

UNIVERSITE DU QUEBEC

MEMOIRE

PRESENTÉ A

L'UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAITRISE EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR

CHANTAL LORANGER

"UTILISATION DES MEMBRANES PHOTOSYNTETIQUES IMMOBILISEES
COMME BIOCAPTEUR DE PHYTOTOXICITE"

Novembre 1992

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.

RESUME

La contamination de l'eau est un problème écologique important. La société a besoin de bioessais rapides et simples pour vérifier régulièrement le potentiel toxique des effluents. L'emploi de membranes photosynthétiques immobilisées dans une matrice d'albumine-glutaraldéhyde comme biosenseur de phytotoxicité peut répondre à ce besoin urgent. L'avantage de l'immobilisation est la grande stabilité qu'elle apporte aux membranes photosynthétiques. Le principe de la méthode repose sur l'oxygène dégagée par des membranes photosynthétiques soumises à un éclairage qui est mesuré avec une électrode de type Clark. Ce dégagement d'oxygène résulte du transport d'électrons, lequel est inhibé par la plupart des composés toxiques.

Les principaux objectifs de ce travail sont de maximiser l'activité photosynthétique des membranes immobilisées et de vérifier leur stabilité aux conditions éventuelles d'utilisation ainsi que leur sensibilité à différents composés toxiques.

Dans le but d'obtenir le meilleur rendement photosynthétique, le contenu en sels des tampons ainsi que la concentration optimale de l'accepteur artificiel d'électrons (DCBQ) pour différentes concentrations de Chl ont été déterminés.

Les membranes immobilisées sont plus stables que les natives sous différentes conditions d'entreposage. Les conditions leur offrant la plus grande stabilité sont l'obscurité et une température de 4 °C. Les membranes immobilisées sont également plus stables aux fluctuations de température et de pH que les membranes non immobilisées.

En plus de cette grande stabilité, les membranes immobilisées offrent également l'avantage d'avoir un seuil minimal de détection plus bas que les membranes libres pour plusieurs polluants. Cette meilleure capacité de détection provient probablement de la plus grande accessibilité du site d'inhibition Q_B suite aux changements conformationnels engendrés par l'immobilisation. Les membranes immobilisées sont toutefois de moins bons détecteurs pour les polluants ayant le complexe de dégagement d'oxygène comme site d'inhibition puisque les dits changements conformationnels provoqués par l'immobilisation défavoriseraient par contre, l'accessibilité des polluants à ce site. Le seuil minimal de détection des membranes immobilisées peut être amélioré en diminuant la concentration en Chl.

Ainsi, la grande stabilité des membranes immobilisées rend leur emploi fortement convenable pour la réalisation de bioessais sur le terrain puisqu'elles ne nécessitent pas de précautions excessives pour leur conservation et leur manipulation. De plus, étant donné que Q_B est le site d'inhibition de la plupart des herbicides et de plusieurs métaux, les membranes immobilisées peuvent être considérées comme un biosenseur très sensible, comparativement aux autres bioindicateurs

REMERCIEMENTS

J'aimerais faire part de ma reconnaissance à mon directeur, M. Robert Carpentier pour la confiance qu'il m'a accordée au cours de ces deux années de recherche. J'apprécie également la disponibilité, les conseils et l'aide qu'il a toujours su m'offrir.

Le support de mes collègues de laboratoire a allégé les moments les plus difficiles. Et que dire de leur amitié si précieuse. Merci à vous tous: Michelle pour ton oreille attentive, Josée pour tes conseils, Isabelle pour ton aide, Marc, Nathalie M., Johanne, Monique, Marie-Josée, Nathalie B., Daren, Stéphane et Sylvain pour tous les services rendus.

Je tiens aussi à remercier sincèrement mes parents pour leur compréhension et leur support financier tout au long de mes études. Merci spécialement à toi, Charles, pour ta compréhension, ton support constant et tes encouragements inestimables toujours au rendez-vous.

TABLE DES MATIERES

	Page
RESUME	ii
REMERCIEMENTS	iv
TABLE DES MATIERES	v
LISTE DES ABREVIATIONS	ix
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES TABLEAUX	xx
CHAPITRES	
1. INTRODUCTION	1
1.1 La problématique	1
1.2 Objectifs de la recherche	5
1.3 La photosynthèse	8
1.3.1 Le chloroplaste	9
1.3.2 Phase lumineuse	11
1.3.2.1 Absorption de la lumière	12
1.3.2.2 Transport d'électrons	15
1.3.2.3 Photophosphorylation	19
1.3.3 Phase sombre	20
1.3.3.1 Cycle de calvin	20
1.4 Le photosystème II	21
1.4.1 Structure et fonction du photosystème II	21
1.4.2 Complexe de dégagement d'oxygène	23

1.4.2.1 Le cycle d'oxydation de l'eau	24
1.4.2.2 Rôle des atomes de manganèse	25
1.4.2.3 Rôle du calcium et du chlore	26
1.4.2.4 Rôle des protéines extrinsèques	27
1.5 Utilisation des membranes photosynthétiques comme biocapteur de phytotoxicité	27
1.5.1 Inhibition du photosystème II par les herbicides et les métaux	28
1.5.1.1 Les herbicides	28
1.5.1.2 Les métaux	31
1.5.2 Instabilité des membranes photosynthétiques isolées ..	34
1.6 Modèle conceptuel	35
2. MATERIELS ET METHODES	43
2.1 Préparation des membranes thylacoïdiennes	43
2.2 Immobilisation des thylacoïdes	44
2.2.1 Variation de la concentration de chlorophylle lors de l'immobilisation	46
2.3 Dégagement d'oxygène	47
2.3.1 Description de l'appareil	47
2.3.2 Calibration de l'appareil	49
2.3.3 Préparation des échantillons	49
2.3.4 Prise des mesures	49
2.3.5 Calcul de la quantité d'oxygène dégagée	51
2.3.6 Variation de la température	51
2.3.7 Variation du pH	52

2.4 Entreposage à la lumière	53
2.5 Entreposage à l'obscurité	54
2.6 Inhibition	54
2.7 Traitement des données	56
3. RESULTATS ET DISCUSSION	57
3.1 Mise au point des conditions d'utilisation des membranes immobilisées	57
3.1.1 Etude comparative de différentes combinaisons de tampons	57
3.1.2 Détermination de la concentration optimale de l'accepteur artificiel d'électrons	60
3.1.3 Etude du temps de vie des membranes photosynthétiques sous différentes conditions d'entreposage	76
3.2 Inhibition de l'activité photosynthétique par des polluants ..	88
3.2.1 Les herbicides	94
3.2.2 Les métaux	98
3.2.3 Autres polluants	102
3.3 Temps d'incubation	106
3.4 Inhibition par des échantillons industriels	112
3.5 Influence de la concentration en chlorophylle sur l'inhibition	119
3.6 Influence de la température sur l'inhibition	123
3.7 Influence du pH sur l'inhibition	128
3.8 Discussion générale	134
4. CONCLUSIONS	137

Bibliographie	142
---------------------	-----

LISTE DES ABREVIATIONS

A_O: accepteur d'électrons du P700

A₁: accepteur d'électrons de A_O

ACP: pigments accessoires dont le CP24, CP26 et CP29

PIA: protéines intrinsèques accessoires

ATP: adénosine triphosphate

BSA: albumine de sérum bovin

CCI: "core complexe" associé au PSI

CCII: "core complexe" associé au PSII

CCL: complexe collecteur de lumière

CCL-1: complexe collecteur de lumière périphérique associé au PSI

CCL-11: complexe collecteur de lumière périphérique et mobile associé au PSII

CFO: structure intramembranaire de l'ATP synthétase

CF1: structure extramembranaire de l'ATP synthétase

Chl: chlorophylle

CP43: complexe pigment-protéine de 43 kDa de l'antenne proximale

CP47: complexe pigment-protéine de 47 kDa de l'antenne proximale

Cyt: cytochrome

D₁: protéine intrinsèque du PSII de 32 kDa

D₂: protéine intrinsèque du PSII de 34 kDa

DCBQ: 2,5-dichloro-p-benzoquinone

Fd: ferrédoxine

FeS: complexe fer-soufre comprenant trois protéines: Fx, Fa et Fb

FNR: ferrédoxine NADP⁺ réductase

GAP: sucre à trois atomes de carbone

HA: phéophytine fonctionnelle localisée en D₁

HB: phéophytine non fonctionnelle localisée en D₂

NADPH: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

PC: plastocyanine

Phéo: phéophytine

PQ: plastoquinone

PQH₂: plastoquinol

PSI: photosystème I

PSII: photosystème II

P680: centre réactionnel du PSII

P700: centre réactionnel du PSI

Q_A: accepteur primaire d'électrons du PSII

Q_B: accepteur secondaire d'électrons du PSII

RUBP: ribulose-biphosphate

S: état d'oxydation du complexe de dégagement d'oxygène

SD: Solides dissous

SS: Solides en suspension

ST: Solides totaux

Tes: acide N-Tris [Hydroxyméthyle] méthyle-2-aminoéthanesulfonique

Y_D: tyrosine localisée en D₂

Y_Z: tyrosine localisée en D₁

Z: donneurs primaire d'électrons du PSII

LISTE DES FIGURES

Figures	Page
1. Structure du chloroplaste (tiré de Hader, D.P. et Tevini, M., 1987)	10
2. Modèle de la structure des thylacoïdes chez les plantes supérieures et les algues (tiré de Hader, D.P. et Tevini, M., 1987)	11
3. Représentation schématique de l'organisation des complexes du PSII (tiré de Bassi, R. et al., 1990)	14
4. Représentation schématique de l'organisation des complexes du PSI (tiré de Bassi, R. et al., 1990)	15
5. Schéma décrivant la séquence des transporteurs d'électrons dans les thylacoïdes (tiré de Voet, D. et Voet, G.J., 1990)	16
6. Représentation schématique de l'organisation fonctionnelle du PSII (tiré de Hansson, O. et Wydrzynski, T., 1990)	21

7. Cycle d'oxydation de l'eau (tiré de Rutherford, A.W., 1989) ...	24
8. Représentation schématique de la poche de liaison de la plastoquinone et des herbicides sur la protéine D1. A) liaison de la PQ B) Liaison de l'atrazine (schéma tiré de Fuerst, E.P. et Norman, A., 1991)	29
9. Représentation schématique de la méthode d'immobilisation. .	45
10. Représentation schématique des réactions de l'électrode de type Clark	48
11. Dégagement d'oxygène (μ Mol O ₂ /mg Chl.h) en fonction de la concentration de DCBQ (μ M) pour des membranes natives et immobilisées concentrées à 11 μ g Chl/mL	63
12. Dégagement d'oxygène (μ Mol O ₂ /mg Chl.h) en fonction de la concentration de DCBQ (μ M) pour différentes concentrations de Chl dans la matrice d'immobilisation (μ g/mL)	66
13. Concentration optimale de DCBQ pour différentes concentrations de Chl (μ g/mL)	67
14. Dégagement d'oxygène (μ Mol O ₂ /mg Chl.h) en fonction de la concentration de DCBQ (μ M) pour différents volumes de	

matrices (μ L).....	69
15. Dégagement d'oxygène (μ Mol O ₂ /mg Chl.h) en fonction du volume des matrices (μ L) reflétant différentes concentrations de Chl (μ g/mL) en présence de 400 μ M de DCBQ	71
16. Dégagement d'oxygène (μ Mol O ₂ /h) en fonction du volume des matrices (μ L)	72
17. Dégagement d'oxygène (μ Mol O ₂ /mg Chl.h) en fonction de la concentration de Chl (μ g/mL) chez des membranes natives en présence de 100 μ M de DCBQ	74
18. Dégagement d'oxygène (μ Mol O ₂ /h) en fonction de la concentration de Chl (μ g/mL) chez des membranes libres	75
19. Activité photosynthétique (%) en fonction de la période d'entreposage (h) à l'obscurité et à 4 °C, pour des membranes natives (o) et immobilisées (●) concentrées à 11 μ g/mL	77
20. Entreposage à l'obscurité et à 22 °C des membranes natives (o) et immobilisées (●) concentrées à 11 μ g/mL	79
21. Entreposage à l'obscurité à 4 °C de différentes concentrations de Chl, 3 μ g/mL (●) et 20 μ g/mL (*) et de différents volumes	

de matrices, 20 μ L (■) et 138 μ L (+).....	81
22. Activité photosynthétique (%) en fonction de la période d'entreposage (h) à l'obscurité et à 22 °C pour des volumes de matrices de 20 μ L (o) et de 75 μ L (●).....	83
23. Activité photosynthétique (%) en fonction de la période d'entreposage (h) à la lumière et à 4 °C, pour des membranes natives (o) et immobilisées (●) renfermant 11 μ g Chl/mL	85
24. Activité photosynthétique (%) en fonction de la période d'entreposage (h) à la lumière à 22 °C pour des membranes natives (o) et immobilisées (●) renfermant 11 μ g Chl/mL	87
25. Activité photosynthétique (%) en fonction de la période d'entreposage (h) à la lumière et à 4 °C pour des matrices de 20 μ L (*), 75 μ L (●) et 138 μ L (o).....	89
26. Activité photosynthétique (%) en fonction de la période d'entreposage (h) à la lumière et à 22 °C pour des matrices de 20 μ L (*), 75 μ L (●) et 138 μ L (o)	90
27. Effet de l'hydratation sur l'activité photosynthétique des membranes immobilisées comprenant 11 μ g Chl/mL et entreposées à la lumière, à 22 °C	91

28. Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration d'atrazine	95
29. Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de diuron	97
30. Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de bromoxynil	99
31. Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de mercure	101
32. Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de cuivre	103
33. Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de sulfite de sodium	104
34. Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de nitrite de sodium	105
35. Influence du temps d'incubation chez des membranes natives en présence de 2.5×10^{-6} M d'atrazine, 5×10^{-6} M de diuron et 10^{-5} M de bromoxynil	108

36. Influence du temps d'incubation chez des membranes immobilisées en présence de 10^{-6} M d'atrazine, 5×10^{-7} M de diuron et 10^{-5} M de bromoxynil	109
37. Influence du temps d'incubation pour des membranes libres en présence de 5×10^{-5} M de mercure et de 2.5×10^{-4} M de cuivre	110
38. Influence du temps d'incubation pour des membranes immobilisées en présence de 10^{-4} M de mercure et de cuivre	111
39. Influence du temps d'incubation pour des membranes natives en contact avec 7.5×10^{-3} M de nitrite de sodium et 1.2×10^{-4} M de sulfite de sodium	113
40. Influence du temps d'incubation pour des thylacoïdes immobilisés en contact avec 7.5×10^{-3} M de nitrite de sodium et 3×10^{-4} M de sulfite de sodium	114
41. Effet inhibiteur de l'échantillon industriel #1 sur le dégagement d'oxygène	117
42. Effet inhibiteur de l'échantillon industriel #2 sur l'activité photosynthétique	118

43. Effet de la concentration de Chl sur la sensibilité des membranes natives à 67.5×10^{-8} M d'atrazine (o) et des membranes immobilisées où le rapport de Chl/BSA est d'une part constant (▲) et d'autre part variable (●) à 9×10^{-8} M d'atrazine	120
44. Effet de la concentration en Chl sur la sensibilité des membranes natives (o) à 10^{-5} M de cuivre et des membranes immobilisées où le rapport de Chl/BSA est d'une part constant (▲) et d'autre part variable (●), à 10^{-6} M de cuivre	121
45. Influence de la température sur l'activité photosynthétique ..	125
46. Influence de la température sur le pourcentage d'inhibition par l'atrazine: 22.5×10^{-7} M chez les membranes natives et 9×10^{-7} M chez les immobilisées	126
47. Influence de la température sur le pourcentage d'inhibition par le cuivre: 2.5×10^{-4} M chez les membranes natives et 10^{-4} M chez les immobilisées	127
48. Influence du pH sur l'activité photosynthétique	129
49. Influence du pH sur le pourcentage d'inhibition par l'atrazine: 22.5×10^{-7} M chez les membranes natives et 9×10^{-7} M	

chez les immobilisées	131
50. Influence du pH sur le pourcentage d'inhibition par le cuivre: 2.5×10^{-4} M chez les membranes natives et 10^{-4} M chez les immobilisées	132

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux	Page
1. Méthodes d'immobilisation	36
2. Solubilité de l'oxygène	52
3. Tampons utilisés pour les mesures de dégagement d'oxygène .	53
4. Caractéristiques des inhibiteurs utilisés	55
5. Effet de différentes combinaisons de tampons pour l'extraction, l'immobilisation et le dégagement d'oxygène sur l'activité photosynthétique	59
6. Valeurs du I_{50} pour différents inhibiteurs	93
7. Paramètres analysés pour deux échantillons industriels	116

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 La problématique

De nos jours, la contamination de l'eau est un problème sans cesse grandissant. Plusieurs produits toxiques incluant une multitude de pesticides et de métaux contaminent autant les eaux de surface que les eaux souterraines. En effet, la popularité des monocultures favorise l'accroissement de l'utilisation de pesticides et d'engrais en agriculture pour de meilleurs rendements. L'atrazine est le pesticide le plus utilisé à travers le monde. Son utilisation annuelle est estimée entre 75 et 90 millions de livres (Belluck, D.A., et al., 1991). A cause de sa forte solubilité dans l'eau ($33\ 000\ \mu\text{g/L}$ à $27\ ^\circ\text{C}$), l'atrazine a été retrouvée en concentrations traces dans plusieurs eaux de surface et souterraines des Etats-Unis (Adams, C.D. et al., 1990). L'écoulement de produits toxiques vers les cours d'eau et les eaux souterraines réduit la qualité de l'eau potable. A long terme, la consommation d'eau polluée peut être dangereuse pour la santé humaine.

