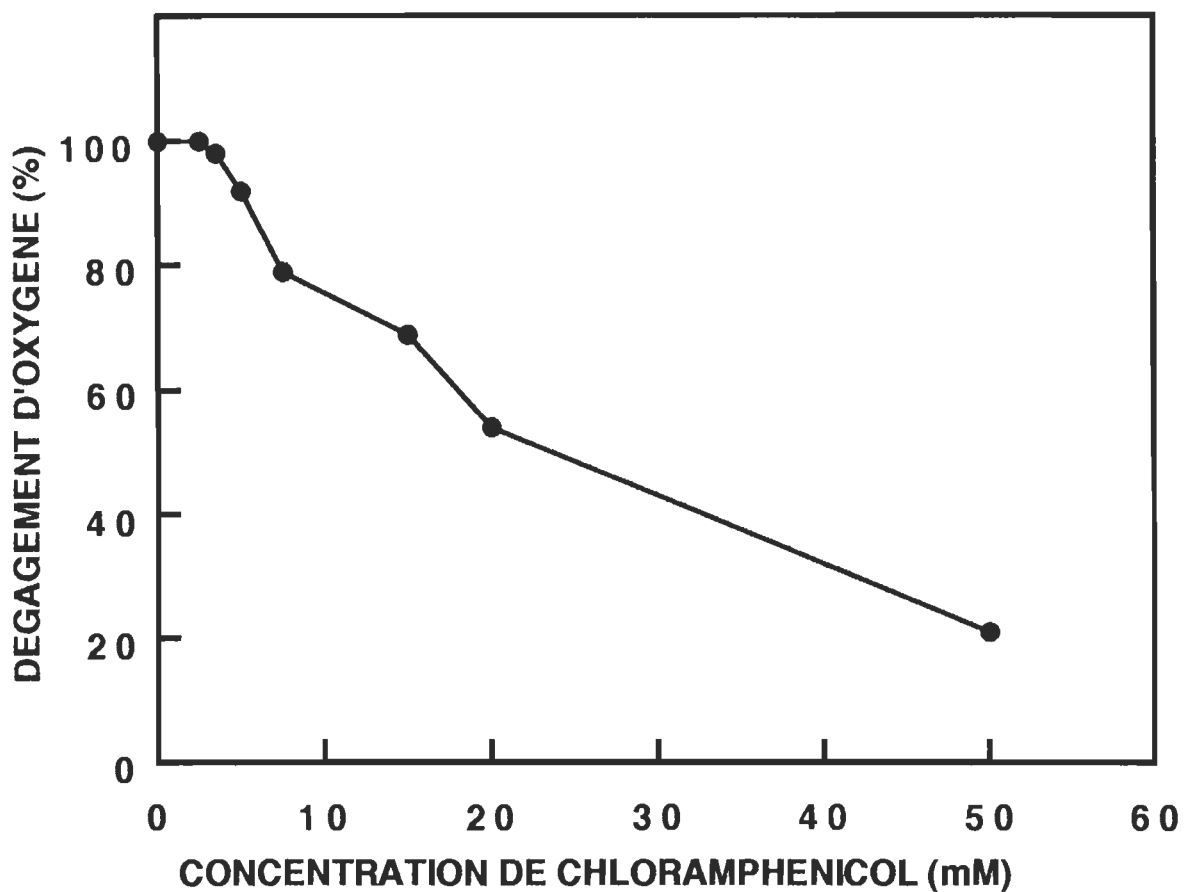
Dans un premier temps, nous allons considérer l'influence de cet antibiotique sur l'activité de la membrane (**Figure 38**). Les membranes sont mises en contact avec différentes concentrations de chloramphénicol. Nous observons que l'activité photosynthétique



**FIGURE 36** Densitogrammes représentant la composition polypeptidique de la membrane isolée de plants d'orge non acclimatés (a) incubée en présence de méthanol pendant 3 h (b) en absence de méthanol.



**FIGURE 37** Pourcentage de dégagement d'oxygène par la membrane thylacoïdienne en fonction du temps d'incubation à 30°C. (●) représente la membrane isolée de plants d'orge acclimatés à 40°C 3 h en présence de méthanol (○) membrane isolée de plants d'orge non acclimatés aussi en présence de méthanol pendant 3 h. L'erreur sur les mesure est au maximum de 2.5 %.



**FIGURE 38** Pourcentage de dégagement d'oxygène par la membrane photosynthétique provenant de plants d'orge non acclimatés en fonction de la concentration d'antibiotique. L'erreur sur les mesures est au maximum de 5 %.



diminue avec la quantité croissante d'antibiotique. L'utilisation de 5 mM seulement nous sera suffisante pour inhiber la synthèse des protéines d'origine chloroplastique (Vierling et Mishkind, 1986), et à cette concentration, nous constatons que la présence de 5 mM d'antibiotique n'entraîne qu'une baisse de 8% de l'activité, ce qui est peu considérable.

Des études effectuées en 1991 par Okada et ses collaborateurs affirmèrent que la présence de chloramphénicol sur des feuilles de riz servait d'inhibiteur de la photosynthèse (Okada et al., 1991). Selon ces études des segments de feuilles de riz incubés dans un tampon contenant 3 mM de chloramphénicol entraîne une inhibition de plus en plus accentuée avec le temps. Après 3 h d'incubation, l'activité photosynthétique de la membrane est inhibée de 50%. Il est important de mentionner, que le retrait des feuilles de la solution contenant l'antibiotique permet le recouvrement de l'activité photosynthétique, puisque l'antibiotique n'affecte pas directement le PSII. Le chloramphénicol intervient au niveau du cycle de Calvin (comme accepteur d'électrons) au site de réduction du  $\text{CO}_2$ . De ce fait, il entre en compétition avec le  $\text{CO}_2$  et est ainsi considéré comme un inhibiteur de la photosynthèse. La concentration d'antibiotique utilisée dans nos expérimentations sera de 5 et 15 mM pour une période d'incubation de 3 h. Par contre puisque nos observations sont effectuées sur les membranes après le stress thermique et non pendant ce stress, il n'y aura plus d'influence de la part de l'antibiotique (dû à son absence dans notre extrait) sur l'activité de nos membranes.