Avec le secteur de l'agriculture, l'industrie compte parmi les pollueurs de l'environnement. Chaque année, il se produit de

nombreux accidents écologiques, voir même des catastrophes où des quantités importantes de produits toxiques sont déversées dans les lacs et rivières avoisinants les industries. Entre autres, celle de Tchernobyl a marqué l'histoire. Encore plus inquiétant que les désastres, il y a les petites quantités déversées quotidiennement se situant encore dans le cadre légal (Winter, G., 1989). Même si plusieurs efforts sont en cours de ce côté, les industries jouent, encore aujourd'hui, un rôle très important dans le problème de la qualité de l'eau.

Pour remédier à la problématique de l'augmentation du nombre sans cesse croissant de produits chimiques se retrouvant dans les cours d'eau, l'idéal serait d'assurer un contrôle très sévère de sa qualité en vérifiant régulièrement son potentiel toxique à l'aide de bioessais. Toutefois, l'emploi de bioessais utilisant des organismes aquatiques entiers s'avère impraticable dans une telle optique puisque ces tests sont très coûteux, très longs, souvent laborieux et inapplicables sur le terrain. En réalité, la plupart des bioessais de toxicité utilisant des poissons ou des invertébrés aquatiques coûtent plus de \$700 chacun et requièrent de 48 à 96 h avant d'être complétés (Blondin G.A. et al., 1989).

Pour devancer ces biotests utilisant des organismes entiers, une grande variété de bioessais *in vitro*, pouvant être exécutés rapidement

et à des coûts minimes, a été développée. L'objectif ultime de ces recherches est de découvrir le biotest idéal permettant de déterminer rapidement les sites pollués et d'en contrôler continuellement la qualité de leurs eaux (Blondin, G.A. et al., 1989).

Par exemple, l'utilisation des microorganismes dans les tests aquatiques a connu un intérêt grandissant. Parmi ces bioessais, il y a le Microtox, test basé sur la réduction de la bioluminescence de la bactérie marine, *Photobacterium phosphoreum*, par les toxiques (Ankley, G.T., 1989). Il y a aussi le test de Ames appuyé sur la capacité de mutation du gène de l'enzyme responsable de la synthèse de l'histidine chez la bactérie *Salmonella* (Collie, R. van, 1990). De plus, il y a des tests fondés sur l'inhibition de la reproduction ou de la mobilité du Crustacé *Daphnia*, et sur l'inhibition de la croissance d'une culture cellulaire d'algue *Selenastrum*, etc. (Rawson, D.M. et Willmer, A.J., 1987; Collie, R. van, 1990). Bien qu'ils aient connu du succès, ces tests véhiculent deux désavantages majeurs. Premièrement, leur réalisation requiert beaucoup de manipulations et, par conséquent, demandent trop de temps. Deuxièmement, ils ne peuvent être réalisés facilement sur le terrain puisqu'ils nécessitent des outils analytiques sophistiqués. Ces lacunes ne permettent pas un suivi continu du potentiel toxique des effluents (Rawson, D.M. et al., 1987).

Cette problématique empêchant la réalisation d'un tel objectif a stimulé les recherches dans le domaine de la biotechnologie. Depuis le début des années 1980, il y a eu beaucoup d'avancement dans

l'application de la biologie moléculaire et d'autres techniques du vivant pour créer des produits commerciaux nouveaux, maintenant classés dans le domaine de la biotechnologie (Gronow, M. et al., 1985). Les biosenseurs en sont un exemple.

De façon générale, un biosenseur consiste en une composante biologique, comme un enzyme, un morceau de tissu ou une cellule entière, tenue à proximité de la surface d'un élément transducteur traduisant leur réponse biochimique en un signal électrique (Rawson, D.M. et Willmer, A.J., 1987). Les biosenseurs peuvent offrir une alternative pratique pour les mesures de toxicité environnementale particulièrement en terme de coût, de rapidité, de simplicité, de facilité de fabrication et d'utilisation. Ainsi, ils sont convenables pour une utilisation sur le terrain permettant une évaluation routinière de la qualité de l'eau au point de vue toxicologique (Rawson, D.M. et Willmer, A.J., 1987).

Plusieurs polluants se retrouvant dans les effluents inhibent la photosynthèse au niveau du transport d'électrons. Cette inhibition restreint alors la croissance du phytoplancton qui est la base de la biomasse aquatique. Etant donné que la photosynthèse est le premier processus physiologique végétal affecté par plusieurs polluants, l'utilisation des membranes photosynthétiques comme biocapteur de phytotoxicité s'avère une ressource intéressante. Parmi les composés

toxiques inhibant le transport photosynthétique d'électrons, il y a plusieurs herbicides, dont les dérivés phénols, urées et triazines. En plus des pesticides, il y a des composés tels les nitrites et les sulfites utilisés dans les engrains ainsi que la plupart des métaux tels le mercure, le cuivre, le zinc, le cadmium et le nickel (Purcel, M. et Carpentier, R., 1990).

1.2 Objectifs de la recherche

Grâce à leur capacité de transformer l'énergie lumineuse en énergie chimique, les membranes photosynthétiques sont potentiellement utilisables dans plusieurs types d'applications biotechnologiques. L'équipe du Docteur Robert Carpentier a déjà démontré le potentiel de la cellule photoélectrochimique utilisant des membranes photosynthétiques comme biocapteur de phytotoxicité (Purcell, M. et Carpentier, R., 1990). D'autres études ont permis de caractériser et d'optimiser leur réponse à différents produits toxiques dans la perspective d'une technologie appliquée. Toutefois, ces différentes études démontrent que les facteurs limitant l'utilisation des membranes thylacoïdiennes en tant que biocapteur sont leur temps de vie trop court et leur instabilité dans des conditions éventuelles d'utilisation comme celles reliées à la présence de lumière, de fluctuations de température et de pH (Thomasset et al., 1984). Tout progrès significatif dans ce domaine est alors limité par le manque de

stabilité du matériel biologique isolé (Bonenfant, D. et Carpentier, R., 1989).

Il semble donc nécessaire de protéger et de stabiliser leur activité photochimique après leur extraction (Thomasset et al., 1984). Une façon générale d'améliorer la stabilité des fonctions biologiques autant sous des conditions d'entreposage que de travail, tout en facilitant la manipulation du matériel, est l'immobilisation dans une matrice artificielle (Papageorgiou, G.C., 1983).

Etant donné que l'immobilisation du matériel photosynthétique dans une matrice appropriée constituerait une solution à ce problème et faciliterait leur commercialisation en tant que biosenseur pour la réalisation de bioessais sur le terrain, il serait alors très pertinent d'optimiser et de vérifier l'applicabilité d'une telle technique. Dans ce contexte, les objectifs de ma recherche sont:

A) Maximisation de l'activité photosynthétique des membranes thylacoïdiennes immobilisées

Normalement, il est reconnu que l'immobilisation entraîne une perte de l'activité photosynthétique. Il importe alors de tenter de minimiser cet effet. Pour ce faire, il est nécessaire de mettre au point les conditions optimales d'utilisation où le meilleur rendement photosynthétique est obtenu pour optimiser l'applicabilité de la

technique. Pour ce faire, les phénomènes pouvant influencer l'immobilisation et le rendement photosynthétique sont étudiés.

B) Détermination du temps de vie de la matrice comportant différentes concentrations de chlorophylle (Chl)

Le but ultime de cet objectif est de mieux cerner les conditions d'utilisation des membranes immobilisées. Sachant que la longévité de l'activité du matériel photosynthétique est un important indice de stabilité, il s'agit de mieux connaître l'effet de la lumière et de la température sur la stabilité des membranes immobilisées, en vue de leur utilisation sur le terrain.

C) Vérification de la sensibilité des membranes immobilisées en présence de divers produits toxiques

Il importe de connaître le degré de sensibilité des membranes immobilisées face à divers polluants typiques tels l'atrazine, le diuron, le bromoxynil, le mercure, le cuivre, le nitrite de sodium et le sulfite de sodium. Ces polluants sont tous dommageables pour la vie aquatique et susceptibles d'être présents dans un effluent à cause d'épandage agricole, de rejets industriels, d'engrais chimiques ou autre. De plus, il est nécessaire de comparer ces différentes réponses à

celles obtenues avec les membranes natives pour savoir si elles sont aussi sensibles.

D) Vérification préliminaire de la sensibilité des membranes immobilisées en tant que biocapteur de phytotoxicité à partir d'échantillons d'eau provenant d'effluents industriels

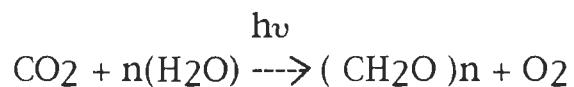
Il s'agit, lors de cette étape, d'effectuer un essai préliminaire du biocapteur avec deux échantillons industriels préalablement analysés par une firme reconnue. La sensibilité des membranes immobilisées est également comparée avec celle du matériel photosynthétique non immobilisé.

1.3 La photosynthèse

Afin de mieux comprendre la pertinence de l'utilisation des membranes photosynthétiques comme biocapteur de phytotoxicité, il est important de revoir quelques notions de photosynthèse.

La vie sur la terre dépend du soleil. En effet, le soleil communique aux organismes terrestres l'énergie dont ils ont presque tous besoin pour survivre. Toutefois, les cellules ne peuvent utiliser directement la lumière. Pour être exploitée, la lumière nécessite une transformation en énergie chimique (Voet D. et Voet J.G., 1990; Govindjee et Coleman,

W., 1990). La nature s'est alors dotée d'un processus appelé photosynthèse où des organismes photosynthétiques, comme les algues et les plantes supérieures, transforment l'énergie lumineuse du soleil pour produire les sucres nécessaires à leur subsistance, et ce, à partir de l'eau et du gaz carbonique disponibles dans la nature. Ce processus est accompagné d'une production d'oxygène indispensable à la survie de tous les organismes vivants sur la terre. Ces relations peuvent s'exprimer par la réaction globale suivante:



1.3.1. Le chloroplaste

Chez les eucaryotes, la photosynthèse s'opère dans un organite de la cellule appelé chloroplaste. Le chloroplaste est formé d'une double membrane, dont l'une est dite externe et l'autre interne, entourant le stroma. Le stroma est un espace d'apparence granuleuse comprenant des organites cellulaires et des membranes thylacoïdiennes issues de la membrane interne par invagination. Les thylacoïdes sont des membranes spécialisées dans les réactions photochimiques de la photosynthèse. Ils forment un système membranaire clos hautement replié sous forme de vésicules aplatis. Plusieurs thylacoïdes sont empilés pour former les grana. Ceux-ci sont unis par des thylacoïdes non empilés appelés thylacoïdes stromatiques (figure 1).

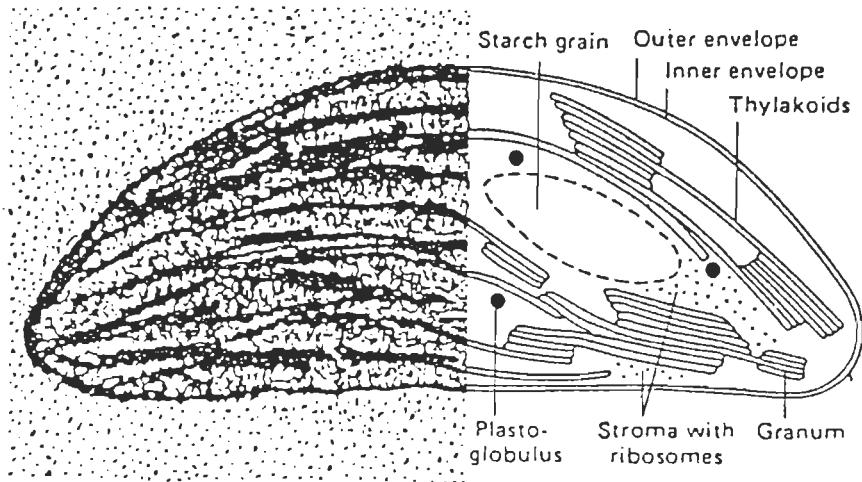


FIGURE 1. Structure du chloroplaste (tiré de Hader, D.P. et Tevini, M., 1987).

Dans la membrane du thylacoïde, il y a des complexes pigments-protéines hautement organisés soit le photosystème I (PSI) et le photosystème II (PSII). Chaque photosystème possède son propre complexe de pigments collectant la lumière (CCL-I et CCL-II) et transférant les photons absorbés à son centre réactionnel (PSI et PSII respectivement). Une chaîne transporteuse d'électrons relie le PSII au PSI. Les photosystèmes sont liés à des protéines périphériques. Sur la face intérieure du thylacoïde, un complexe protéique est responsable de la photolyse de l'eau. Sur la face externe, une autre protéine catalyse la réduction du NADP^+ (Hader, D.P. et Tevini, M., 1987). De plus, un autre complexe protéique est présent dans la membrane thylacoïdienne, soit l'ATPase. Il est responsable de la synthèse de l'adénosine triphosphate (ATP) utilisé lors de la fixation du CO_2 .

(Hader, D.P. et Tevini, M., 1987). Un modèle hypothétique de l'arrangement de ces différents complexes avec leur sous-unités est représenté à la figure 2.

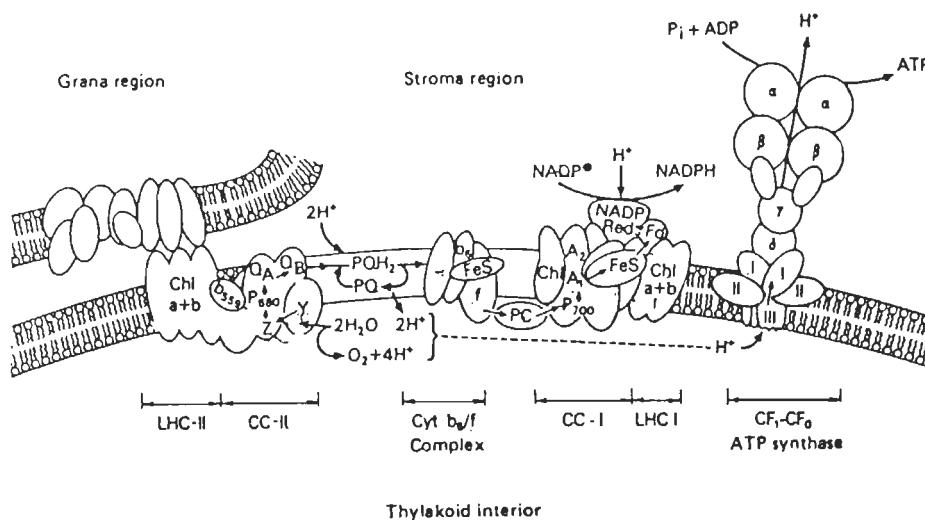


FIGURE 2. Modèle de la structure des thylacoïdes chez les plantes supérieures et les algues (tiré de Hader, D.P. et Tevini, M., 1987).

1.3.2. Phase lumineuse

La photosynthèse est subdivisée en deux phases caractéristiques: la phase lumineuse et la phase sombre. Dans la phase lumineuse, il y a formation de composés riches en énergie soit du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) et de l'ATP. Ce procédé a lieu dans les membranes thylacoïdiennes. Le NADPH et l'ATP ainsi produits sont utilisés pour la formation des sucres dont la plante se nourrit. La formation des sucres a lieu lors de la phase sombre, dans le stroma.

L'emploi des membranes photosynthétiques comme biocapteur, tel que proposé, est basé sur le processus de la phase lumineuse. Voyons plus en détail ce mécanisme.

1.3.2.1 Absorption de la lumière

Chaque thylacoïde contient des pigments responsables de l'absorption lumineuse. Chez les plantes supérieures et les algues, le principal photorécepteur est la chlorophylle (Chl) dont les variétés les plus importantes sont la Chl a et la Chl b. En plus des Chl, il y a des pigments accessoires comme les caroténoïdes. En effet, les caroténoïdes absorbent la lumière dans les régions du spectre visible où les Chl ne sont pas efficaces, pour la transférer aux autres pigments avoisinants. Absorbant à des maximums différents, l'ensemble des pigments photosynthétiques couvre ainsi la partie de la lumière visible entre 435 et 700 nm. Cette diversité permet également de protéger les centres réactionnels contre une photodestruction irréversible (Frank, H.A. et al., 1991).