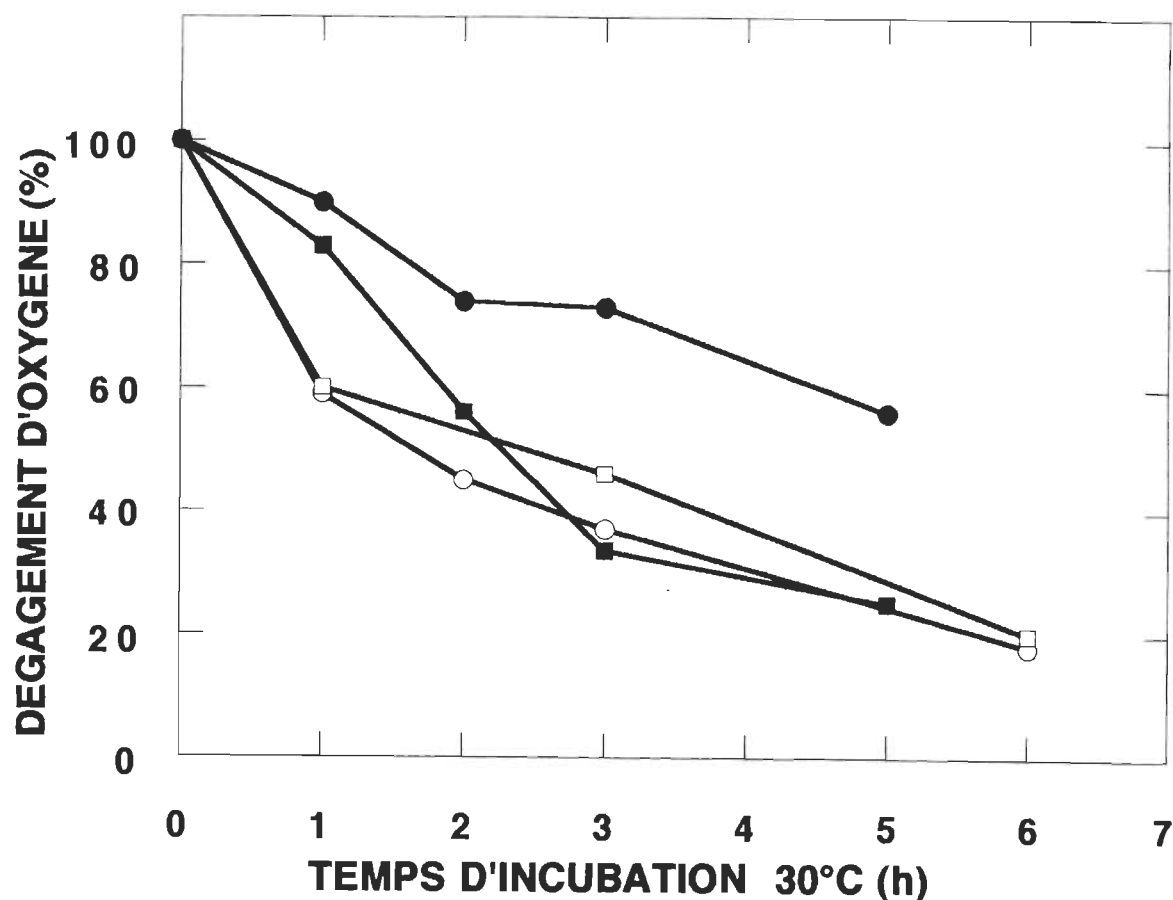
Une vérification de l'activité des membranes isolées de plants incubés en présence ou en absence de chloramphénicol est toutefois requise. Il est ainsi important de s'assurer que la présence de chloramphénicol lors du stress thermique n'a pas perturbé nos membranes thylacoïdiennes. Les tiges d'orge sont alors déposées dans une solution méthanolique contenant 5 mM de chloramphénicol (voir

matériel et méthode section 4.2.3) solubilisé dans 500  $\mu$ l de solvant. D'autres ne sont incubées que dans le méthanol (**Tableau 9**). Suite à l'extraction des membranes de nos deux échantillons, l'activité photosynthétique est obtenue par l'analyse du dégagement d'oxygène. L'expérimentation a été effectuée trois fois et nous démontre à chaque fois l'uniformité dans la quantité de dégagement d'oxygène obtenue entre les membranes isolées de plants en présence ou en absence de chloramphénicol. Ainsi il n'y a pas eu de perturbation au niveau de la membrane photosynthétique par la présence de l'antibiotique.

Maintenant il est indispensable de vérifier si la présence du chloramphénicol lors du stress thermique ( $40^{\circ}\text{C}$ ) sur les plants d'orge permet l'adaptation des membranes à la chaleur. Une série d'échantillons (d'éprouvettes) est placée à  $40^{\circ}\text{C}$  et une autre à  $23^{\circ}\text{C}$  (comme témoin) tous deux en présence de 5 mM de chloramphénicol (**Figure 39**). Les résultats démontrent que l'acclimatation ou la thermotolérance est irréalisable pour la membrane en présence de chloramphénicol. Le pourcentage d'activité photosynthétique de la membrane acclimatée en présence de chloramphénicol restant est de 25 % après 4.5 h d'incubation à  $30^{\circ}\text{C}$ . Si nous comparons avec l'activité retrouvée à la figure 31 pour la membrane non acclimatée suite à une incubation de 4.5h à  $30^{\circ}\text{C}$ , un léger 20 % d'activité est possible. Cet antibiotique est à l'origine d'une inhibition de la synthèse de protéines synthétisées par le génome chloroplastique. Comme déjà mentionné à la section 3.1.5, la synthèse des protéines de choc thermique, est d'origine nucléaire. Ainsi sa synthèse n'est pas supprimée en présence de chloramphénicol. Certaines études ont justement détecté la protéine de 21 kDa présente dans le stroma du chloroplaste malgré la présence de cet inhibiteur (Vierling, 1986). Il semblerait donc que la protéine HSP21 synthétisée lors de l'exposition à la chaleur est toujours possible malgré la présence du chloramphénicol. Cependant, elle serait incapable de se fixer sur la membrane thylacoïdienne. Cet empêchement de la protéine de

**TABLEAU 9** Activité photosynthétique des membranes isolées de plants d'orge incubés 3h dans le méthanol ou de plants d'orge incubés dans une solution méthanolique contenant 5 mM de chloramphénicol pour une période aussi de 3 h. Ces mesures ont été effectuées sur trois extractions différentes.

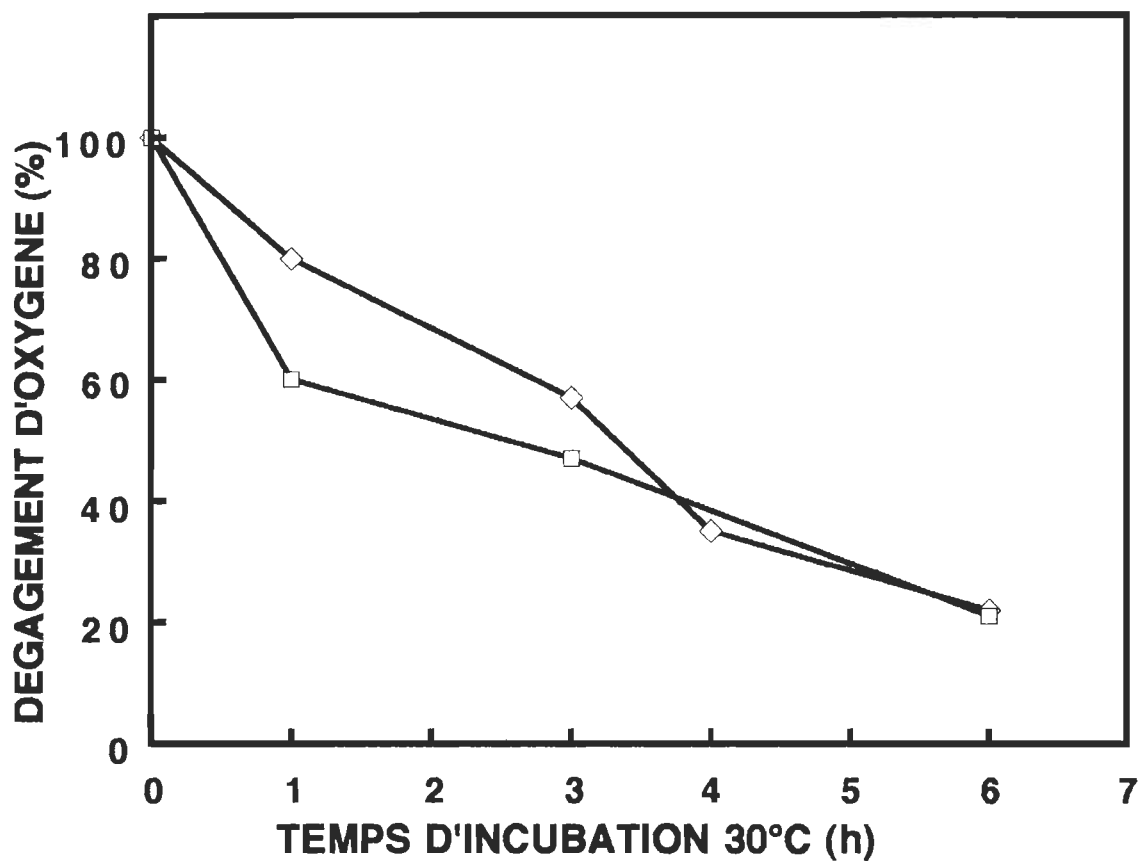
----- <b>ACTIVITÉ PHOTOSYNTHÉTIQUE</b> $\mu\text{mol O}_2 / \text{mg Chl. h}$ -----		
	<b>EN PRÉSENCE DE CHLORAMPHÉNICOL</b>	<b>EN ABSENCE DE CHLORAMPHÉNICOL</b>
<b>Extrait 1</b>	143 $\pm$ 10	157 $\pm$ 10
<b>Extrait 2</b>	164 $\pm$ 5	172 $\pm$ 10
<b>Extrait 3</b>	157 $\pm$ 10	164 $\pm$ 5
<b>MOYENNE:</b>	155 $\pm$ 10	164 $\pm$ 10
-----		



**FIGURE 39** Activité photosynthétique de la membrane après différentes périodes d'incubation à 30°C. Les membranes thylacoïdiennes sont isolées de plants d'orge non acclimatés à la chaleur en présence ( □ ) ou absence ( ○ ) de chloramphénicol ou des membranes isolées de plants d'orge acclimatés à 40°C pendant 3 h en présence ( ■ ) ou absence ( ● ) d'antibiotique. L'erreur sur les mesures est au maximum de 4 %.

s'accrocher à la membrane peut s'expliquer par l'inhibition de la synthèse d'une autre protéine mais d'origine chloroplastique essentielle à l'intégration de la protéine du choc thermique de 21 kDa sur la membrane. L'intégration du HSP21 demanderait l'apport d'une protéine chaperon, telles que des HSP mais synthétisées au niveau du génome chloroplastique. Ainsi, son absence au niveau du thylacoïde observée par d'autres auteurs, nous permet de prétendre en son rôle essentiel à l'acquisition de la thermotolérance.

Est-ce l'absence de la protéine au niveau de la membrane qui empêche l'acquisition de la thermotolérance ou une perturbation de la membrane due à la présence de l'antibiotique ? La présence du chloramphénicol ne semble pas perturber la membrane puisqu'il existe une similitude dans les cinétique d'inhibition de l'activité photosynthétique des membranes non acclimatées en l'absence de chloramphénicol et celles en présence de l'antibiotique. Ainsi la présence de chloramphénicol ne perturbe pas la membrane et la susceptibilité de celle-ci est en relation avec l'absence de la protéine. L'incubation de plants dans 15 mM de chloramphénicol pour une période de 3 h permet de témoigner une fois de plus du fait que l'antibiotique n'affecte pas la membrane (**Figure 40**). La cinétique d'inhibition de l'activité photosynthétique en fonction du temps d'incubation de l'orge en présence de 5 mM ou 15 mM d'antibiotique est identique. Si nous comparons les résultats obtenus à la figure 39 (5 mM d'antibiotique) l'activité restante suite à 6h d'incubation est de 20% soit indentique à l'activité obtenue en présencce de 15 mM de chloramphénicol sur les plants d'orge. L'appareil photosynthétique n'est pas plus susceptible à l'incubation à 30°C, et n'a donc pas été plus endommagée par la présence d'une forte concentration de chloramphénicol.



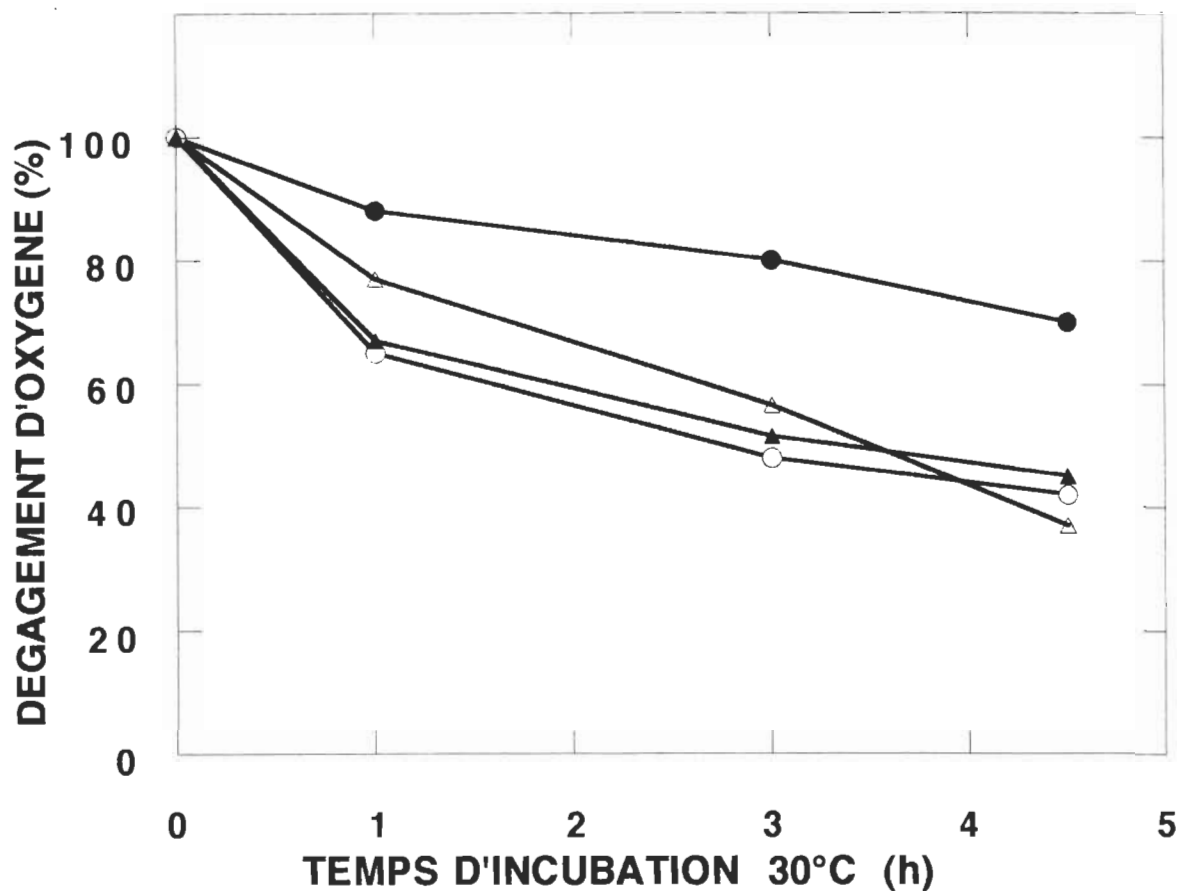
**FIGURE 40** Activité photosynthétique de la membrane après différentes périodes d'incubation à 30°C. Les membranes thylacôïdiennes sont isolées de plants d'orge non acclimatés en présence ( □ ) de 5 mM ou ( ◇ ) de 15 mM de chloramphénicol. L'erreur sur les mesures est au maximum de 5%.

## ii) Influence du cycloheximide

Une étude semblable à la précédente a été réalisée mais en présence de 5 mM de cycloheximide comme antibiotique (**Figure 41**). Lorsqu'on expose les membranes à 30°C, leur résistance ne semble pas possible pour aucune d'entre elles. Il était prévisible de constater que la membrane acclimatée préalablement à 40°C est inhibée en présence du cycloheximide. Cet antibiotique est un inhibiteur de la synthèse nucléaire et sa présence a donc prohibé la synthèse des HSP de 21 et 70 kDa.