L'absorption d'un photon par les pigments photosynthétiques se traduit par une transition électronique partant d'un niveau fondamental à un niveau excité. Les Chl excitées (Chl^*) transfèrent l'énergie à des molécules voisines non excitées et ayant des propriétés électroniques similaires. L'énergie du photon absorbé est, de cette manière, transférée jusqu'aux centres réactionnels où les réactions

primaires de la photosynthèse prennent place (Voet, D. et Voet, J.G., 1990). La grande efficacité du transfert d'énergie entre les pigments photosynthétiques dépend de l'arrangement spatial et de l'orientation appropriée des molécules de Chl. Ainsi, pour un maximum d'efficacité, les Chl sont associées à des protéines dans les thylacoïdes formant ainsi, des complexes Chl-protéines appelés complexes collecteurs de lumière (CCL) (Hader, D.P. et Tevini, M., 1987; Voet, D. et Voet, J.G., 1990). Parmi les CCL, il y a deux complexes intimement associés aux centres réactionnels des PSI et PSII appelés "core complexe" CCI et CCII et deux complexes collecteurs de lumière périphériques appelés CCL-I et CCL-II (Bassi, R. et al., 1990).

Pour collecter la lumière, le PSII est muni d'une antenne distale et d'une proximale. L'antenne distale se divise en deux parties: les CCL-II et l'ACPII. Les trois CCL-II, sont des complexes collecteurs de lumière formés de Chl a/b répartissant l'énergie entre le PSII et le PSI. L'ACPII désigne, quant à lui, des pigments accessoires. Parmi ceux-ci, il y a le CP29, le CP26 et le CP24. Ils permettent aux organismes photosynthétiques d'étendre leur spectre lumineux à d'autres longueurs d'onde. Les plantes peuvent ainsi mieux s'adapter à différentes intensités lumineuses (Hansson, O. et Wydrzynski, T., 1990). Tant qu'à l'antenne proximale, elle comprend deux complexes pigments-protéines de 43 et 47 kDa (CP47 et CP43) liés au centre réactionnel du PSII (P680). Ces complexes focalisent l'énergie absorbée

par l'antenne distale vers le CCII avec lequel ils sont étroitement couplés. Ce transfert d'énergie s'exprime comme suit:

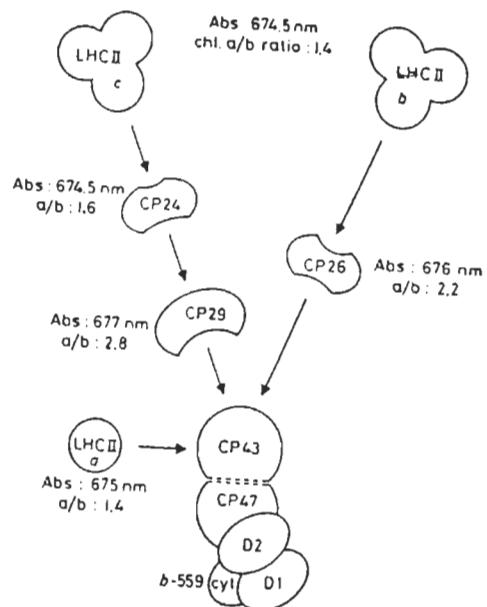


Figure 3. Représentation schématique de l'organisation des complexes du PSII (tiré de Bassi, R. et al., 1990).

Au niveau du PSI, il existe deux complexes collecteurs de lumière. Il y en a un périphérique, le CCL-I 680 et un autre étroitement associé au CCI, le CCL-I 730. Ces deux complexes ont comme rôle la photoprotection du CCI. Le CCL-I 680 est essentiel au transfert d'énergie de CCL-II venant des grana vers le PSI. Le CCI renferme le centre réactionnel du PSI (P700). Il est formé d'un dimère de Chl absorbant la lumière à 700 nm. Ce transfert d'énergie au niveau du PSI peut être représenté schématiquement comme suit:

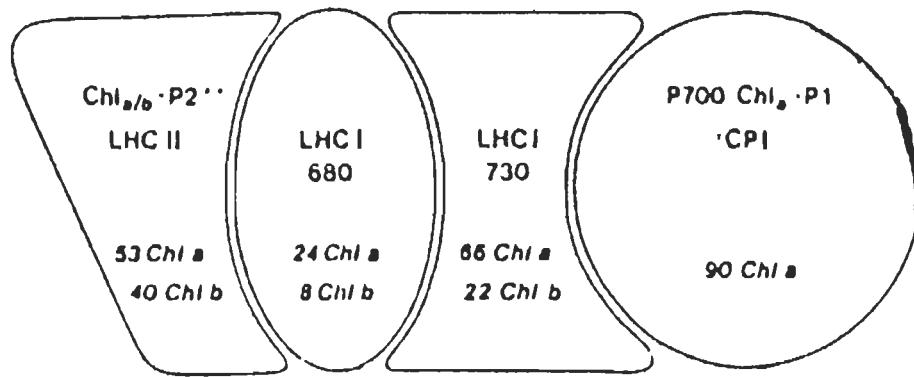


FIGURE 4. Représentation schématique de l'organisation des complexes du PSI (tiré de Bassi, R. et al., 1990).

Ainsi, ces complexes absorbent la lumière et la transforment en énergie électrique utile pour la photosynthèse primaire du chloroplaste (Foyer, 1984).

1.3.2.2 Transport d'électrons

Une fois l'énergie lumineuse absorbée et catalysée vers les centres réactionnels, ces derniers, étant des molécules de Chl a spécialisées, transforment l'énergie du photon en énergie potentielle associée à une séparation de charge électrique (Govindjee et Coleman, W., 1990). Les électrons sont alors transférés de l'eau au NADP⁺ via des transporteurs d'électrons. Ces derniers sont organisés en trois principaux complexes: le PSII associé au complexe de dégagement d'oxygène, le PSI et le

cytochrome b6/f (cyt b6/f) fonctionnant en série (Murakami, S. et Toda, T., 1988). L'ensemble des transporteurs d'électrons est souvent représenté à l'aide du schéma suivant (figure 5).

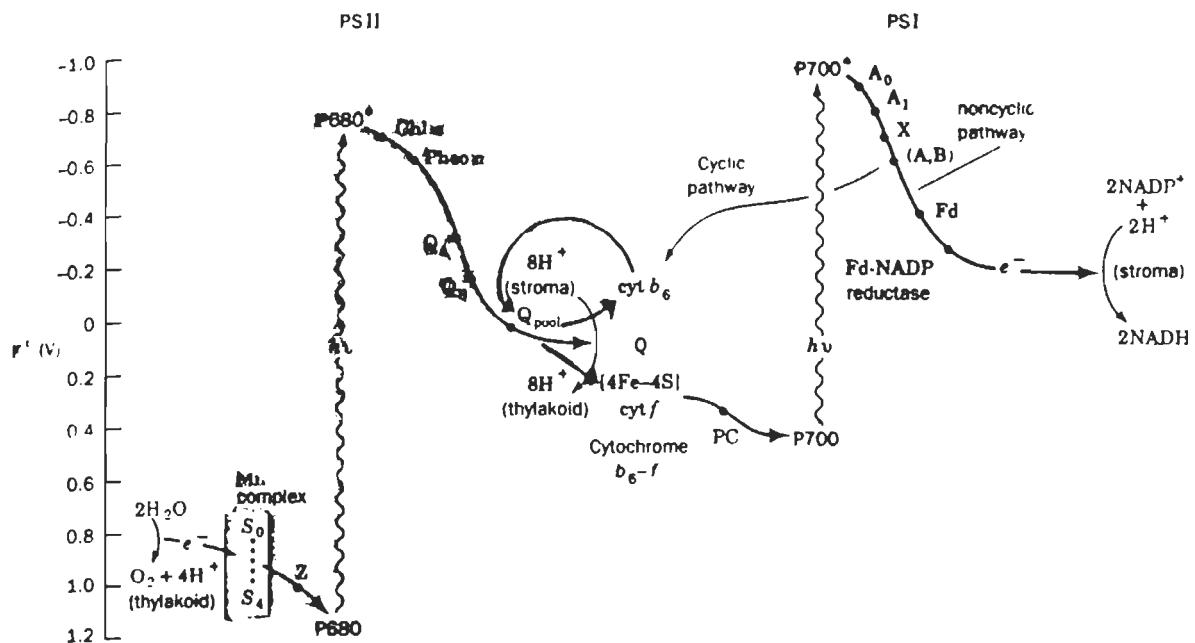


FIGURE 5. Schéma décrivant la séquence des transporteurs d'électrons dans les thylacoïdes (tiré de Voet, D. et Voet, G.J., 1990).

Les premiers mouvements de transferts d'électrons se font du P680* vers une molécule de Phéophytine (Phéo), accepteur intermédiaire du PSII (la Phéo porte alors une charge négative et le P680 une charge positive) et du P700* vers une molécule dénotée A₀ accepteur intermédiaire du PSI (P700 devient chargé positivement tandis que A₀ est maintenant négatif). Les charges positives et

négatives se séparent ainsi progressivement d'un accepteur d'électrons à un autre.

Au moment où il perd un électron, le P680 devient un oxydant puissant capable d'extraire un électron du donneur primaire (Z). Oxydé par le P680, Z acceptera alors un électron du complexe de dégagement d'oxygène (Y) qui l'aura lui-même extrait à partir de la photolyse de deux molécules d'eau, libérant quatre électrons, une molécule d'oxygène et quatre protons. Tant qu'au P700, lorsqu'il perd un électron, il en reçoit un autre d'une molécule voisine mobile, la plastocyanine (PC).

Ainsi, les deux photosystèmes sont intimement liés et fonctionnent d'une façon successive. En effet, l'électron capté par la Phéo au niveau du PSII sera transféré à un accepteur primaire d'électrons du PSII (Q_A) puis à un accepteur secondaire (Q_B). La charge négative passera ensuite à un bassin de plastoquinone (PQ) servant de navette pour le transport des électrons du PSII vers le PSI. Q_A est un accepteur d'électrons fortement lié à son site tandis que Q_B , en captant successivement deux électrons de Q_A et deux protons du stroma devient une molécule de plastoquinol (PQH_2) pouvant diffuser librement entre les complexes protéiques de la membrane des thylacoïdes pour aller vers un autre transporteur soit le cyt b6/f. Le site Q_B accepte alors une nouvelle molécule de PQ pour la protoner à son tour (Govindjee et Coleman, W., 1990; Mathis, P., 1990). C'est via le cyt b6/f que l'électron est transféré des molécules de PQH_2 vers la PC

pour ensuite arriver au P700. Lors de l'oxydation des PQH_2 par le cyt b6/f, deux protons sont libérés dans le lumen des thylacoïdes, contribuant ainsi à former un gradient transmembranaire (Hader, D.P. et Tevini, M., 1987). Le pool de PQ agit alors comme une pompe à protons (des protons du stroma sont transférés vers lumen).

Au niveau du PSI, l'électron est capté par un accepteur primaire A_0 , une Chl et un accepteur secondaire A_1 , une vitamine K_1 . L'électron ira ensuite réduire les complexes fer-soufre (FeS) Fx, Fa et Fb pour atteindre la molécule de ferrédoxine (Fd) située à la surface externe du thylacoïde. De là, l'électron peut réduire le NADP^+ grâce à l'enzyme ferrédoxine- NADP^+ réductase. Le NADP^+ réduit réagit avec un proton donnant le NADPH, produit final de la réaction lumineuse. Les électrons peuvent aussi retourner au PSI via le cyt b6/f et le bassin de PQ à l'aide du transport cyclique permettant la translocation des protons à travers la membrane du thylacoïde. En effet, le transport cyclique favorise la libération de protons dans le lumen lors de l'oxydation des PQH_2 par le cyt b6/f. Ceci a pour fonction d'augmenter la quantité d'ATP produite relativement à celle de NADPH. Le transport cyclique permet ainsi à la cellule d'ajuster la production de ces deux substances en fonction de ses besoins (Voet D. et Voet G.J., 1990).

1.3.2.3 Photophosphorylation

L'ATP est une molécule qui emmagasine l'énergie indispensable au mécanisme cellulaire (Govindjee et Coleman, W., 1990). Sa synthèse, couplée avec le transport cyclique d'électrons, est appelée photophosphorylation. Seul le transport transmembranaire de protons générés par la pompe à protons sert de source d'énergie à cette synthèse (Hader, D.P. et Tevini, M., 1987).

La synthèse de l'ATP est alors possible grâce au gradient de protons généré par le transport d'électrons et à l'enzyme ATP synthétase dans la membrane. Au niveau de la chaîne de transport d'électrons, il y a, comme mentionné à la section précédente, trois réactions contribuant à la formation d'un gradient de protons: deux protons sont libérés dans lumen lors de la photolyse de l'eau, d'autres sont largués lors de la réduction des PQ tandis que certains sont consommés au moment de la réduction du NADP⁺.

L'ATP synthétase est composé d'une structure extramembranaire (CFI) catalysant la synthèse d'ATP et d'une structure intramembranaire (CF0) permettant le passage des protons à travers la membrane. Le complexe de l'ATP synthétase convertit le potentiel énergétique du gradient de protons en phosphates riches en énergie liés, sous forme d'ATP (Fuerst, E.P. et Norman, A., 1991).

1.3.3 Phase sombre

Les composés riches en énergie chimique produits lors de la phase lumineuse, soit le NADPH et l'ATP sont utilisés pour l'incorporation du CO₂ en sucres dont la plante se nourrit. Chez les plantes supérieures et les cyanobactéries, le CO₂ est fixé lors de la phase sombre par un ensemble de réactions formant le cycle de calvin.

1.3.3.1 Cycle de calvin

Le cycle de calvin peut se résumer en deux principales étapes. Dans un premier temps, le CO₂ se dissolvant dans le chloroplaste réagit avec le ribulose-bisphosphate (RUBP) pour former un sucre à trois atomes de carbone (GAP). Cette première réaction nécessitant des molécules d'ATP et de NADPH peut se résumer ainsi: 3 RUBP + 3 CO₂ → 6 GAP avec la consommation de 9 ATP et de 6 NADPH. Lors de la deuxième étape, les atomes de 5 GAP sont utilisés pour reformer 3 RUBP permettant au cycle de recommencer. Le sixième GAP est employé pour la synthèse de carbohydrates, d'acides aminés et d'acides gras (Voet, D. et Voet, J.G., 1990).

Pour les plantes d'origine tropicale, un système concentrant le CO₂ est préliminaire à l'initiation du cycle de calvin. Ceci leur permet de minimiser les effets de la photorespiration (Voet, D. et Voet, J.G., 1990).

1.4 Le photosystème II

Une étude comme celle-ci, reposant sur le potentiel des membranes photosynthétiques à préciser la toxicité d'un effluent, nécessite une connaissance approfondie de la structure et des fonctions du PSII puisqu'il est la cible de la plupart des herbicides et des métaux.

1.4.1 Structure et fonction du photosystème II

Le PSII est divisé en quatre parties fonctionnelles. Il y a le centre réactionnel, les protéines extrinsèques et les antennes proximale et distale dont il est question à la section 1.3.2.1. L'arrangement spatial de ces composés et de leurs sous-unités est représenté à la figure 6.

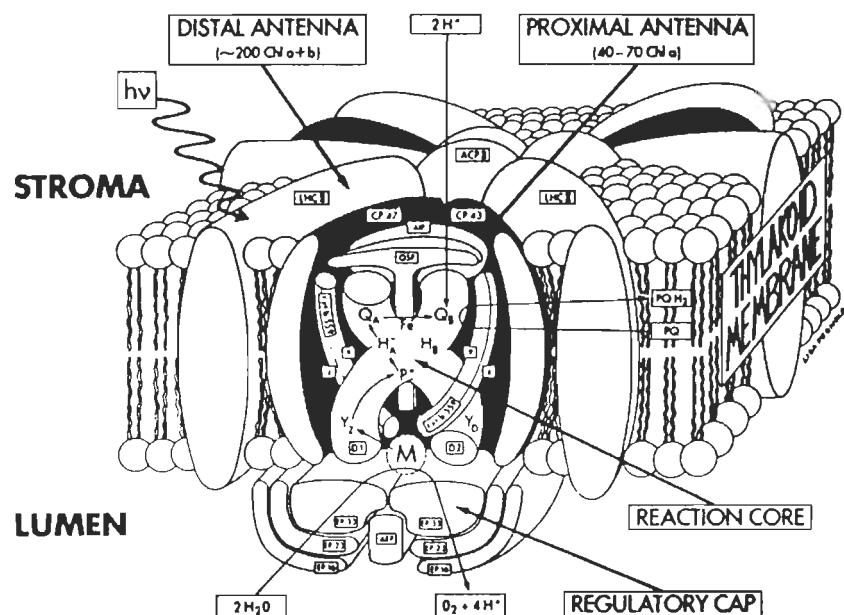


FIGURE 6. Représentation schématique de l'organisation fonctionnelle du PSII (tiré de Hansson, O. et Wydrzynski, T., 1990).