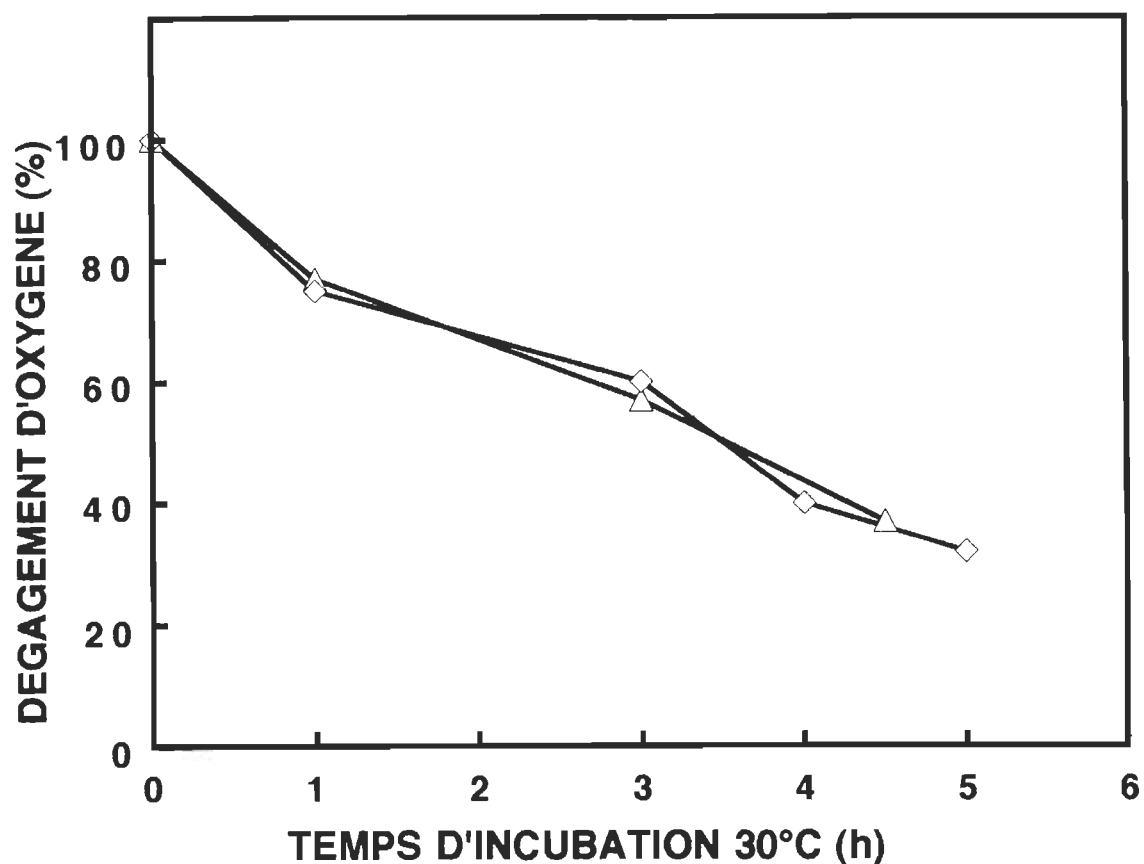
Une incubation de plants d'orge dans 15 mM de cycloheximide pendant 3 h nous permettra de confirmer que la présence de cet antibiotique n'a pas perturbé l'appareil photosynthétique et que celle-ci possède le même comportement vis-à-vis d'une incubation à 30°C que celle étant mise en contact de 5 mM (**Figure 42**).

Selon les études de Schuster en 1988 l'utilisation de cet antibiotique sur des cellules (*Chlamydomonas*), empêche d'abord la synthèse des protéines de 21 et 70 kDa mais aussi rend le PSII susceptible à la photoinhibition lors du stress thermique (Schuster et al., 1988). Leurs études confirmèrent que la présence de la protéine de 21 kDa accolée à la membrane thylacoïdienne au niveau des grana, permettrait une protection du PSII contre une photoinhibition durant le stress thermique. Cette situation est par contre non observée en présence de cycloheximide. Ce qui donnerait à la présence de HSP au niveau de la membrane une double tâche, celle d'entraîner une thermotolérance de l'appareil photosynthétique isolé face à la chaleur et celle de contrer la photoinhibition du PSII durant le stress thermique.



**FIGURE 41** Activité photosynthétique de la membrane après différentes périodes d'incubation à 30°C. Les membranes thylacoïdiennes sont isolées de plants d'orge non acclimatés à la chaleur en présence (△) ou absence (○) de cycloheximide ou des membranes isolées de plants d'orge acclimatés à 40°C 3 h en présence (▲) ou absence (●) d'antibiotique. L'erreur sur les mesures est au maximum de 3%.





**FIGURE 42** Activité photosynthétique de la membrane en fonction de la période d'incubation à 30°C. Les membranes thylacoïdiennes sont isolées de plants d'orge non acclimatés en présence ( $\triangle$ ) de 5 mM ou ( $\diamond$ ) de 15 mM de cycloheximide. L'erreur sur les mesures est au maximum de 2.5%.

Selon nos observations, la synthèse des protéines de 21 et 70 kDa est indispensable à la membrane pour la conservation d'une bonne activité photosynthétique. De cette façon, une protection du PSII est assurée.

Le site d'attachement de HSP21 a été confirmé par plusieurs auteurs comme étant au niveau des grana (Kloppstech et al., 1985), ce qui nous indique qu'elle est associée au PSII, mais à quel niveau? Suite à nos études, l'association de cette protéine à la membrane prévient l'inhibition de l'activité photosynthétique du PSII; ainsi son affiliation doit être au niveau du centre réactionnel de ce photosystème. Plusieurs auteurs ont affirmé que le stress thermique produisait une dissociation soit de la protéine D1 ou du complexe de dégagement d'oxygène tous deux retrouvés au niveau du centre réactionnel du PSII. Ainsi ce genre de dissociation entraîne inévitablement une inhibition de l'activité photosynthétique. Le complexe de dégagement d'oxygène, comme déjà mentionné auparavant regroupe trois protéines extrinsèques de 32, 23 et 17 kDa qui sont essentielles à l'activité photosynthétique par leur fonction dans la photolyse de l'eau. Des études, effectuées par Sabat et ses collaborateurs (1986) démontrèrent que l'effet de la chaleur entraînait justement l'inactivation du complexe de dégagement d'oxygène en empêchant la réalisation de la photolyse de l'eau. Ils affirmèrent aussi que ce complexe est relativement plus faible que les autres composantes de la chaîne de transport d'électrons. Cependant nos résultats démontrent une conservation de cette activité suite à l'acclimatation ainsi qu'une préservation du complexe de dégagement d'oxygène. Comment cette activité et cette intégrité du complexe sont-elles conservées? Une hypothèse serait que la présence du HSP de 21 est essentielle pour garder l'intégrité du complexe de dégagement d'oxygène en s'infiltrant ou en s'associant à ce complexe. Selon l'étude de Yamamoto (1979) la protéine extrinsèque de 33 kDa est la protéine "protectrice" du complexe, ainsi le rôle du HSP21 durant le stress thermique serait de préserver cette protéine et de ce fait assurer

l'intégrité et le bon fonctionnement du complexe de dégagement d'oxygène.

Des études réalisées sur l'activité photosynthétique durant un stress thermique en présence de sucre (glycérol), indiquèrent qu'il y avait conservation de l'activité de la membrane dû à la présence de sucre qui permettait l'intégrité des lipides membranaires. La présence de sucre pourrait aussi bien, suivant notre hypothèse, permettre l'intégrité du complexe de dégagement d'oxygène. De plus, cette hypothèse d'association de la protéine de 21 kDa avec le complexe, permettrait d'expliquer la difficulté pour certains auteurs d'observer ces protéines accrochées à la membrane puisque le complexe de dégagement d'oxygène est un complexe de protéines extrinsèques qui est facilement dissociable. Les travaux réalisés par l'équipe de biologistes moléculaires de Vierling ces dernières années démontrèrent que la protéine HSP21 se retrouvait seulement dans la partie soluble (Vierling et al., 1985; Chen et al., 1990). Leur intérêt se portait seulement sur la localisation de la protéine au niveau de la membrane et non au niveau de l'activité photosynthétique. Alors, est-ce que l'extrait membranaire utilisé par ces auteurs est pleinement actif et comporte un complexe de dégagement d'oxygène encore intègre soit non dissocié.

## CONCLUSION

Le but de cette étude était de mettre en relation la présence des protéines de stress thermique et l'adaptation du photosystème II face à une élévation de température. Selon les résultats obtenus, la présence de ces protéines au niveau de la membrane, probablement associées au complexe de dégagement d'oxygène, serait la principale source pour l'acquisition de la thermotolérance de l'appareil photosynthétique.