Dans le PSII, le transport d'électrons est initié au niveau du centre réactionnel composé de deux protéines hétérodimères intrinsèques appelées D₁ et D₂. Leur poids moléculaire est respectivement d'environ 32 kDa et 34 kDa (Melis, A., 1991; Hansson, O. et Wydrzynski, T., 1990; Govindjee et Coleman, W., 1990). Il est généralement reconnu que D₁ et D₂ stabilisent la liaison de quatre atomes de manganèse sur le côté luminal de la membrane thylacoïdienne.

Chacune des protéines, D₁ et D₂, renferme un résidu de tyrosine dénoté Y_Z et Y_D respectivement. Y_Z est un transporteur d'électrons entre les atomes de manganèse et le P680. Tant qu'à Y_D, il pourrait servir de donneur d'électrons, à l'obscurité, pour le complexe de dégagement d'oxygène (Hansson, O. et Wydrzynski, T., 1990). A chacune des protéines du centre réactionnel du PSII sont également liées une molécule de Chl a formant le P680 (P680 est une paire de Chl a), une Phéo et une quinone. Pour ce qui est des Phéo, seulement une des deux fonctionne soit HA⁻ située en D₁. Elle reçoit les électrons du P680 pour les diriger vers Q_A. L'autre Phéo, HB, localisée sur la protéine D₂ est non fonctionnelle. Tant qu'aux quinones, Q_A et Q_B, elles ont leur site de liaison au niveau de D₂ et D₁ respectivement (Melis, A., 1991). Le site de liaison de Q_B en D₁ forme une "poche de liaison".

Au centre réactionnel du PSII sont associées, en plus des protéines D₁ et D₂, deux molécules de Cyt b-559. Chaque molécule de Cyt b-559 comporte deux polypeptides; un de 9 kDa et un autre de 4 kDa.

Récemment, des chercheurs ont suggérés que le Cyt b-559 pourrait avoir un rôle de photoprotection ou encore, pourrait être impliqué avec le transport d'électrons cyclique au niveau du PSII pour générer des protons (Hansson, O. et Wydrzynski, T., 1990). Toutefois, cela fait encore l'objet de nombreux débats entre les scientifiques.

Enfin, le centre réactionnel du PSII est aussi doté d'autres protéines intrinsèques optimisant sa conformation. Dans la figure 6, ces protéines sont symbolisées par les lettres PIA signifiant protéines intrinsèques accessoires.

D'autre part, trois protéines extrinsèques de 33, 23 et 16 kDa sont associées au PSII. Cependant, il y a encore controverse quant au nombre de copie par PSII et quant à leur disposition. A la figure 6, les auteurs en démontrent une double copie pour chacune d'entre elles. Selon eux, la 33 kDa est fortement liée au centre réactionnel et à l'antenne proximale tandis que la 23 kDa est accrochée à la 33 kDa et la 16 kDa à celle de 23 kDa.

1.4.2 Complexe de dégagement d'oxygène

La principale fonction du PSII dans les thylacoïdes est d'oxyder des molécules d'eau pour produire de l'oxygène. Il en est ainsi puisque le complexe de dégagement d'oxygène lui est étroitement associé. Ensemble, ils forment une structure supramoléculaire dans la membrane thylacoïdienne.

1.4.2.1 Le cycle d'oxydation de l'eau

La présence de deux molécules d'eau est nécessaire pour qu'une molécule d'oxygène soit libérée. De plus, la libération d'une molécule d'oxygène nécessite la mise en place de cinq états d'oxydation intermédiaires au niveau du complexe de dégagement d'oxygène. L'ensemble de ce mécanisme est appelé: cycle d'oxydation de l'eau. Il est schématisé à la figure 7.

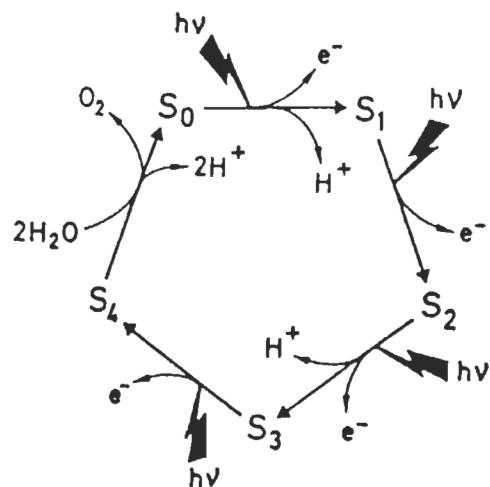


FIGURE 7. Cycle d'oxydation de l'eau (tiré de Rutherford, A. W., 1989).

Le complexe de dégagement d'oxygène peut alors exister sous cinq états d'oxydation (S) croissants soit de S_0 à S_4 . A l'obscurité, le complexe est généralement dans l'état S_1 . Chaque fois que le P680 absorbe un photon, le complexe passe à un état d'oxydation supérieur et libère un électron. Lorsque le complexe arrive à l'état S_4 , il a alors fourni quatre électrons. C'est seulement en l'état S_4 que le complexe

peut dissocier deux molécules d'eau déclenchant la libération d'une molécule d'oxygène. A ce moment, le complexe revient en l'état S_0 . Ces transitions d'états permettent aussi la libération de quatre protons. Un premier est libéré lors du passage de S_0 à S_1 . Le deuxième n'est libéré que lors de la traversée entre S_2 et S_3 tandis que les deux derniers proviennent de la transition de S_3 à S_4 puis du retour en S_0 (Govindjee et Coleman, W., 1990; Leeuwen, P. J. van et al., 1990).

Le déroulement optimal de ces réactions successives nécessite quatre atomes de manganèse et des ions Ca^{2+} et Cl^- (Ghanotakis, D. F., 1990).

1.4.2.2 Rôle des atomes de manganèse

Les atomes de manganèse sont des cofacteurs essentiels pour le dégagement d'oxygène puisqu'ils catalysent des réactions de transfert d'électrons. Effectivement, ils servent de dispositifs pour l'entreposage de charges positives produites par le centre réactionnel de PSII, avant l'oxydation de quatre électrons à partir de deux molécules d'eau. L'accumulation de quatre charges positives est nécessaire pour produire une molécule d'oxygène. Ainsi, les Mn oxydés sont réduits par les quatre électrons dérivant de l'oxydation de deux molécules d'eau (Rutherford, A.W., 1989; Yamamoto, Y., 1989).

Les atomes de manganèse présentent plusieurs degrés d'oxydation changeant selon les divers états (Govindjee et Coleman, W., 1990).

Plusieurs suggestions sont émises à ce propos. Par exemple, une étude de H.T. Witt (1988) suggère que les atomes de manganèse soient possiblement caractérisés comme suit: $S_0(Mn^{2+}, Mn^{3+})$, $S_1(2Mn^{3+})$, $S_2(Mn^{3+}, Mn^{4+})$, $S_3(2Mn^{4+})$.

1.4.2.3 Rôle du calcium et du chlore

Dans le cycle d'oxydation de l'eau, les ions Cl^- favorisent la libération des protons à partir de l'eau. Deux hypothèses tentent d'expliquer la façon dont ces ions remplissent ce rôle. D'une part, soit que les ions Cl^- , localisés dans une poche créée par les protéines extrinsèques, augmentent directement l'efficacité des réactions d'oxydation de l'eau en facilitant la déprotonation des molécules d'eau. D'autre part, soit qu'ils stabilisent les ions Mn les plus chargés en étant liés directement au groupe de Mn ou en étant situés tout près de ceux-ci, facilitant ainsi le transfert des électrons entre les atomes de manganèse. Les ions Cl^- agissent alors comme une charge neutralisante et sont relâchés seulement lorsqu'il y a libération de protons (Ghanotakis, D.F., 1990; Govindjee et Coleman, W., 1990; Hansson, O. et Wydrzynski, T., 1990). Tant qu'aux ions Ca^{2+} , un rôle structurel lors de l'oxydation de l'eau leur est généralement accordé.

1.4.2.4 Rôle des protéines extrinsèques

Les protéines de 33, 23 et 16 kDa jouent un rôle important au niveau du complexe de dégagement d'oxygène. Plus spécifiquement, la 33 kDa améliore la stabilité des atomes de manganèse au niveau du PSII. Tant qu'aux protéines de 23 et 16 kDa, elles procurent des conditions ioniques appropriées pour le dégagement d'oxygène en concentrant les ions Ca^{2+} et Cl^- près du site catalytique (Melis, A., 1990; Hansson, O., Wydrzynski, T., 1990 et Yamamoto, A., 1989). Ainsi, il se pourrait que les protéines extrinsèques aient comme rôle de créer, au complexe de dégagement d'oxygène, une poche à l'intérieur de laquelle les ions Cl^- sont pris au piège (Lindberg, K. et al., 1990).

1.5 Utilisation des membranes photosynthétiques comme biocapteur de phytotoxicité

Plusieurs méthodes expérimentales permettent d'estimer l'intégrité du transport d'électrons dans les membranes thylacoïdiennes. Entre autres, l'électrode de type Clark (électrode à oxygène) traduit leur réponse biochimique en un signal électrique. Ce signal électrique est proportionnel à l'activité photosynthétique des thylacoïdes et, par conséquent, à l'intégrité du transport d'électrons. Toutes perturbations au niveau de ce signal électrique peuvent être un indice de la présence de polluants puisque la plupart des herbicides et des métaux inhibent la photosynthèse au niveau du transport d'électrons. Ainsi, les

membranes photosynthétiques peuvent être qualifiées de biosenseur grâce à l'effet inhibiteur des polluants sur le transport d'électrons, principalement au niveau du PSII.

1.5.1 Inhibition du photosystème II par les herbicides et les métaux

1.5.1.1 Les herbicides

La majorité des herbicides commerciaux sont des inhibiteurs de la photosynthèse. Ces herbicides sont généralement divisés en trois groupes principaux: les dérivés triazines, les dérivés urées et les dérivés phénols.

Les dérivés triazines et urées, comme par exemple, l'atrazine et le diuron respectivement, sont des inhibiteurs du transport d'électrons, sur le côté réducteur du PSII, entre Q_A et Q_B . Précisément, ils se lient dans la poche de liaison du polypeptide D₁ du PSII en des sites spécifiques mais se chevauchant. Ainsi, leur site d'inhibition est le même que le site de liaison de Q_B . En fait, ces herbicides se placent à l'intérieur de la poche comme la PQ (Trebst, A., 1988). La PQ y est liée par des liens hydrogènes établis entre ses deux groupements carbonyls et la protéine (un groupement carbonyl est lié avec la sérine 264 tandis que l'autre est lié à l'histidine 215) figure 8A (Fuerst, E.P. et Norman, M.A., 1991). Leur mode d'inhibition dépend alors d'une

compétition avec Q_B pour le site de liaison. Si l'herbicide se lie sur le site de liaison de Q_B en le déplaçant, ce dernier ne sera plus disponible pour la PQ et le transport d'électrons sera alors interrompu (Hader, D.P. et Tevini, M., 1987).

Comme la PQ, les dérivés triazines et urées interagissent d'une part avec la sérine 264 (Tietjen, K.G. et al., 1991). D'autre part, ils se lient avec la phénylalanine 265 (Figure 8B). Ce mode de liaison constitue une interaction spécifique entre ces herbicides et différents acides aminés de la poche de liaison (Trebst, A., 1988).

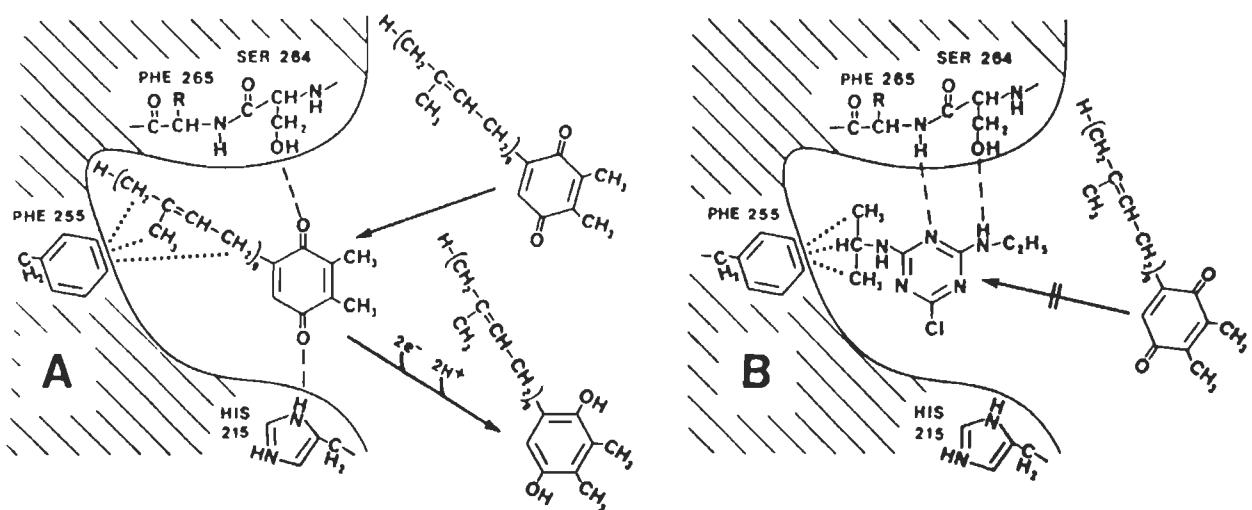


Figure 8. Représentation schématique de la poche de liaison de la plastoquinone et des herbicides sur la protéine D1. A) Liaison de la PQ B) Liaison de l'atrazine (Schéma tiré de Fuerst, E.P. et Norman, A., 1991).

Le point commun entre ces deux familles de pesticides est la présence d'un groupement imide. Ce groupement est l'élément

chimique essentiel rendant possible l'inhibition et la liaison à la membrane (Trebst, A., 1980).

Tant qu'aux dérivés phénols, comme le bromoxynil, leur site et leur mode d'inhibition sont, pour la majorité, similaire aux dérivés triazines et urées. Toutefois, il y a des différences physicochimiques au point de vue du mode d'interaction avec les acides aminés de la poche de liaison en D₁ (Tietjen, K.G. et al., 1991; Draber, W. et al., 1989). En fait, la liaison des dérivés phénols est probablement due à des interactions avec l'histidine 215 plutôt qu'avec la sérine 264 (Fuerst, E.P. et Norman, M.A., 1991; Trebst, A., 1988).

La liaison des herbicides au niveau de la poche de liaison est possiblement accompagnée d'un changement conformationnel chez la protéine D₁ (Trebst, A., 1988). Notons que la réaction de Hill nécessite des ions bicarbonates. Mais, la présence d'herbicides diminue l'affinité des ions bicarbonates pour la membrane puisque leur site d'action est localisé entre Q_A et Q_B, soit près du site d'inhibition des pesticides. Ainsi, la liaison des pesticides et l'absence de bicarbonates peut causer un changement conformationnel chez D₁ causant l'inhibition du transport d'électrons (Rensen, J.J.S. van, 1989).

Enfin, il existe un autre site d'inhibition au niveau du PSII par les herbicides. Il est localisé sur le côté oxydé du PSII, au niveau de Z.

L'effet inhibiteur est aussi interprété en terme de modification conformationnel de la portion lumineuse du PSII (Purcell, M. et al., 1990; Carpentier, R. et al., 1985).

Pour ce qui est de l'interaction des herbicides avec le PSI, les seuls ayant un effet inhibiteur sont le paraquat et le diquat, membre de la famille des bipyridinium (Fuerst, E.P. et Norman, M.A., 1991). De nos jours, ces herbicides sont peu utilisés.

1.5.1.2 Les métaux

Les métaux peuvent être divisés en deux catégories soit les métaux essentiels et non essentiels. Les métaux essentiels comme le cuivre, le zinc, le fer, etc. sont requis, en concentrations traces, pour différents processus métaboliques. Toutefois, à de fortes concentrations, ils deviennent toxiques. Tant qu'au métaux non essentiels comme le mercure, le plomb, le cadmium, etc., ils sont toxiques même à de très faibles concentrations (Rai, L.C. et al., 1991). A des concentrations toxiques, les métaux exercent plusieurs effets inhibiteurs sur la photosynthèse à plusieurs niveaux structurels et métaboliques.

Pour plusieurs d'entre eux, comme pour le zinc, le cadmium et le mercure par exemple, le principal point d'attaque est le complexe de dégagement d'oxygène en compétitionnant avec les atomes de manganèse pour le même site de liaison sur la membrane (Clijsters, H.

et Assche, F. van, 1985). Toutefois, leurs radicaux ioniques doivent être similaires à ceux des ions Mn^{2+} à cause de la fine structure du complexe de dégagement d'oxygène. En effet, pour remplacer les Mn^{2+} , la structure des radicaux ioniques des métaux ne doit pas être plus grosse que celle de ces derniers (Teige, M., Huchzermeyer, B. et Schultz, G., 1990).

Certains métaux, comme le cuivre et le mercure inhibent à la fois les deux photosystèmes. Leur mécanisme d'inhibition provient généralement d'une interaction avec les groupements SH fonctionnels (Clijsters, H. et Assche, F.van, 1985).

L'ATP synthétase est aussi un point d'action important pour la plupart des métaux. L'interaction des métaux à ce niveau entraîne une inhibition de la synthèse d'ATP lors d'exposition de courte durée, à de faibles concentrations (Teige, M., Huchzermeyer, B. et Schultz, G., 1990).

Etant donné la diversité des effets inhibiteurs des métaux, il devient pertinent d'étudier, plus en détail, l'effet toxique d'au moins un métal appartenant à chacune des catégories. Le cuivre et le mercure ont été choisis.

Le cuivre, un nutriment essentiel chez les plantes, est requis pour maintenir l'efficacité photosynthétique. En effet, il influence plusieurs processus physiologiques chez les plantes. Entre autres, il est directement impliqué dans la régulation du transport d'électrons photosynthétique au niveau du PSI puisqu'il est une composante de la PC. De plus, il est un élément constituant du PSII dont la plupart sont localisés au niveau CCL-II (Droppa, M. et Horvath, G., 1990).

D'un autre côté, lorsque présent à de fortes concentrations, le cuivre devient un inhibiteur de l'activité photosynthétique. Au PSI, son site d'inhibition est au niveau de la Fd. Par contre, au niveau du PSII, le cuivre a plusieurs sites d'inhibition. Parmi ceux-ci, il y aurait le complexe de dégagement d'oxygène, le centre réactionnel du PSII et Q_B , non pas en bloquant le transport d'électrons entre Q_A et Q_B , mais en interagissant avec les ions Fe^{2+} aux alentours de Q_A et Q_B (Droppa, M. et Horvath, G., 1990). En effet, les chercheurs sont d'accord pour dire qu'il entraîne des effets multiples au niveau du PSII. Entre autres, une fois dans le cytosol, il peut réagir avec les groupements SH des enzymes et les thiols libres bouleversant ainsi les sites enzymatiques et la division cellulaire (Stauber, J.L. et Florence, T.M., 1987).

Le mercure, un métal lourd non essentiel, est toxique dans ces formes métallique, ionique et organique. Depuis longtemps, il est reconnu comme un danger environnemental à cause de son utilisation universelle dans les appareils électriques, la production de chlore, la soude caustique, etc. (Rai, L.C. et al., 1991).

La toxicité du mercure se manifeste, chez les plantes, par l'inhibition du transport d'électrons. Au niveau du PSI, le mercure remplace le cuivre dans la PC (le cuivre est un élément constituant de la PC, tel que mentionné plus haut) nuisant ainsi au transport d'électrons entre les deux photosystèmes. Au niveau du PSII, le mercure inhibe le dégagement d'oxygène en compétitionnant avec les atomes de manganèse. De plus, il est capable de dégrader les pigments photosynthétiques, principalement la Chl b (Clijsters, H. et Assche, F.V., 1985; Rai, L.C. et al., 1991).

1.5.2 Instabilité des membranes photosynthétiques isolées

Les membranes photosynthétiques isolées perdent très vite leur activité photosynthétique en fonction du temps, de la température, du pH et de l'illumination (Thomasset et al., 1984). Leur utilisation en tant que biosenseur pour la réalisation de bioessais sur le terrain est alors compromise, sauf si on les conserve à -80 °C.

Notons que les extraits de thylacoïdes sont instables même s'ils sont conservés à 0 °C et à la noirceur. Ce vieillissement est causé par le relâchement de particules de lipoprotéines et d'acides gras libres de la membrane sous l'action des enzymes lipolytiques (Papageorgiou, G.C., 1979). Ainsi, sans de très basses températures (-80 °C), il est impossible de garder des réserves d'extraits de thylacoïdes pour plusieurs jours d'échantillonnage. La faible stabilité des fonctions biologiques des membranes photosynthétiques empêche leur

utilisation en tant que biocapteur de phytotoxicité, dans des conditions éventuelles d'utilisation sur le terrain.

1.6 Modèle conceptuel

Malgré le fait que les membranes thylacoïdiennes aient le potentiel d'être de bons biosenseurs de phytotoxicité, tel qu'expliqué à la section 1.5, il n'en demeure pas moins que la faible stabilité de leurs fonctions biologiques soit un facteur contraignant dans une perspective biotechnologique et commercialisable (Carpentier, R. et Lemieux, S., 1987). Leur immobilisation dans une matrice appropriée est alors nécessaire puisque les membranes immobilisées offrent une supériorité technologique en terme de résistance à la dénaturation et de facilité pour les manipulations industrielles (Papageorgiou, G.C., 1983).

L'immobilisation dans une matrice artificielle procure un microenvironnement dont les propriétés ioniques et chimiques peuvent être différentes du milieu dans lequel les membranes natives baignent. La stabilisation de l'activité photosynthétique, suite à l'immobilisation dans une matrice artificielle, est probablement due à une augmentation des concentrations de quelques ions. En effet, plusieurs ions tels le Na^+ et le Mg^{2+} sont capables de stabiliser l'appareil photosynthétique (Bailliez, C. et al., 1986). Ainsi, le matériel

biologique doit être resuspendu dans un milieu fortement concentré en ions avant l'immobilisation pour obtenir une meilleure stabilité.

Il existe plusieurs méthodes d'immobilisation pour les membranes photosynthétiques: certaines sont de nature physique et d'autres, chimique (Papageorgiou, G.C., 1987; Papageorgiou, G.C. et Lagoyanni, T., 1986; Gronow et al., 1985) (tableau 1).

Tableau 1

Méthodes d'immobilisation

Nature	Méthode	Description
Physique	Microencapsulation	Le matériel biologique est entouré d'une membrane synthétique scellée dont la perméabilité est limitée
Physique	Inclusion dans un gel	Le matériel biologique est interrelié avec un gel hydrophilique tel du gel de silice, de l'alginate de calcium ou du polyacrylamide.
Physique	Adsorption	Le matériel biologique est attaché à un support

Tableau 1 (suite)

Nature	Méthode	Description
		solide sous l'influence de forces ioniques. Comme support, il y a de la résine synthétique, du verre, etc.
Chimique	Attachement covalent	Les groupements chimiques du matériel biologique sont attachés chimiquement à des supports activés comme des polymères synthétiques.
Chimique	Matrice co-liée	Un réseau de liaisons covalentes des molécules du matériel biologique est établie dans une superstructure. Le glutaraldéhyde est un exemple d'agent co-liant.

Le support immobilisant doit présenter les qualificatifs suivants: non toxicité, forte capacité de rétention, porosité et possibilité d'être préparé selon des grosses et des formes spécifiques (Rao, K.K. et Hall,

D.O., 1984). De plus, la méthode d'immobilisation utilisée doit être simple et économique, ne présenter aucun risque pour le manipulateur et assurer au matériel biologique longue vie.

Souvent, les techniques physiques sont jugées supérieures parce qu'elles ne préconisent pas l'emploi de réactifs qui pourraient modifier ou endommager les organelles (Rao, K.K. et Hall, D.O., 1984). Bien que les méthodes physiques d'immobilisation ont l'avantage d'offrir une meilleure conservation du métabolisme et peuvent permettre la prolifération des cellules intactes, elles ont un grand nombre de désavantages. Le plus important est sans doute la faiblesse des forces attractives entre le matériel biologique et le support immobilisant. Les chances que les cellules se détachent du support sont ainsi accrues. De plus, il y a, entre autres, la biodégradation des gels, l'incompatibilité de l'alginate de calcium avec les ions phosphates et la faible perméabilité des membranes synthétiques (Papageorgiou, G.C. et Lagoyanni, T., 1986; Affolter, D. et Hall, D.O., 1986; Papageorgiou, G.C., 1987).

La méthode d'immobilisation offrant la meilleure stabilité, comparativement aux autres, est la co-liaison du matériel biologique à l'intérieur d'une matrice formée d'albumine de sérum bovin (BSA) et de glutaraldéhyde (Carpentier, R. et Lemieux, S., 1987). Cette matrice, initialement décrite par Broun, G. et al.(1973), offre des propriétés intéressantes: perméabilité aux accepteurs d'électrons, résistance à la

dégradation microbiologique, diffusion de la lumière et grande stabilisation de l'activité photosynthétique (Cocquempot, M.F., Thomas, D., 1984). Les concentrations optimales de BSA, glutaraldéhyde, Chl et tampon ont été mises au point par M.F. Cocquempot et al. (1981).

La plus grande stabilité des membranes immobilisées dans une telle matrice provient principalement du fait qu'elles ne peuvent se déplacer latéralement afin de prendre de l'expansion puisque le glutaraldéhyde établit des ponts de liaisons principalement avec les NH₂ libres des protéines. Le glutaraldéhyde réagit aussi avec les groupements SH et les anneaux aromatiques des acides aminés, des peptides et des protéines (Papageorgiou, G.C., 1979; Isaakidou, J. et Papageorgiou, G.C., 1979). Le glutaraldéhyde est l'agent chimique le plus utilisé non seulement parce qu'il est le meilleur agent co-liant mais aussi parce qu'il permet la survie d'une bonne partie de l'activité enzymatique originale (Papageorgiou, G.C., 1979). De plus, le glutaraldéhyde et le BSA permettent la formation d'une matrice poreuse pouvant retenir un volume substantiel d'eau et d'électrolytes. Cette porosité permet la diffusion des électrolytes, des accepteurs d'électrons et des inhibiteurs se retrouvant dans le milieu vers le matériel biologique (Carpentier, R. et al., 1988). Enfin, l'immobilisation dans une matrice de BSA-glutaraldéhyde à l'avantage de protéger les thylacoïdes contre la photoinhibition et surtout, contre le photoblanchiment (Carpentier, R. et al, 1987). La photoinhibition est une diminution de l'activité photosynthétique due à une forte

illumination. La matrice d'immobilisation, en induisant une forte dispersion de la lumière, protège les membranes photosynthétiques contre une désactivation rapide des pigments chlorophylliens comme c'est le cas chez les membranes natives (non immobilisées) (Jeanfils, J. et al., 1982). Tant qu'au photoblanchiment, c'est une réaction oxydative nécessitant de l'oxygène en plus de la lumière. Cette protection contre le photoblanchiment est probablement due au fait que la matrice impose une barrière de diffusion à l'oxygène (Carpentier R. et al., 1987).

Toutefois, l'immobilisation des membranes thylacoïdiennes par le glutaraldéhyde entraîne une perte relativement importante de l'activité photosynthétique (Hardt, H. et Kok, B., 1976). En effet, le glutaraldéhyde est reconnu pour exercer à la fois une inhibition générale et spécifique sur le transport d'électrons (Papageorgiou, G.C., 1983). Notons que cette perte de l'activité photosynthétique ne provient pas d'une action du glutaraldéhyde sur les enzymes du complexe de dégagement d'oxygène ni sur la photochimie primaire du PSII et du PSI (Isaakidou J. et Papageorgiou, G.C., 1979). L'inhibition général de la photosynthèse est attribuée au fait que le glutaraldéhyde modifie l'état des complexes et la distribution de l'énergie (Jeanfils, J. et al., 1986). En fait, vu que le glutaraldéhyde agit au niveau des NH₂ libres des protéines et que la plupart des transporteurs d'électrons sont des protéines, il peut y avoir une inhibition suite à l'interaction possible entre le glutaraldéhyde et les transporteurs. Cette interaction

provoque une rotation ou un réarrangement intramoléculaire des transporteurs (Papageorgiou, G.C., 1979). Plus spécifiquement, c'est au niveau de la PC, un transporteur d'électrons protéinique situé entre le cyt f et le PSI que l'effet inhibiteur du glutaraldéhyde se fait davantage ressentir (Hardt, H. et Kok, B., 1977). Ainsi, le glutaraldéhyde inhibe le transport d'électrons entre le PSII et le PSI.

Mais heureusement, le glutaraldéhyde en présence du BSA (une protéine inactive) peut réagir autant avec ce dernier qu'avec les NH₂ libres des protéines des thylacoïdes. Il y a compétition entre les protéines actives et inactives pour l'agent co-liant. Cette compétition diminue le nombre de groupements aminés de chaque molécule impliquée dans la co-liaison (Broun, G. et al., 1973). A ce titre, le BSA protège les organites photosynthétiques contre les effets inhibiteurs des aldéhydes (Thomasset, B. et al., 1984).

De plus, le glutaraldéhyde affecte la phosphorylation en interagissant avec les CCL. Ceci entraîne alors un changement au niveau de la distribution de l'énergie à travers l'appareil photosynthétique résultant en une diminution de l'activité (Jeanfils, J. et al., 1986). La perte d'activité suite à l'immobilisation peut aussi être due à la barrière de diffusion que la matrice peut représenter pour les accepteurs d'électrons. Mais, de façon générale, les thylacoïdes immobilisés peuvent conserver une forte activité photosynthétique si

de faibles concentrations de glutaraldéhyde sont utilisées. Evidemment, l'utilisation de plus fortes concentrations de glutaraldéhyde procurerait une plus grande stabilité mais, en terme de productivité (production totale d'oxygène) la concentration optimale est de 0,33% (v/v) (Cocquempot, M.F. et al., 1981). Cette concentration représente un compromis entre l'activité photosynthétique et la stabilité.

Après l'immobilisation, l'activité photosynthétique du matériel peut être réduite jusqu'à 60%. Cependant, les thylacoïdes sont encore fonctionnels et leur activité est même moins affectée par de longues périodes d'entreposage, par des conditions d'illumination et par des variations de pH ou de température (Bonenfant, D, et Carpentier, R., 1990).

Ainsi, il est admis que le glutaraldéhyde est le meilleur agent stabilisateur de la photoactivité des membranes thylacoïdiennes. Cette grande stabilité induite par l'immobilisation dans une matrice de BSA-glutaraldéhyde permet l'utilisation des membranes photosynthétiques sur le terrain, dans une perspective biotechnologique et évite des procédures répétées d'extraction.

CHAPITRE 2

MATERIELS ET METHODES

2.1 Préparation des membranes thylacoïdiennes

Les membranes thylacoïdiennes sont isolées à partir de feuilles d'épinard achetées dans un supermarché local, le jour de l'extraction. La méthode consiste à peser 100 g de feuilles dont les nervures centrales ont été retirées. Les morceaux d'épinard doivent être rincés à l'eau distillée froide puis épongés avant d'être utilisés.

Les segments de feuilles sont coupés grossièrement puis mélangés à 300 mL de tampon de broyage à 0 °C. Ce premier tampon résulte du mélange suivant: sorbitol 330 mM, MgCl₂ 5 mM et Tes-NaOH 20 mM (pH 7.5). Pour une homogénéisation complète, les feuilles d'épinard sont broyées à l'aide d'un blender Waring pendant 30 s à la vitesse maximale.

Le mélange est filtré à travers 10 épaisseurs de coton fromage pour retirer les débris de feuilles. Le filtrat qui comprend, entre autres, les chloroplastes est ensuite centrifugé à 2000 g pendant une min pour les

isoler. Les chloroplastes sont alors remis en suspension dans un deuxième tampon obtenu à partir d'une dilution 1/20 du tampon de broyage. Ce milieu hypotonique provoque l'altération de l'enveloppe des chloroplastes par un choc osmotique et permet ainsi la libération du stroma et des fragments de thylacoïdes. La récupération de ces thylacoïdes fragmentés est possible grâce à une centrifugation d'une min à 4000 g. Le culot obtenu est, cette fois, resuspendu dans un volume minimal de tampon constitué de: sorbitol 330 mM, Tes-NaOH 50 mM (pH 7.5), MgCl₂ 5 mM, NaCl 1 mM et NH₄Cl 1 mM. La solution obtenue est enfin homogénéisée dans un tube homogénéisateur Weaton et sa concentration en Chl est mesurée d'après la méthode de Arnon (1949).

Toutes ces manipulations sont effectuées à 4 °C et sous une lumière verte. Une partie de l'extrait est conservée dans de l'azote liquide pour les mesures avec des membranes natives tandis que l'autre partie est utilisée immédiatement pour l'immobilisation.