Le tout premier objectif imposé était de déterminer les conditions idéales et essentielles pour obtenir de notre matériel biologique, une réponse face à l'augmentation de température. Cette réponse étant la synthèse de protéines de choc thermique (HSP). L'identification par autoradiogramme de ces protéines de stress associées à la membrane thylacoïdienne (isolée de plants d'orge acclimatés à 40°C) nous a permis de suspecter un rôle fondamental pour ces protéines. Leur synthèse ainsi que leur fixation au niveau de la membrane doivent soutenir la fonction de l'appareil photosynthétique lors de stress.

Les expériences sur l'activité photosynthétique des membranes incubées à 30°C ont été concluantes par le fait que l'activité du dégagement d'oxygène est significativement plus stable chez les thylacoïdes isolés de plants acclimatés à 40°C, comparativement aux témoins (23°C). Cependant la littérature démontre que le PSI est très résistant mais que le PSII est extrêmement sensible à toutes élévations de températures, ce qui entraîne une inactivation du transport d'électrons ainsi attribuée directement à la vulnérabilité du centre réactionnel de ce photosystème (PSII). Une acclimatation, comme il est observé dans nos expérimentations, démontre que le PSII a acquis une

tolérance face à l'incubation à 30°C. Par contre, dans le cas des membranes isolées de plants non acclimatés à la chaleur, une incubation de cette membrane à 30°C, permet d'observer la susceptibilité du PSII.

Il est cependant impossible d'observer une résistance du thylacoïde isolé de chloroplastes acclimatés lors de l'incubation à 30°C. Cette observation nous a démontré que dû à l'absence de synthèse des HSP d'origine nucléaire, l'appareil photosynthétique n'est pas disposé à acquérir une thermotolérance. L'hypothèse que les HSP sont à la source de l'acquisition de cette résistance du PSII est donc plausible.

La comparaison entre la composition polypeptidique des membranes isolées de plants ou de chloroplastes acclimatés attestent que ces membranes sont distinctes. Le complexe de dégagement d'oxygène constitué de trois protéines extrinsèques subi une dissociation lors d'un choc thermique seulement pour la membrane provenant de chloroplaste. Ce qui nous amène à localiser les HSP au niveau de ce complexe et à leur attribuer le rôle de protecteur contre la dénaturation ou dissociation des protéines de 32, 23 et 17 kDa lors d'une élévation de température.

De plus, l'utilisation d'antibiotiques nous démontre une inhibition de la synthèse de protéines codées par le chloroplaste ou le noyau prévient l'expression de cette acclimatation. L'action du cycloheximide inhibe l'acquisition de thermotolérance par la membrane en prohibant la synthèse des HSP21 et HSP70. Par contre l'inhibition de la synthèse des protéines provenant du génome chloroplastique, par l'action du chloramphénicol, amène aussi l'inhibition de l'acquisition de la thermotolérance. La synthèse des HSP d'origine nucléaire n'est pas inhibée par le chloramphénicol par contre la présence de cet antibiotique empêcherait l'intégration de HSP21 sur la membrane thylacoïdienne. Une autre protéine responsable de la fixation du

HSP21 et normalement synthétisée par le chloroplaste est donc manquante. Alternativement, nous pouvons suggérer que l'action du chloramphénicol perturbe ou modifie le site de fixation de la protéine sur la membrane en empêchant du même coup la résistance de l'appareil photosynthétique à la chaleur.

De récentes études sur des cellules humaines démontrèrent que la présence de prostaglandine (protéines synthétisées lors de fièvre, soit lors d'une augmentation de température) entraîne l'induction de la thermotolérance des cellules en permettant la synthèse de HSP70 sans l'augmentation de température (Amici et al., 1993). Ainsi, des études sur la possibilité que la synthèse des protéines de stress thermique soient synthétisées en absence d'une augmentation de température (soit par la présence de prostaglandine), renforcerait encore d'avantage l'implication des HSP.

Par ailleurs, le mécanisme d'action des HSP au niveau de la membrane photosynthétique n'est pas connu précisément. Des travaux futurs impliquant l'utilisation de fragments membranaires enrichis en PSII pourraient permettre de clarifier les mécanismes qui soutendent l'acquisition de résistance au niveau du complexe de dégagement d'oxygène.

## RÉFÉRENCES

- Ageeva, O.G. Effects of light on thermostability of hill reaction in pea and spinach chloroplasts. Photosynthetica. 1977, 11, 1-4.
- Alexandrov, V. Ya., Lomagin, A.G., et Feldman, N.L. The responsive increase in thermostability of plant cells. Protoplasma 1970, 69, 417-458.
- Al-Khatib, K., et Wiest, S.C. Solution effects on the thermostability of bean chloroplast thylakoids. Crop Sci. 1990, 30, 90-96.
- Al-Khatib, K., et Wiest, S.C. Heat-induced reversible and irreversible alteration in the structure of *Phaseolus vulgaris* thylacoid proteins. J. Therm. Biol. 1990, 15, 239-244.
- Amici, C., Palamara, A.T. et Santoro, M.G. Induction of thermotolerance by prostaglandin A in human cells. Exp. Cell Res. 1993, 207, 230-234.
- Anderson, J.M., Waldron, J.C. et Thorne, S.W. Chlorophyll - protein complexes of spinach and barley thylakoids. FEBS Lett . 1978, 92, 227-233.
- Anderson, J.M. et Andersson, B. Photosynthesis. Structure and molecular organization of the photosynthtic apparatus. 1981, vol III, 23-31.
- Armond, P.A. Schreiber, U. et Bjorkman, O. Photosynthetic acclimation to temperature in the desert shrub, *Larrea divaricata*. II Light-harvesting efficiency and electron transport. Plant Physiol. 1978, 61, 411-415.

- Armond, P.A., Bjorkman, O. et Staehelin, L.A. Dissociation of supramolecular complexes in chloroplast membranes. A manifestation of heat damage to the photosynthetic apparatus. Biochim. Biophys. Acta 1980, 601, 433-442.
- Arnon, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. . Plant Physiol. 1949, 24, 1-15.
- Back, J.F., Oakenfull, D., et Smith, M.B. Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. Biochemistry 1979, 18, 5191-5196.
- Barnes, C.A., Johnston G.C., et Singer, R.A. Thermotolérance is independent of induction of the full spectrum of heat shock proteins and of cell cycle blockage in the yeast. J. Bacteriol. 1990, 172, 4352-4358.
- Bar-Tsur, A., Rudich, J. et Bravdo, B. High temperature effects on CO<sub>2</sub> gas exchange in heat-tolerant and sensitive tomatoes. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 1985, 110, 582-586.
- Bassi, R. et Simpson, D. Chlorophyll-protein complexes of barley photosystem I reaction. Eur. J. Biochem. 1987, 163, 221-230.
- Bassi, R., Rigoni, F. et Glacometti, G.C. Chlorophyll binding proteins with antenna function in higher plants and green algae. Photochem. Photobiol. 1990, 52, 1187-1206.
- Bauer, H., Larcher, W. et Walker, R.B. Influence of temperature stress on CO<sub>2</sub> gas exchange. In: J.D. Cooper (ed) Photosynthesis and productivity in different environments. 1975, Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K.
- Bauer, H. et Sensor, M. Z. Photosynthesis of ivy leaves (*Hedera helix* L.) after heat stress II. Activity of RUBPcarboxylas, Hill reaction, and chloroplast ultrastructure. Pflanzenphysiol. 1979, 91, 359-369.



- Benzioni, A., Itai, C. Short and long term effects of higher temperature on tobacco leaves. III. Efflux and  $^{32}$ -P incorporation into phospholipids. Plant Physiol. 1973, 28, 493-497.
- Berry, J.A., Bjorkman, O. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 1980, 31, 491-543.
- Bilger, W., et Schreiber, U. Chlorophyll luminescence as an indicator of stress-induced damage to the photosynthetic apparatus. Effects of heat-stress in isolated chloroplasts. Photosynth. Res. 1990, 25, 161-171.
- Bonham-Smith, P.C., Kapoor, M., et Bewley, J.D. Establishment of thermotolerance in maize by exposure to stresses other than a heat shock does not require heat shock protein synthesis. Plant Physiol. 1987, 85, 575-580.
- Boon-Niermeijer, E.K., Tuyl, M. et Van De Scheur, H. Evidence for two states of thermotolerance. Int. J. Hyperthermia. 1986, 2, 93-105.
- Boucher, N., Harnois, J. et Carpentier, R. Heat-stress stimulation of electron flow in photosystem I submembrane fraction. Biochem. Cell Biol. 1990, 68, 999-1004.
- Brock, T. D. Thermophilic microorganisms and life at high temperatures. Springer Verlag, 1978, New York.
- Burke, J.J., Hatfield, J.L., Klein, R.R., et Mullet, J.E. Accumulation of heat shock proteins in field-grown cotton. Plant Physiol. 1985, 78, 394-398.
- Byler, D.M. et Susi, H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. Biopolymers. 1986, 25, 469-487.

Camm, E.L. et Green, B.R. Fractionation of thylakoid membranes with the noionic detergent octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside. Resolution of chlorophyll-protein complex II into two chlorophyll-protein complexes. Plant Physiol. 1980, 66, 428-432.

Chapman, D.J., De-Felice, J.G. et Barber, J. Influence of winter and summer growth conditions on leaf membrane lipids of *Pisum sativum*. Planta. 1983, 157, 218-223.

Chapman, D.J., De-Felice, J.G. et Barber, J. Growth temperature effects on thylakoid membrane lipid and protein content of pea chloroplasts. Plant Physiol. 1983, 72, 225-228.

Chen, Q., Lauzon, L.M., DeRocher, A.E., et Vierling, E. Accumulation, stability, and localization of a major chloroplasts heat-shock protein. J. Cell Biol. 1990, 110, 1873-1883.

Chua, N.-H., et Schmidt, G.W. Post-translational transprot into intact chloroplasts of a precursor to the small subunit. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1978, 75, 6110-6114.

Clarke, A.K., et Critchley, C. Synthesis of early heat shock proteins in young leaves of barley and sorghum. Plant Physiol. 1990, 94, 567-576.

Clarke, A.K. et Critchley, C. The indentification of a heat-shock protein complex in chloroplasts of barley leaves. Plant Physiol. 1992, 100, 2081-2089.

Deshaies, R.J., Koch, B.D., Werner-Washburne, M., Craig, E.A. et Schekman, R. Nature. 1988, 332, 800-805.

Douce, R. et Joyard, J. Isolation of intact chloroplasts. Adv. Bot. Res. 1979, 7, 1-116

- Dunanay, T.G., Staehelin, L.A., Seibert, M. Ogilvie, P.D. et Berg, S. Structural, biochemical, and biophysical characterization of four oxygen-evolving photosystem II preparations from spinach. Biochim. Biophys. Acta 1984, 764, 179-193.
- Dunanay, T.G. et Staehelin L.A. Isolation and characterization of a new minor chlorophyll a/b protein complex (CP24) from spinach. Plant Physiol. 1986, 80, 429-434.
- Ellis, R.J. Chloroplast proteins synthesis, transport and assembly. Ann. Rev. Plant Physiol 1981, 31, 111-137.
- Feierabend, J. Inhibition of chloroplast ribosome formation by heat in higher plants. In Methods in chloroplast molecular biology. 1982, Elsevier, Amsterdam, 671-680.
- Ferguson, D.L., Al-Khatib, K., Guikema, J.A. et Paulsen, G.M. Degradation of proteins from thylakoid membranes in senescing wheat leaves at high temperature. Plant Cell Environ.1993, 16, 421-428.
- Ferrari-Iliou, R., Pham thi, A.T. et Vieira da Silva, J. Effect of water stress on the lipid and fatty acid composition of cotton *Gossypium hirsutum* chloroplasts. Plant Physiol. 1984, 62, 219-224.
- Foyer, C.H. Photosynthesis. ed. E.E. Bittar. 1984, 1-77.
- Gething, M.J., Sambrook, J. Protein folding in the cell. Nature. 1992, 355, 33-45.
- Glaczinski, H. et Kloppstech, K. Temperature-dependent binding to the thylakoid membranes of nuclear-coded chloroplast heat-shock proteins. Eur. J. Biochem. 1988, 173, 579-583.

- Goetze, D.C. et Carpentier, R. Oxygen mediated photosystem I activity in thylakoid membranes monitored by a photoelectrochemical cell. Photochem. photobiol. 1990, 52, 1057-1060.
- Gounaris, K., Brain, A.P.R., Quinn, P.J., et Williams, W.P. Structural and functional changes associated with heat-induced phase separations of non-bilayer lipids in chloroplast thylakoid membranes. FEBS Lett. 1983, 153, 47-52.
- Gounaris, K., Brain, A.R.R., Quinn, P.L., et Williams, W.P. Structural reorganisation of chloroplast thylakoid membranes in response to heat-stress. Biochim. Biophys. Acta 1984, 766, 198-208.
- Govindjee, et Coleman, W.J. How plants make oxygen. Sci. Am. 1990, 262(2), 50-58.
- Goycoolea, C. et Cardemil, L. Expression of heat shock proteins in seeds and during seedling growth of *Araucaria araucana* as a response to thermal stress. Plant Physiol. Biochem. 1991, 29, 213-222.
- Greer, D.H., Berry, J.A. et Bjorkman, O. Photoinhibition of photosynthesis in intact bean leaves: environmental responses of recovery. Planta. 1986, 168, 253-260.
- Hader, D.-P. et Tevini, M. General photobiology. Pergamon Press. 1987. Oxford.
- Hall, B.G. Yeast thermotolerance does not require protein synthesis. J. bacteriol. 1983, 156, 1363-1365.
- Havaux, M., Greppin, H. et Strasser, R.J. Functioning of photosystems I and II in pea leaves exposed to heat stress in the presence or absence of light. Planta. 1991, 186, 88-98.

- Havaux, M. Stress tolerance of photosystem II in vivo. Plant Physiol. 1992, 100, 424-432.
- He, W.-Z., Newell, W.R., Haris, P.I., Chapman, D. et Barber, J. Protein secondary structure of the isolated photosystem II reaction center and conformational changes studies by Fourier transform infrared spectroscopy. Biochemistry. 1991, 30, 4552-4559.
- Hill, R. et Bendall, D.S. Function of the two cytochrome components in chloroplasts: A working hypothesis. Nature. 1960, 186, 136-137.
- Howarth, C.J. J. Exp. Bot. 1990, 41, 877-883.
- Ivanov, A.G. et Velitchkova, M.Y. Heat-induced changes in the efficiency of P700 photo-oxidation in pea chloroplast membranes. J. Photochem. Photobiol. 1990, B4, 307-320.
- Jackson, M. Haris, P.I. et Chapman, D. J. Mol. Struc. 1989, 204, 329-355.
- Junge, W. Encyclopedia of plant physiology. New series. 1977, 5, 59-93.
- Key, J.L., Lin, C.Y., et Chen, Y.M. Heat shock proteins of higher plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981, 78, 3526-3530.
- Kimpel, J.A., Key, J.L. Heat shock in plants. Trends Biochem. Sci. 1985, 10, 353-357.
- Kirk, J.T.O. et Tilney-Bassett, A.E. The plastids. Second Edition. Elsevier, Amsterdam. 1978, 50-63.
- Klein, J.D., Ferguson, I.B. Effet of high temperature on calcium uptake by suspension-cultured pear fruit cells. Plant Physiol. 1987, 84, 153-156.