2.2 Immobilisation des thylacoïdes

Les membranes thylacoïdiennes sont immobilisées selon la méthode décrite par Cocquempot, M.F. et al. (1981) (méthode standard). La méthode consiste à mélanger 1.65 mL de tampon phosphate 50 mM (pH 7.1) avec 1.25 mL de BSA 20% et 1.0 mL d'une solution de glutaraldéhyde 1.5%. On laisse reposer ce mélange pendant

2 min avant d'y ajouter 0.6 mL de thylacoïdes concentrés à 3.3 mg Chl/mL (figure 9). La solution est alors divisée en échantillons de 75 μ L (volume choisi afin d'obtenir la concentration de 11 μ g Chl/mL nécessaire pour les mesures de dégagement d'oxygène) (figure 9). Les échantillons sont congelés à -20 °C pendant 2 h. Le matériel immobilisé est dégelé à l'obscurité à 4 °C au moins 2 h avant d'être utilisé.

IMMOBILISATION

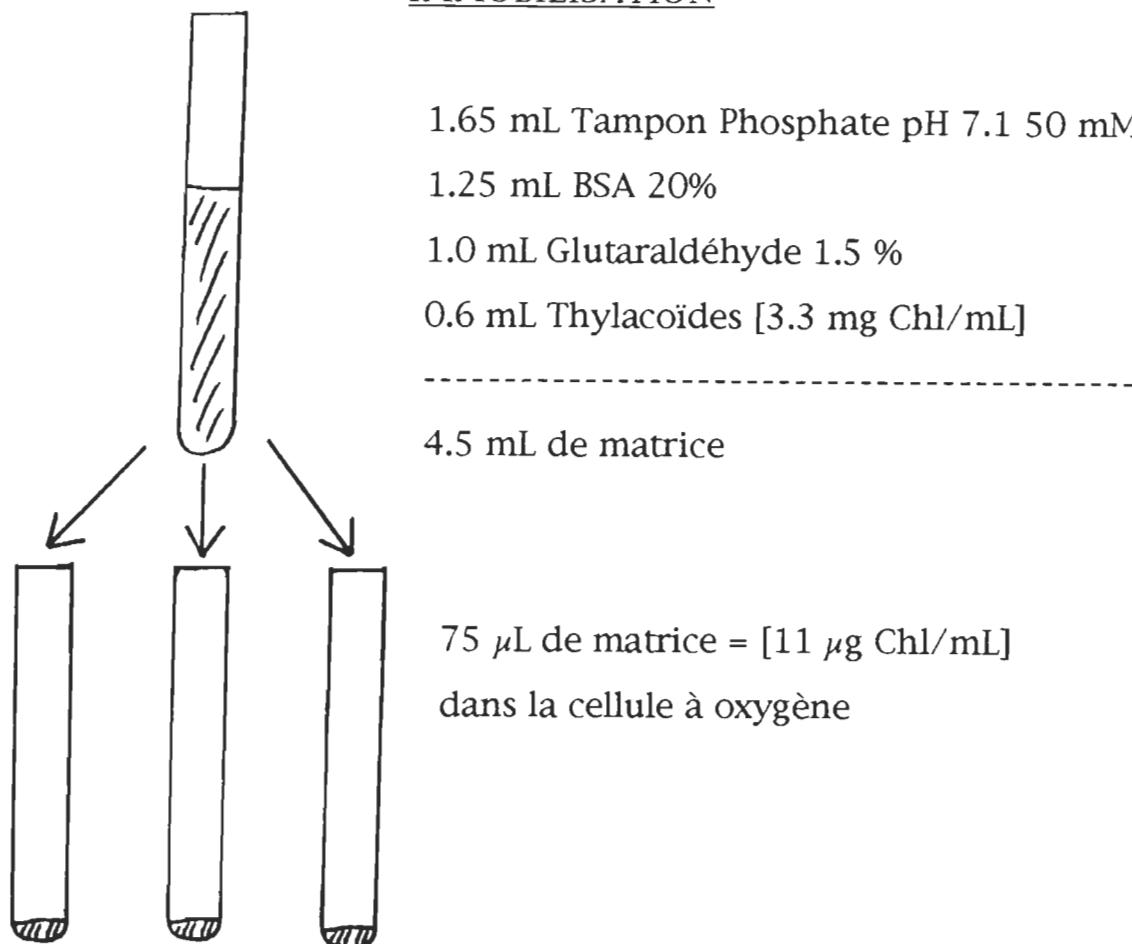


FIGURE 9. Représentation schématique de la méthode d'immobilisation.

2.2.1 Variation de la concentration de Chl lors de l'immobilisation

Pour obtenir d'autres concentrations de Chl dans la matrice définie par Cocquempot, M.F. et al. (1981) (méthode standard), on doit changer le volume de tampon phosphate 50 mM (pH 7.1) en fonction de celui des thylacoïdes (figure 9) sans toutefois modifier le volume total de la matrice soit, 4.5 mL. Ainsi, pour des concentrations de Chl supérieures à 11 μ g/mL, on doit diminuer le volume de tampon et augmenter celui des thylacoïdes et, inversement, si l'on désire des concentrations inférieures à 11 μ g/mL. Tant qu'au volume de l'échantillon, il doit demeurer fixe à 75 μ L

Dans ces conditions, il faut prendre note que le rapport optimal de Chl/BSA (1.25 mL de BSA pour 0.6 mL de thylacoïdes concentrés à 3.3 mg/mL) établit par Cocquempot, M.F. et al. (1981) est alors changé. Ceci implique que pour des concentrations supérieures à 11 μ g/mL, le nombre de molécules de BSA protégeant les molécules de Chl contre l'effet inhibiteur du glutaraldéhyde devient inférieur. Par contre, pour des concentrations inférieures à 11 μ g/mL, les molécules de Chl sont davantage protégées par le BSA (voir section 1.6).

Une autre façon de modifier la concentration de Chl lors de l'immobilisation a consisté simplement à varier le volume de l'échantillon (75 μ L). Ainsi, les échantillons avaient un volume supérieur ou inférieur à 75 μ L selon la concentration recherchée. Cette dernière procédure offre l'avantage de garder constant le rapport de

Chl/BSA soit 0.6 mL de thylacoïdes concentrés à 3.3 mg/mL pour 1.25 mL de BSA 20%.

2.3 Dégagement d'oxygène

2.3.1 Description de l'appareil

Par la photosynthèse, les plantes absorbent l'énergie solaire et décomposent des molécules d'eau en oxygène, en protons et en électrons. L'oxygène produit lors de la photolyse de l'eau est alors libéré suite au transport d'électrons généré (section 1.3.2.2). Ainsi, on peut, en laboratoire, estimer le taux de transport d'électrons dans les membranes photosynthétiques en mesurant le taux de dégagement d'oxygène d'un échantillon soumis à un éclairage. Pour ce faire, on utilise une électrode de Clark. Ce type d'électrode est constitué d'une anode d'argent et d'une cathode de platine jointes par un pont de KCL. Une membrane perméable à l'oxygène les séparent du milieu de réaction. Lorsqu'un voltage entre 600 et 700 mV est appliqué sur l'électrode, la cathode de platine devient négative et l'anode d'argent positive. L'oxygène libéré, de l'échantillon éclairé, diffuse à travers la membrane pour être réduit, à la surface de l'électrode de platine, en peroxyde d'hydrogène. L'électron ainsi perdu tend à dissiper la différence de potentiel entre l'anode et la cathode. L'anode d'argent est alors oxydée et du chlorure d'argent est libéré (Delieu et Walker, 1972) (figure 10).

Le courant électrique qui découle de la différence de potentiel entre l'anode et la cathode lorsque les électrons sont donnés à l'oxygène, est acheminé à un amplificateur YSI modèle 53 relié à un enregistreur de type Linear modèle 555. L'échantillon est éclairé sous une lumière blanche d'une intensité lumineuse de 6000 W/m^2 à l'aide d'un illuminateur Fiber-Lite modèle 170 D. L'échantillon étant en constante agitation, le courant est alors directement proportionnel à la quantité d'oxygène libéré au niveau des thylacoïdes et, consommé au niveau de la cathode de platine. La température dans la cellule à dégagement d'oxygène est maintenue à 22°C grâce à un bain thermostaté Cole Parmer, modèle 1268-14. La cellule à dégagement d'oxygène étant entourée d'eau maintenue à 22°C , il n'est pas nécessaire d'utiliser un filtre de chaleur lorsque l'échantillon est éclairé puisque l'eau joue ce rôle de filtre.

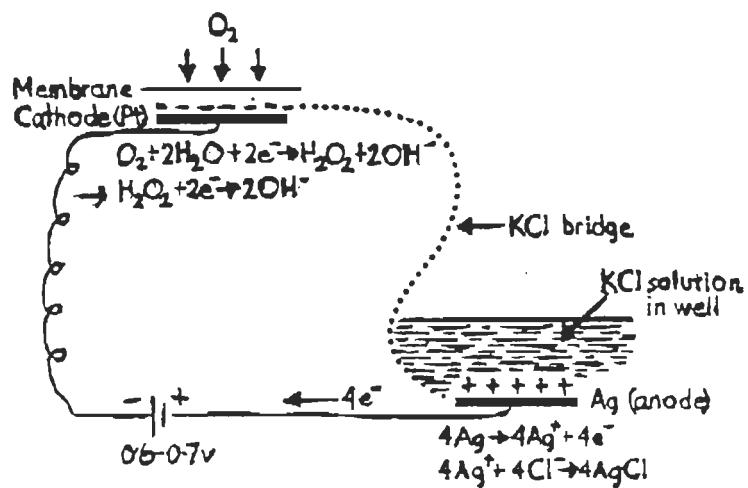


FIGURE 10. Représentation schématique des réactions de l'électrode de type Clark.

2.3.2 Calibration de l'appareil

Le système est calibré avec de l'eau distillée à température de la pièce. Le zéro de l'appareil est ajusté avec 3 mL d'eau distillée ajoutée dans la cellule à dégagement d'oxygène et barbottée à l'azote gazeux pendant 2-3 min afin d'éliminer l'oxygène présent dans le milieu. A l'opposé, le 100% est ajusté à l'aide de 3 mL d'eau distillée légèrement agitée, placée dans la cellule.

2.3.3 Préparation des échantillons

Pour les mesures de dégagement d'oxygène, les membranes immobilisées sont rincées à l'eau distillée pour enlever la couche de protéines insolubles formée lors du processus de congélation-décongélation. Par la suite, elles sont broyées dans un mortier pour les mélanger à 3 mL de tampon. Le tampon utilisé correspond au dernier tampon de resuspension lors de l'extraction. Un nouveau tampon est refait chaque jour. Tant qu'aux membranes natives, elles sont directement mélangées aux 3 mL de tampon dans la cellule à dégagement d'oxygène. Notons que dans la cellule, l'échantillon doit toujours avoir un volume égal à 3 mL et être bien agité.

2.3.4 Prise des mesures

Les mesures sont toujours prises à la lumière verte. La solution obtenue suite au mélange du tampon et des thylacoïdes est déposée dans la cellule à dégagement d'oxygène. Elle est alors barbotée à l'azote, pendant 2-3 min, pour enlever l'oxygène. Juste avant de placer l'électrode, du 2,5-dichloro-p-benzoquinone (DCBQ), un accepteur artificiel d'électrons, est ajouté. Sa concentration varie selon la concentration de Chl présente. Une fois l'électrode en place, la solution est agitée et éclairée. Chacune des mesures est répétée de 2 à 3 fois.

Il est nécessaire d'ajouter un accepteur artificiel d'électrons pour mesurer la quantité d'oxygène dégagée au niveau du complexe de dégagement d'oxygène. En absence d'accepteur artificiel d'électrons, la quantité d'oxygène mesurée est inférieure à la quantité réellement produite. En effet, au cours de l'extraction des thylacoïdes, les composés solubles comme la Fd, la ferrédoxine NADP⁺ réductase (FNR) et le NADP sont solubilisés. C'est alors l'oxygène, libéré au niveau du PSII, qui accepte les électrons, à la place du NADP⁺ (section 1.3.2.2). Ainsi, en absence d'accepteur d'électrons, il y a consommation de l'oxygène dégagée.

Etant donné que le glutaraldéhyde inhibe le transport d'électrons entre le PSII et le PSI (section 1.6), il importe d'utiliser un accepteur d'électrons spécifique au PSII plutôt qu'au PSI. L'accepteur artificiel d'électrons utilisé est le DCBQ parce qu'il est très spécifique au PSII (Izawa, S., 1980).

2.3.5 Calcul de la quantité d'oxygène dégagée

La quantité d'oxygène dégagée est calculée selon l'équation suivante:

[pente (nombre d'unité en cm/min)/100] X solubilité de l'O₂ (μMol O₂/cm/mL) selon la température X 60 min/h X [1000/concentration en Chl utilisée (μg/mL)] = nombre de μMol O₂/ mg Chl.h

A 22 °C la solubilité de l'oxygène est de 0.262 μMol/mL (voir tableau 2).

2.3.6 Variation de la température

Lors de ces manipulations, la température autour de la cellule à dégagement d'oxygène est variée à l'aide du bain thermostaté. Une fois que la température désirée est atteinte, les échantillons sont placés dans la cellule et incubés 10 min avant que les mesures de dégagement d'oxygène soient prises à la température d'incubation.

Pour les calculs de la quantité d'oxygène dégagée, la variation de la solubilité de l'oxygène à chaque température est prise en considération. Pour les températures étudiées, la solubilité de l'oxygène y est représentée au tableau 2.

Tableau 2

Solubilité de l'oxygène

Température (°C)	Solubilité de l'oxygène ($\mu\text{Mol/mL}$)
4	0.397
10	0.341
15	0.305
22	0.262
25	0.253
30	0.230
35	0.210

2.3.7 Variation du pH

Les tampons utilisés pour les mesures de dégagement d'oxygène varient selon les différents pH étudiés (tableau 3).

Ces solutions sont ajustées au pH correspondant à l'aide de NaOH ou de KCl. A chacune des solutions (50 mM), on ajoute les composés suivants: sorbitol 330 mM, MgCl₂ 5 mM, NaCl 1 mM et NH₄Cl 1 mM

pour former des tampons similaires à celui normalement utilisé (section 2.3.3).

Tableau 3

Tampons utilisés pour les mesures de dégagement d'oxygène

pH	Tampons
4	Acide citrique
5	Acide citrique
6	Mes
7	Tes
8	Tes
9	Tris

2.4 Entreposage à la lumière

Lors de ces expériences, les échantillons sont entreposés, à la température de la pièce (22 °C) ou dans un récipient contenant de la glace (4° C), dans un local soumis à un éclairage continu de 750 lux.

L'intensité lumineuse est mesurée à l'aide d'un luxmètre, modèle ECI de Optikon. Notons que les échantillons sont découverts.

2.5 Entreposage à l'obscurité

Les échantillons sont alors placés dans un récipient noir couvert, contenant (4 °C) ou non (22 °C) de la glace. Le bac est par la suite entreposé dans un local fermé et, à l'obscurité.

2.6 Inhibition

Pour chacun des inhibiteurs utilisés, leur formule chimique, leur pureté ainsi que le solvant dans lequel ils sont dilués sont indiqués au tableau 4. Pour les herbicides, le solvant utilisé est l'éthanol puisque qu'un blanc a démontré que ce dernier n'a aucun effet.

Pour l'ensemble des inhibiteurs, les dilutions donnant d'autres concentrations se font dans le tampon servant aux mesures de dégagement d'oxygène.

Lors de l'expérimentation, l'inhibiteur est ajouté à l'échantillon mélangé au tampon dans la cellule. Une période d'incubation de 10 min doit s'écouler avant d'éclairer. Pendant la période d'incubation, l'échantillon est barboté à l'azote gazeux.

Le pourcentage d'inhibition est calculé selon l'équation suivante:

(1) Pente témoin (activité de l'échantillon contrôle) - Pente inhibée (activité de l'échantillon en présence d'inhibiteur) = Activité perdue

(2) (Activité perdue/Pente témoin) X 100 = % inhibition

Tableau 4

Caractéristiques des inhibiteurs utilisés

Inhibiteur	Formule chimique	Pureté	Solvant	Concentration de la solution mère
Atrazine		90%	Ethanol	10 mM
Diuron	3-(3,4-Dichlorophényl)-1,1-Diméthyluré	80%	Ethanol	10 mM
Bromoxynil		280g/L	Ethanol	10 mM
Mercure	Hg(NO ₃) ₂ .H ₂ O	100%	Eau distillée	10 mM
Cuivre	CuCl ₂ .2H ₂ O	100%	Eau distillée	100 mM
Nitrite de sodium	NaNO ₂	97%	Eau distillée	1 M
Sulfite de sodium	Na ₂ SO ₃	100%	Eau distillée	1 M

2.7 Traitement des données

Chacune des expériences est toujours répétée entièrement au moins 2 fois (parfois 3). A l'intérieur de chaque expérience, toutes les mesures sont répétées de 2 à 3 fois. Ainsi, chacun des points sur un graphique représente la moyenne de ces 2 ou 3 mesures. De ces mesures, l'écart type y est calculé. Chaque graphique tracé au chapitre 3 constitue un exemple représentatif des résultats obtenus.