- Kloppstech, K., Meyer, G., Schuster, G., et Ohad, I. Synthesis, transport and localization of a nuclear coded 22-Kd heat shock protein in th chloroplast membranes of peas and *Chlamydomonas reinhardtii*. EMBO J. 1985, 4, 1901-1909.
- Kloppstech, K., Ohad, I. Heat shock protein synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. Translational control at the level of initiation of a poly(A)-rich-RNA coded 22-kDa protein in a cell-free system. Eur. J. Biochem. 1986, 154, 63-68.
- Ko, K., Bornemisza, O., Kourtz, L., Ko, Z.W., Plaxton, W.C. et Cashmore, A.R. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding cognate 70-kDa heat shock protein of the chloroplast envelope. J. Biol. Chem. 1992, 267, 2986-2993.
- Krause, G.H., Santarius, K.A. Relative thermostability of the chloroplast envelope. Planta. 1975, 127, 285-299.
- Krause, G.H. et Weis, E. Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II Interpretation of fluorescence signals. Photosynth. Res. 1984, 5, 139-157.
- Krishnan, M., Nguyen, H.T., et Burke, J.J. Heat shock protein synthesis and thermal tolerance in wheat. Plant Physiol. 1989, 90, 140-145.
- Krishnasamy, S., Manner, M.R., Krishnan, M. et Gnanam, A. Heat shock response of the chloroplast genome in *Vigna sinensis*. J. Biol. Chem. 1988, 263, 5104-5109.
- Lagoutte, B. et Mathis, P. The photosyntem I reaction center: Structure and photochemistry. Photochem. Photobiol. 1989, 49, 833-844.
- Lim, L., Hall, C., Leung, T., et Whathey, S. The relationship of the rat brain 68 kDa microtubule-associated protein with synaptosomal plasma membranes and with the *Drosophila* 70 kDa heat shock protein. Biochem. J. 1984, 224, 677-680.

- Lin, C-Y., Roberts, J.K., et Key, J.L. Acquisition of thermotolerance in soybean seedlings. Plant Physiol. 1984, 74, 152-160.
- Lindholm, J., Gustafsson, P. et Oquist, G. Photoinhibition of the photosynthesis and its recovery in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* Plant Cell Physiol. 1987, 28, 1133-1140.
- Lindquist, S. et Craig, E.A. The heat shock proteins. Annu. Rev. Genet. 1988, 22, 631-677.
- Machold, O. Translational sites of thylakoid membrane proteins. Studies based on selective inhibition of cytoplasmic and chloroplast ribosomes by cycloheximide and chloramphenicol. Biochim. Biophys. Acta 1983, 740, 57-63.
- Mackey, B.M., et Derrick, C. Heat shock protein synthesis and thermotolerance in *Salmonella typhimurium*. J. Applied Bacteriol. 1990, 69, 373-383.
- Maison, B. et Lavorel, J. Effect of température on PSII in *Chlorella* and chloroplasts. Plant Cell Physiol. 1977, 55-65.
- Marmioli, N., F. M. Restivo, M. Odoardi Stanca, V. Terzi, B. Giovanelli, F. Tassi, and C. Lorenzoni. Induction of heat shock proteins and acquisition of thermotolerance in barley seedling (*Hordeum vulgare*). Genet. Agr. 1986, 40, 9-25.
- Marmioli, N., Lorenzoni, C., Cattivelli, L., Stanca, A.M., et Terzi, V. Induction of heat shock proteins and acquisition of thermotolerance in barley (*Hordeum vulgare* L). Variations associated with growth habit and plant development. J. Plant Physiol. 1989, 135, 267-273.
- Marshall, J.S., DeRocher, A.E., Keegstra, KÉ et Vierling, E. Identification of heat shock protein HSP70 homologues in chloroplasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990, 87, 374-378.

- Marshall, J.S. et Keegstra, K. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding the major HSP70 of the pea chloroplastic stroma. Plant Physiol. 1992, 100, 1048-1054.
- Mazliak, P. Régulation à court terme et à long terme de l'activité des enzymes membranaires par la température. Physiol. Vég. 1981, 19, 543-563.
- McAlister, L. Heat shock proteins and thermal resistance in yeast. Bioch. Bioph. Res. Comm. 1980, 93, 819-824.
- Menke, W. Structure and chemistry of plastids. Ann. Rev. Plant physiol. 1962, 13, 27-44.
- Miller, N. et Carpentier, R. Energy dissipation and photoprotection mechanisms during chlorophyll photobleaching in thylakoid membranes. Photochem. Photobiol. 1991, 54, 465-472.
- Mohanty, N., Murthy, S.D.S., et Mohanty, P. Reversal of heat induced alterations in photochemical activities in wheat primary leaves. Photosynth. Res. 1987, 14, 259-268.
- Murphy, T.M. et Thompson, W.F. Molecular plant development. Prentice-Hall. 1988.
- Mukohata, Y., Yagi, T., Matsuna, A., et Higashida, M. Biophysical studies on subcellular particles VII. Combined effects of alcohol and heat on photosynthetic activities in isolated spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol. 1973, 14, 119-216.
- Nabedryk, E., Mantele, W. et Breton, J. FTIR investigations on orientation of protein secondary structures and primary reactions in photosynthesis. Tech. New Dev. Photosynthesis Res. 1989, 168, 17-34.



- Neumann, D., Nover, L. et Scharf, K.D. Heat shock induced changes of plant cell ultrastructure and autoradiographic localisation of heat shock proteins. Eur. J. Cell Biol. 1984, 34, 254-264.
- Nover, L., Scharf, K.D., et Neumann, D. Formation of cytoplasmic heat shock granules in tomato cell cultures and leaves. Mol. Cell Biol. 1983, 3, 1648-1655.
- Nover, L. et Scharf, K.D. Synthesis, modification and structural binding of heat-shock proteins in tomato cell cultures. Eur. J. Biochem. 1984, 139, 303-313.
- Nover, L., Neumann, D. et Scharf, K.D. Heat shock and other stress response systems of plants. Results and problems in cell differentiation . 1989, 16, 30-75.
- Okada, K., Satoh, K. et Katoh, S. Chloramphenicol is an inhibitor of photosynthesis. FEBS . 1991, 295, 155-158.
- Ougham, H.J., et Stoddart, J.L. Synthesis of heat-shock protein and acquisition of thermotolerance in high-temperature tolerant and high-temperature susceptible lines of Sorghum. Plant Sci. 1986, 44, 163-168.
- Pearcy, R.W., Berry, J.A. et Fork, D.C. Effects of growth temperature on the thermal stability of the photosynthetic apparatus of *Atriplex lentiformis* (Torr.) Wats. Plant Physiol. 1977, 59, 873-878.
- Pearcy, R.W. Acclimation of photosynthetic and respiratory CO<sub>2</sub> exchange to growth temperatures in *Atriplex lentiformis* (Torr.) Wats. Plant Physiol. 1977, 59, 795-799.
- Pearcy, R.W. Effect of growth temperature on the fatty acid composition of the leaf lipids in *Atriplex lentiformis* (Torr.) Wats. Plant Physiol. 1977, 61, 484-486.

- Pfisterer, J., Lachmann, P. et Kloppstech, K. Transport of proteins into chloroplasts. Eur. J. Biochem. 1982, 126, 143-148.
- Prabha, C., Arora, Y.K. et Wagle, D.S. Phospholipids of wheat chloroplasts and its membranes under water stress. Plant Sci. 1985, 38, 13-16.
- Raison, J.K., Roberts, J.K.M. et Berry, J.A. Correlations between the thermal stability of chloroplast (thylakoid) membranes and the composition and fluidity of their polar lipids upon acclimation of the higher plant *Nerium oleander* to growth temperature. Biochim. Biophys. Acta 1982, 688, 218-228.
- Rothman, J.E. Polypeptide chain binding proteins; catalysts of protein folding and related processes in cells. Cell. 1989, 59, 591-601.
- Sabat, S.C., Mohanty, N. et Mohanty, P. Heat induced alteration in electron donation site(s) of ascorbate and ascorbate-reduced catechol in the electron transport chain of *Amaranthus* chloroplasts. Indian J. of Biochem and Biophysic 1986, 23, 266-269.
- Sachs, M.M., Ho, T.-H.D. Alteration of gene expression during environmental stress in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 1986, 37, 363-376.
- Santarius, K.A. The protective effect of sugars on chloroplast membranes during temperature and water stress and its relationship to frost, dessiccation and heat resistance. Planta. 1973, 113, 105-114.
- Santarius, K.A. Sites of heat sensitivity in chloroplasts and differential inactivation of cyclic and non-cyclic photophosphorylation by heating. J. Therm. Biol. 1975, 1, 101-107