Pour les expériences avec les inhibiteurs, les I_{50} (concentration de l'inhibiteur pour laquelle il y a 50% de l'activité photosynthétique inhibée) sont déterminés graphiquement.

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 Mise au point des conditions d'utilisation des membranes immobilisées

Les membranes photosynthétiques immobilisées utilisées comme biosenseur doivent présenter la plus forte activité photosynthétique possible avant d'être en contact avec des produits toxiques. Ceci est indispensable pour que l'effet inhibiteur des polluants soit éventuellement mis en évidence.

3.1.1 Etude comparative de différentes combinaisons de tampons

De façon générale, les électrolytes jouent un rôle important dans la préservation du transport d'énergie entre les deux photosystèmes et, par le fait même, sur l'activité photosynthétique. En effet, les cations monovalents ou divalents protègent l'activité photochimique en maintenant l'empilement des membranes thylacoïdiennes (Thomasset, B. et al., 1984). Il fut vérifié au laboratoire que le tampon le plus efficace pour l'extraction des thylacoïdes à partir de feuilles d'épinard est le tampon Tes-NaOH comportant 5 mM de $MgCl_2$ et 1 mM de NaCl.

Ces fortes concentrations en sels favorisent l'empilement des membranes isolées. Si le $MgCl_2$ est enlevé du milieu de resuspension des membranes natives, un déempilement des membranes est observé (Thomasset, B. et al., 1982). Ainsi, lorsque les membranes sont isolées, leur structure peut être manipulée en changeant les concentrations ioniques de leur milieu de resuspension (Barber, J., 1986).

Les deux photosystèmes peuvent aussi être protégés par des méthodes d'immobilisation puisque les matrices artificielles permettent la stabilisation de la chaîne de transport d'électrons. Le matériel biologique étant resuspendu dans un tampon fortement concentré en ions avant l'immobilisation, il y a alors un renforcement du degré d'empilement des membranes tel qu'expliqué précédemment. La co-liaison de ces membranes avec le BSA et le glutaraldéhyde favorise une augmentation de la concentration locale des ions entre les membranes, renforçant et stabilisant l'empilement membranaire (Thomasset, B. et al., 1984) (section 1.6). Selon B. Thomasset et al.(1982), il semble donc que le tampon phosphate, sans ions, soit le plus efficace pour l'immobilisation.

Puisque la nature et la quantité des ions présents dans les milieux d'extraction et d'immobilisation des thylacoïdes semblent avoir une grande importance, il fut nécessaire de définir la composition des tampons d'extraction, d'immobilisation et de dégagement d'oxygène. Pour ce faire, une étude comparative de différentes combinaisons de tampons a été réalisée afin de cerner celle où le rendement

photosynthétique est supérieur (Tableau 5). Le tampon Tes-NaOH comporte 5 mM de $MgCl_2$ et 1 mM de NaCl, le tampon phosphate utilisé pour l'immobilisation ne contient aucun ion tandis que le tampon phosphate employé lors de l'extraction et du dégagement d'oxygène renferme 1 mM de $MgCl_2$ et 0.15 mM de NaCl.

Tableau 5

Effet de différentes combinaisons de tampons pour l'extraction, l'immobilisation et le dégagement d'oxygène sur l'activité photosynthétique.

Tampon d'extraction	Tampon d'immobilisation	Tampon de dégagement d'oxygène	Activité en $\mu\text{Mol O}_2/\text{mg Chl. h}$
Tes-NaOH	Tes-NaOH	Tes-NaOH	50.91+-4.5
Tes-NaOH	Phosphate	Tes-NaOH	54.48+-1.8
Tes-NaOH	Phosphate	Phosphate	37.52+-2.5
Phosphate	Phosphate	Phosphate	21.44+-5.1

Les chiffres plus élevés obtenus lors des deux premières combinaisons, représentés dans le tableau 5, confirment le fait que le processus d'immobilisation augmente la concentration locale des ions, tel que mentionné plus haut, puisqu'il n'y a pas de différence

significative lorsque l'immobilisation a lieu en présence ou en absence d'ions. La comparaison entre la deuxième et la troisième combinaison certifie la présence d'un échange ionique entre la matrice d'immobilisation et le milieu. En effet, l'activité photosynthétique passe de $54.48 \mu\text{Mol O}_2/\text{mg Chl.h}$ à $37.52 \mu\text{Mol O}_2/\text{mg Chl.h}$ à cause de la faible quantité d'ions dans le tampon de dégagement d'oxygène. Enfin, une faible concentration ionique dans tous les tampons donne un rendement nettement inférieur aux autres soit seulement $21.44 \mu\text{Mol O}_2/\text{mg Chl.h}$.

Ces résultats appuient l'importance accordée aux sels pour de meilleurs rendements photosynthétiques. La combinaison optimale en terme d'activité photosynthétique est alors celle où les thylacoïdes sont extraits dans un tampon Tes-NaOH comportant 5 mM de MgCl_2 et 1 mM de NaCl, immobilisés en absence d'ions dans un tampon phosphate et resuspendus dans un tampon identique à celui de l'extraction pour la prise des mesures de dégagement d'oxygène. Cette combinaison est utilisée pour l'ensemble des expériences.

3.1.2 Détermination de la concentration optimale de l'accepteur artificiel d'électrons

Les membranes immobilisées présentent toujours un rendement photosynthétique inférieur à celui des membranes libres. Il en est ainsi puisque la matrice d'immobilisation introduit des interactions entre la chaîne de transport d'électrons et le nouvel environnement

ionique pouvant affecter la structure des membranes thylacoïdiennes (Thomasset, B. et Thomas, D., 1988). En modifiant les concentrations ioniques locales, le support artificiel peut causer des déplacements latéraux des centres réactionnels et des réarrangements intramoléculaires des transporteurs d'électrons à l'intérieur des membranes. Ces changements n'affectent pas l'intégrité morphologique des thylacoïdes mais diminuent l'efficacité du transfert d'énergie entre les deux photosystèmes (Thomasset, B. et Thomas, D., 1988; Thomasset, B. et al., 1986; Thomasset, B. et al., 1984; Tripathy, B.C. et Mohanty, P., 1981). Cette diminution de l'efficacité du transport d'électrons affecte aussi l'habileté des membranes immobilisées à photoréduire les accepteurs artificiels d'électrons (Hardt, H. et Kok, B., 1976).

Une des façons de surmonter le rendement photosynthétique affaibli des thylacoïdes immobilisés afin d'obtenir de hauts taux de dégagement d'oxygène est d'utiliser un accepteur d'électrons lipophile. Les accepteurs lipophiles sont réduits au niveau de Q_B tandis que les accepteurs hydrophiles sont réduits par le PSI (Hardt, H. et Kok, B., 1976). Des résultats ont démontré une sévère diminution du dégagement d'oxygène si un accepteur du PSI est utilisé et seulement une faible inhibition, en présence d'un accepteur du PSII (Hardt, H. et Kok, B., 1977). Il en est ainsi puisque le glutaraldéhyde à un effet inhibiteur sur la PC.

Comme accepteur artificiel d'électrons spécifique pour le PSII, le DCBQ est excellent puisqu'il permet un fort rendement

photosynthétique (Izawa, S., 1980). Sa concentration optimale chez les membranes natives ($11 \mu\text{g Chl/mL}$) est de $100 \mu\text{M}$ alors qu'elle est de $400 \mu\text{M}$ pour des membranes immobilisées ($11 \mu\text{g Chl/mL}$) (figure 11). Ces résultats démontrent clairement une différence entre les courbes selon que le matériel biologique est immobilisé ou non. On pourrait supposer que la nécessité d'une plus forte concentration de DCBQ pour les membranes immobilisées est due à la barrière de diffusion qu'impose la matrice d'immobilisation. Toutefois, Purcell et Carpentier (1990) ont démontré que les membranes immobilisées sont plus sensibles à l'atrazine et au diuron que les membranes libres. Etant donné que les herbicides et le DCBQ ont le même site d'action, soit au niveau de Q_B , et que les herbicides ne semblent rencontrer aucune difficulté de diffusion, l'hypothèse soulevé est peu probable à moins de supposer que le DCBQ et les herbicides diffusent différemment.

De plus, les résultats obtenus à la figure 11 démontrent que l'utilisation d'une trop faible concentration de DCBQ diminue l'activité photosynthétique à cause d'un manque d'accepteur d'électrons. Des concentrations de DCBQ supérieures à la concentration optimale ont aussi un effet inhibiteur sur l'activité photosynthétique. Cette inhibition provient probablement du DMSO, solvant dans lequel le DCBQ est solubilisé. De trop grandes quantités de solvant provenant de grandes quantités de DCBQ inhiberaient le transport d'électrons. Toutefois, pour confirmer cette hypothèse, il faudrait vérifier l'effet inhibiteur du DMSO sur les membranes. L'utilisation de solutions

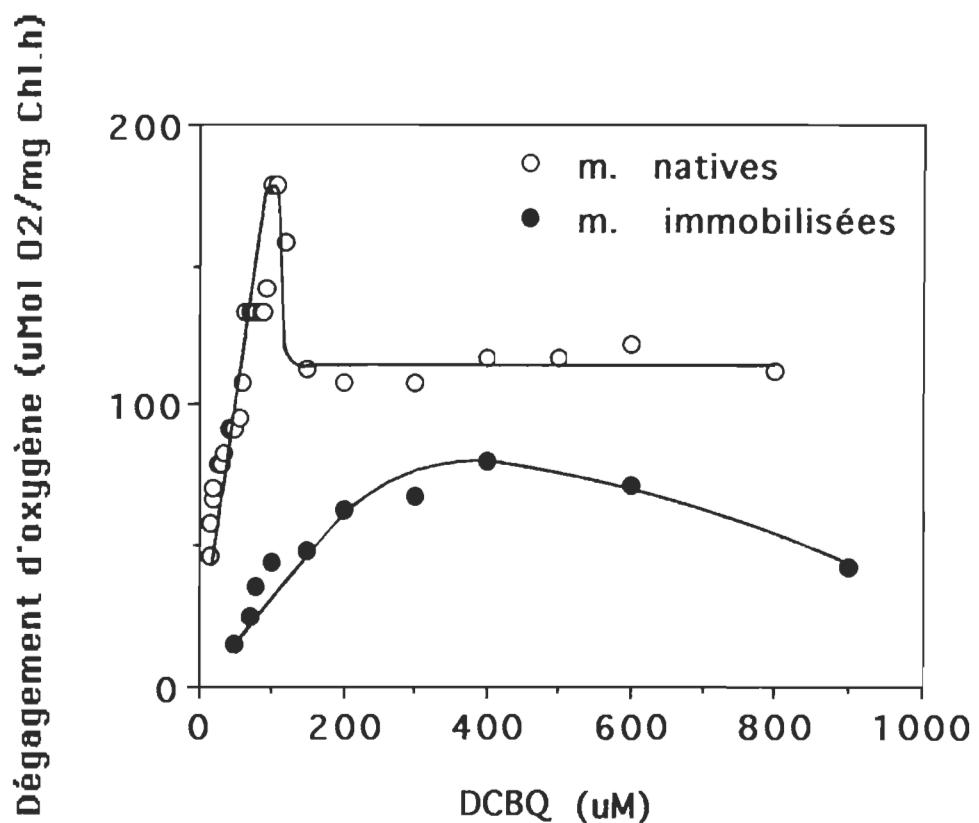


FIGURE 11. Dégagement d'oxygène ($\mu\text{Mol O}_2/\text{mg Chl.h}$) en fonction de la concentration de DCBQ (μM) pour des membranes natives et immobilisées concentrées à 11 $\mu\text{g Chl/mL}$.

mères de DCBQ plus concentrées éviterait la présence de grandes quantités de solvant dans l'échantillon.

Dans la plupart des publications, la concentration de DCBQ utilisée est de $600 \mu\text{M}$ pour les membranes natives. Il est ainsi puisqu'à cette concentration, de petites variations de la quantité de DCBQ lors des expériences n'a pas d'effet sur l'activité photosynthétique grâce à la présence d'un plateau dans cette région (figure 11). En considérant la concentration optimale de DCBQ utilisée lors des expériences de ce mémoire, le rendement photosynthétique obtenu avec les membranes immobilisées n'est pas inférieur à celui atteint à l'aide de membranes natives dans les publications où $600 \mu\text{M}$ de DCBQ est utilisé.

La concentration optimale de DCBQ a été vérifiée pour différentes concentrations de Chl à la figure 12. Les différentes concentrations de Chl y sont obtenues en variant le rapport de Chl/BSA établit par Cocquempot, M.F. et al. (1981) c'est-à-dire en changeant la proportion de thylacoïde par rapport à la quantité de BSA comme expliqué à la section 2.2.1. Les résultats démontrent que la concentration optimale de DCBQ varie avec la concentration de Chl. A $3 \mu\text{g Chl/mL}$, elle est de $200 \mu\text{M}$; à $6 \mu\text{g Chl/mL}$, $300 \mu\text{M}$; à $9 \mu\text{g Chl/mL}$, $350 \mu\text{M}$; alors qu'à 11 et $20 \mu\text{g Chl/mL}$, elle correspond à $400 \mu\text{M}$.

La figure 13 démontre clairement la relation existant entre les concentrations de Chl ($\mu\text{g/mL}$) et les concentrations optimales de DCBQ

(μ M). Pour des concentrations de Chl de 11 μ g/mL et plus, la concentration optimale de DCBQ est de 400 μ M.

Lorsque les concentrations optimales de DCBQ sont présentes pour chacune des concentrations de Chl, des échantillons de 3, 6 et 9 μ g Chl/mL dégagent tous la même quantité d'oxygène lorsqu'elle est calculée par mg Chl/h (figure 12). C'est donc dire que la concentration en Chl du biocapteur pourrait être aussi faible que 3 μ g/mL. Notons que le biocapteur sera plus sensible à de très petites quantités de produits toxiques s'il renferme la plus petite concentration en Chl possible. En effet, la probabilité que les sites d'inhibition au niveau du PSII soient tous occupés par le polluant sera d'autant plus grande, moins il y aura de membranes thylacoïdiennes. Notons qu'à cette très faible concentration en Chl, bien que la quantité d'oxygène dégagée par mg de Chl est élevée, la quantité réelle d'oxygène dégagée par l'échantillon est très faible. La mesure de la pente résultant de cette petite quantité d'oxygène dégagée comporte alors un plus grand pourcentage d'erreur. Ainsi, étant donné la variabilité de la mesure d'oxygène, le test est moins précis aux faibles concentrations. Il devient donc difficile d'y déceler le pourcentage d'inhibition en présence de produits toxiques.

En se référant encore à la figure 12, on remarque qu'entre 3 et 9 μ g Chl/mL, la quantité de BSA présente est suffisante pour protéger les molécules de Chl contre l'effet inhibiteur des aldéhydes. Toutefois, la plus faible activité de la matrice de 20 μ g Chl/mL laisse sous-entendre

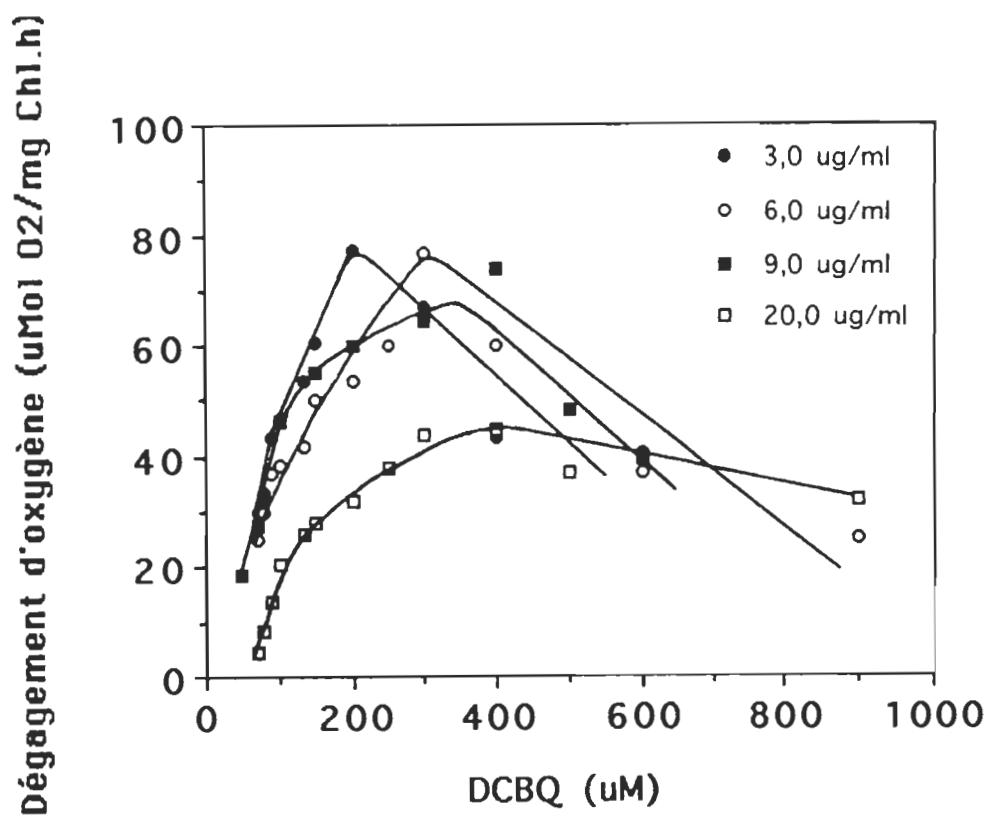


FIGURE 12. Dégagement d'oxygène ($\mu\text{Mol O}_2/\text{mg Chl.h}$) en fonction de la concentration de DCBQ (μM) pour différentes concentrations de Chl dans la matrice d'immobilisation ($\mu\text{g/mL}$).