- Santarius, K.A., Müller, M. Investigations on heat resistance of spinach leaves. Planta 1979, 146, 529-538.
- Santarius, K.A. et Bauer, J. Cryopreservation of spinach chloroplast membranes by low molecular weight carbohydrates. 1. Evidence for cryoprotection by a noncollogative-type mechanism. Cryobiology. 1983, 20, 83-89.
- Sapper, I. Veruche zur hitzereistenz der pflanzen. Planta 1935, 23, 518-556.
- Sauer, K. Photosynthesis. The light reaction. Ann. Rev. Phys. Chem. 1979, 30, 155-178.
- Schmidt, G.W., Barlett, S.G., Grossman, A.R. et Chua, N.H. Biosynthetic pathways of two polypeptide subunits of the light - harvesting chlorophyll a/b protein complex. J. Cell Biol. 1981, 91, 468-478.
- Schreiber, U., Colbow, K. et Vidaver, W. Analysis of temperature-jump chlorophyll fluorescence induction in plants. Biochim. Biophys. Acta 1976, 423, 249 -263.
- Schreiber, U. et Berry, J.A. Heat-induced changes in chlorophyll fluorescence in intact leaves correlated with damage of the photosynthetic apparatus. Planta. 1977, 136, 233-238.
- Schreiber, U. et Armond, P.A. Heat-induced changes of chlorophyll fluorescence in isolated chloroplasts and related heat-damage at the pigment level. Biochim. Biophys. Acta 1978, 502, 138-151.
- Schuster, G., Even, D., Kloppstech, K., et Ohad, I. Evidence for protection by heat-shock proteins against photoinhibition during heat-shock. EMBO J. 1988, 7, 1-6.

- Seemann, J.R., Downton, W.J.S. et Berry, J.A. Temperature and leaf osmotic potential as factors in the acclimation of photosynthesis to high temperature in desert plants. Plant Physiol. 1986, 80, 926-930.
- Smeekens, S., Weisbeek, P. et Robinson, C. Protein transport into and within chloroplasts. Trends Biochem. Sci. 1990, 15, 73-76.
- Siegenthaler, P.A. et Rawyler, A. Acyl lipids in thylakoid membranes: distribution and involvement in photosynthetic functions. Photosynthesis III. Encyclopedia of plant physiology. 1986, 19, 693-705. Academic Press, London.
- Simpson, D.J. et Von Wettstein, D. Structure and function of the thylakoid membrane. Calsberg Res. Commun. 1989, 54, 55-65.
- Steinback, K.E., Bonitz, S., Arntzen, C.J. et Bogorad, L. Molecular biology of the photosynthetic apparatus. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 1985.
- Stidham, M.A., Uribe, E.G. et Williams, G.J. Temperature dependence of photosynthesis in *Agropyron smithii* Rydb. Plant Physiol. 1982, 69, 929-934.
- Sundby, C. et Andersson, B. Temperature-induced reversible migration along the thylakoid membrane of photosystem II regulated its association with LHC-II. FEBS Lett. 1985, 191, 24-28.
- Surewicz, W.K. et Matsch, H.H. New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra. Biochim. Biophys. Acta 1988, 952, 115-130.
- Susi, H. et Byler, D.M. Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy enzymes. Methods Enzymol. 1986, 130, 290-311.

- Süss, K.-H., Yordanov, I. Biosynthetic cause of in vivo acquired thermotolerance of photosynthetic light reactions and metabolic responses of chloroplasts to heat stress. Plant Physiol. 1986, 81, 192-199.
- Thomas, P.G., Quinn, P.J. et Williams, W.P. Temperature induced changes in the structure and function of pea chloroplasts and their relation to chloroplast membrane organisation. In: Adv. Photosynthesis Res 1984, Vol III, 35-38.
- Thomas, P.G., Quinn, P.J., et Williams, W.P. The origin of photosystem I mediated electron transport stimulation in heat-stressed chloroplasts. Planta 1986, 167, 133-139.
- Thomas, P.G., Dominy, P.J., Vigh, L., Mansourian, A.R., Quinn, P.J. et Williams, W.P. Increased thermal stability of pigment-protein complexes of pea thylakoids following catalytic hydrogenation of membrane lipids. Biochim. Biophys. Acta. 1986, 849, 131-140.
- Thornber, J.P. Chlorophyll-proteins: light-harvesting and reaction center components of plants. Ann. Rev. Plant Physiol 1975, 26, 127-158.
- Thornber, J.P. Biochemical characterization and structure of pigment - proteins of photosynthetic organism. Photosynthesis III. Encyclopedia of plant physiology, New series. 1986, 19, 98-142. Academic Press, London.
- Thornber, J.P., Peter, G.F. et Nechushtai, R. Biochemical composition and structure of photosynthetic pigment-proteins from higher plants. Physiol. Plant. 1987, 71, 236-240.
- Tsugeki, R. et Nishimura, M. Interaction of homologues of HSP70 and Cpn60 with ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase upon its import into chloroplasts. FEBS Lett . 1993, 320, 198-202.

- Velitchkova, M.Y., Ivanov, A.G. et Christov, A.M.  
Ultrastructural and fluorescence properties of granal and stromal membranes of pea chloroplasts exposed to heat stress. Photosynthetica. 1989, 23(3), 360-363.
- Vezquetz, D. FEBS Lett . 1974, 40, S63-S84.
- Vierling, E., Mishkind, M.L., Schmidt, G.W., et Key, J.L.  
Specific heat shock proteins are transported into chloroplasts Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986, 83, 361-365.
- Vierling, E., Nagao, R.T., DeRocher, A.E., et Harris, L.M.  
A heat shock protein localized to chloroplasts is a member of a eukaryotic superfamily of heat shock proteins. EMBO J. 1988, 7, 575-582.
- Vierling, E., Harris, L.M., et Chen, Q. The major low molecular weight heat shock protein in chloroplasts shows antigenic conservation among diverse higher plant species. Mol. Cell. Biol. 1989, 9, 461-468.
- Vierling, E. HSP synthesis and accumulation in diploid wheat. Crop. Sci. 1990. 30, 1337-1342.
- Vigh, L., Gombos, Z., Horvath, I. et Joo, F. Saturation of membrane lipids by hydrogenation induces thermal stability in chloroplast inhibition the heat-dependent stimulation of photosystem I mediated electron transport. Biochim.Biophys. Acta 1989, 979, 361-364.
- Walker, D.A., Cerovic, Z.G. et Robinson, S.P. Isolation of intact chloroplasts: General principles and criteria of integrity. Methods Enzymol. 1987, 148, 145-157.
- Weisbeek, P., Hageman, J., De Boer, D. et Smeekens, S.  
Transport of proteins towards the chloroplast thylakoid lumen. Israel J. botany . 1991, 40, 123-137.

- Wiest, S.C. Kinetic and proteolytic identification of heat-induced conformational changes in the urea herbicide binding site of isolated *Phaseolus vulgaris* chloroplast thylakoids. Plant Physiol. 1986, 66, 527-535.
- Wu, M.-T., et Wallner, S.J. Heat stress responses in cultured plant cells. Heat tolerance induced by heat shock versus elevated growing temperature. Plant Physiol. 1984, 75, 778-780.
- Xiao, C.-M., et Mascarenhas, J.P. High temperature-induced thermotolerance in pollen tubes of *Tradescantia* and heat-shock proteins. Plant Physiol. 1985, 78, 887-890.
- Yalovski, S., Paulsen, H., Michaeli, D., Chitnis, P.R. et Nechushtai, R. Involvement of a chloroplast HSP70 heat shock protein in the integration of a protein (light harvesting complex protein precursor) into the thylakoid membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992, 89, 5616-5619.
- Yamamoto, H.Y. Biochemistry of the violaxanthin cycle in higher plants. Pure Appl. Chem. 1979, 51, 639-648.
- Yarwood, C.E. Acquired tolerance of leaves to heat. Science. 1961, 134, 941-942.