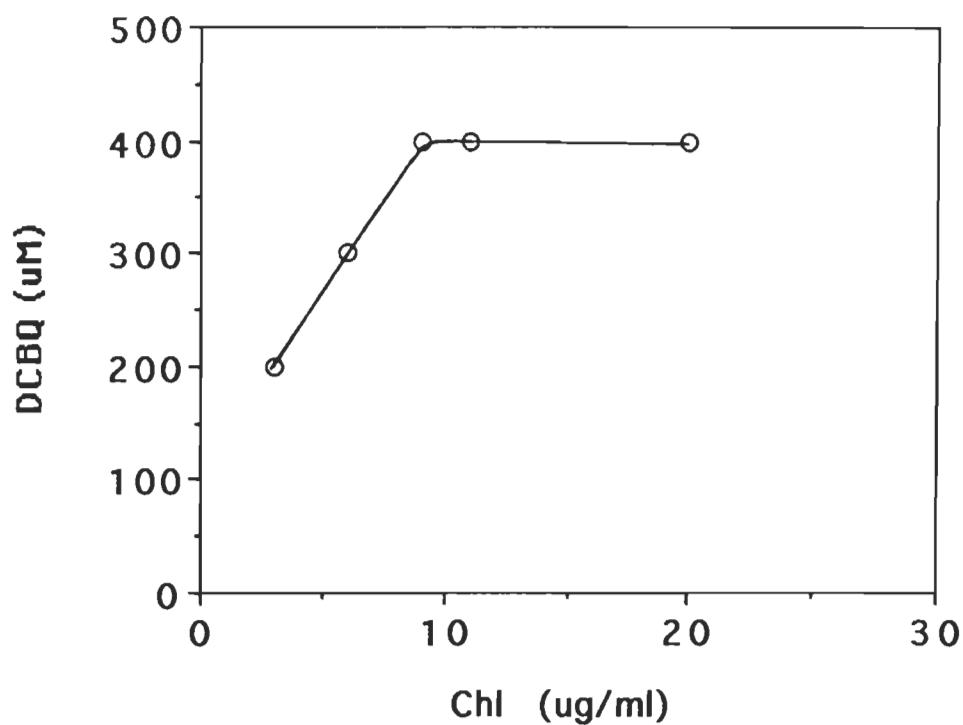


FIGURE 13. Concentration optimale de DCBQ pour différentes concentrations de Chl ($\mu\text{g/mL}$).

un rapport de Chl/BSA non optimal. Il y aurait une proportion trop grande de membranes pour la quantité de BSA. Ainsi, le glutaraldéhyde a plus de chance de se lier aux NH₂ libres des protéines des thylacoïdes qu'avec ceux du BSA, entraînant, de cette manière, une plus faible activité photosynthétique.

Grâce aux résultats présentés à la figure 14 où les rapports de Chl/BSA sont gardés optimaux pour toutes les concentrations de Chl (obtenues en variant les volumes des échantillons: voir section 2.2.1), l'hypothèse soumise au paragraphe précédent est confirmée. Pour obtenir 3, 11 et 20 μg Chl/mL dans la cellule à dégagement d'oxygène, les volumes des échantillons correspondants sont respectivement de 20, 75 et 138 μL . En procédant de cette façon, les concentrations optimales de DCBQ sont identiques à celles de la figure 11 et 12, soit 200 μM pour 3 μg Chl/mL et 400 μM pour 11 et 20 μg Chl/mL. Toutefois, cette expérience démontre que dans des conditions où la quantité de BSA est suffisante par rapport à celle de Chl, la matrice de 138 μL (volume d'échantillon correspondant à 20 μg Chl/mL) présente autant d'activité photosynthétique que celle de 75 μL (volume correspondant à 11 μg Chl/mL), contrairement aux résultats obtenus précédemment (figure 12). La figure 14 confirme l'importance de garder constant le rapport de Chl/BSA établit par M.F. Cocquempot et al. (1981), pour une activité photosynthétique optimale.

De plus, la figure 14 met en évidence la possibilité d'obtenir à 3 μg

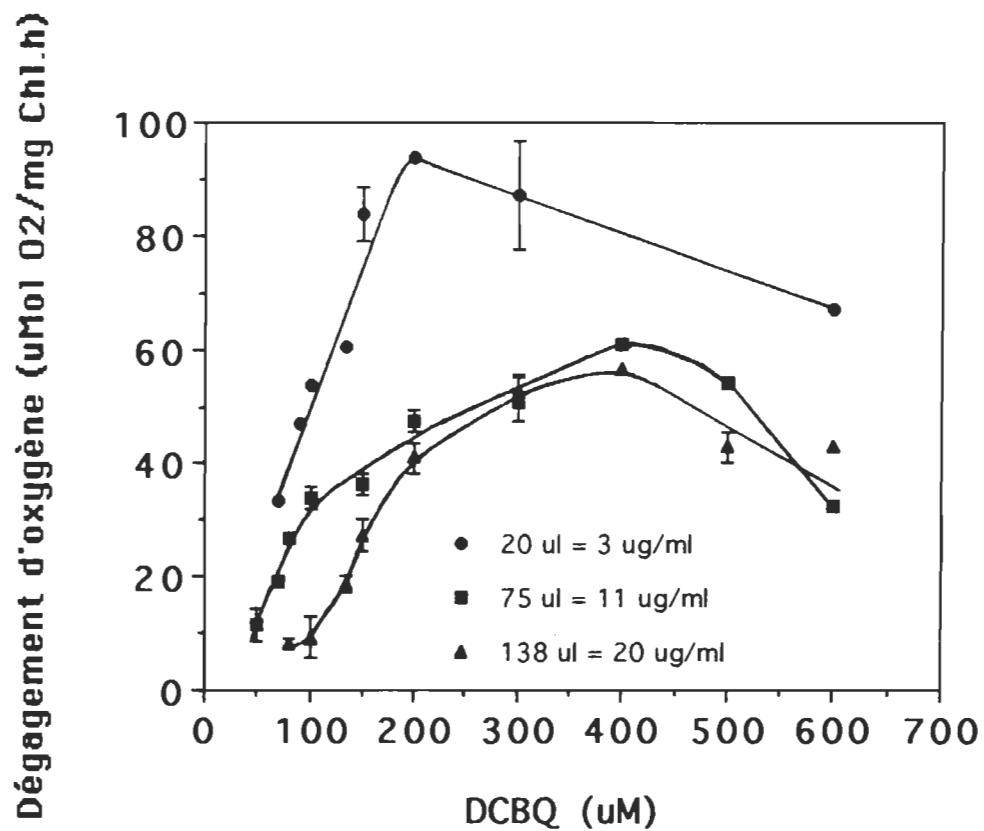


FIGURE 14. Dégagement d'oxygène ($\mu\text{Mol O}_2/\text{mg Chl.h}$) en fonction de la concentration de DCBQ (μM) pour différents volumes de matrices (μL).

Chl/mL (concentration équivalent à celle d'un volume d'échantillon de 20 μ L) non seulement autant d'oxygène dégagée en μ Mol O₂/mg Chl.h qu'à 11 μ g Chl/mL (concentration équivalent à celle d'un volume de 75 μ L) mais beaucoup plus. Cette plus forte activité de la matrice de 20 μ L est peut-être provoquée par l'intensité lumineuse. En effet, lors des expériences, les échantillons sont toujours tous éclairés avec la même intensité lumineuse. Toutefois, la matrice d'immobilisation induit une dispersion de la lumière incidente (Carpentier, R. et al., 1987; Carpentier, R. et Lemieux, S., 1987). Ainsi, plus la matrice d'immobilisation est volumineuse, plus il y a de lumière dispersée. Ce phénomène de dispersion entraîne l'absorption d'une plus faible portion de lumière par les membranes immobilisées. Au contraire, un très petit volume de matrice comme 20 μ L reçoit quant à lui, beaucoup plus de lumière étant donné la faible dispersion qu'il induit.

Toutefois, l'oxygène dégagée par différents volumes de matrices, tous éclairés par la même intensité lumineuse, en présence de 400 μ M de DCBQ, tel que présenté à la figure 15, n'est pas supérieur chez les plus petits volumes de matrices. Au contraire, les volumes inférieurs à 40 μ L sont moins actifs. Ce plus faible rendement photosynthétique provient de la concentration de DCBQ qui n'est pas optimale pour les concentrations de 6 μ g Chl/mL et moins (concentration correspondant à des volumes de 40 μ L et moins) (voir figure 12).

Notez qu'à la figure 14, on trouve que le dégagement d'oxygène à 400 μ M est supérieur pour un volume de 20 μ L comparativement aux

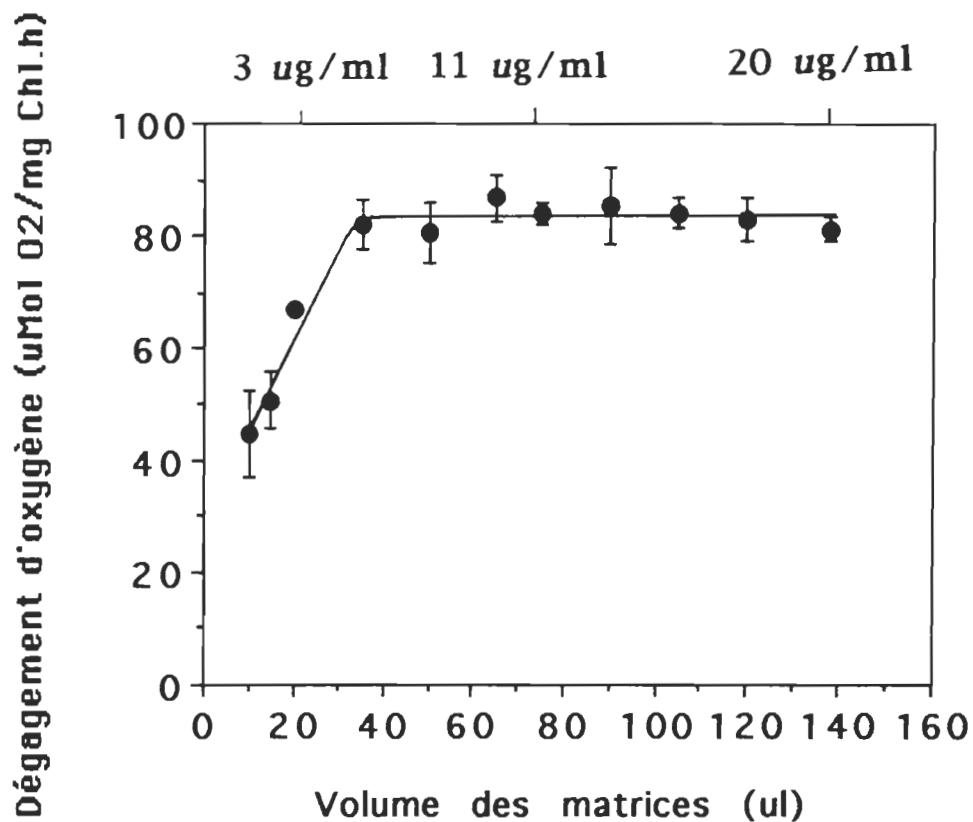


FIGURE 15. Dégagement d'oxygène ($\mu\text{Mol O}_2/\text{mg Chl.h}$) en fonction du volume des matrices (μL) reflétant différentes concentrations de Chl ($\mu\text{g}/\text{mL}$) en présence de $400 \mu\text{M}$ de DCBQ.

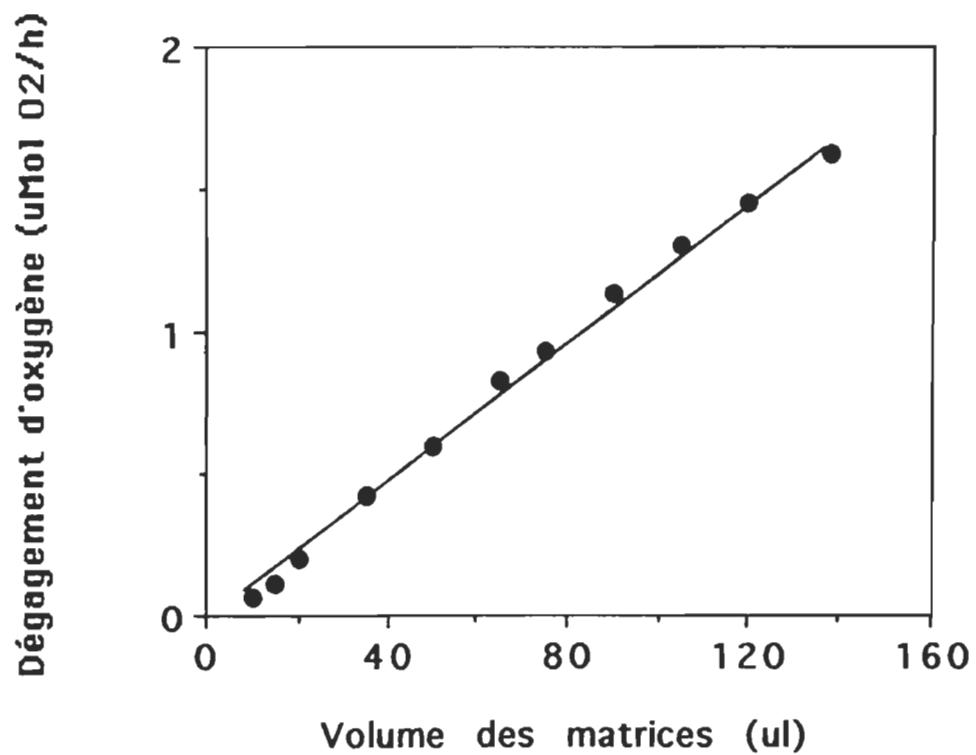


FIGURE 16. Dégagement d'oxygène (μ Mol O₂/h) en fonction du volume des matrices (μ L).

échantillons de 75 et 138 μL . Or, à la figure 15, on obtient des résultats différents c'est-à-dire qu'à 400 μM de DCBQ la matrice de 20 μL est moins active en terme d'oxygène dégagée que celle de 75 et 138 μL . Cette contradiction reflète l'incertitude des mesures de la petite matrice de 20 μL tel que déjà expliqué.

Lorsque le dégagement d'oxygène ($\mu\text{Mol O}_2/\text{mg Chl.h}$) des mesures de la figure 15 est calculé sans tenir compte de la concentration de Chl ($\mu\text{Mol O}_2/\text{h}$) (figure 16), on obtient une droite et ce, même si les trois premières mesures de la figure 15 ont une activité inférieure aux autres. Il en est ainsi puisque cette différence n'est pas suffisamment importante pour y voir une variation significative sur la droite de la figure 16. On peut alors remarquer, à la figure 16, la présence d'une intensité lumineuse saturante, quel que soit le volume des matrices puisque plus les matrices renferment de Chl, plus il y a d'oxygène dégagée en $\mu\text{Mol O}_2/\text{h}$; il n'y a donc pas de saturation. Cela signifie alors que même en présence de grands volumes de matrices, dispersant beaucoup de lumière tel qu'expliqué auparavant, l'intensité lumineuse éclairant ces échantillons est suffisamment éblouissante pour contrebalancer la lumière dispersée et ainsi, pour ne pas limiter leur activité photosynthétique.

Les membranes natives soumises à la même intensité lumineuse, en présence de 100 μM de DCBQ (figure 17-18), sont dans des conditions optimales quelle que soit la concentration en Chl. La figure 17 met en relief le fait que la concentration de DCBQ (100 μM) est optimale pour toutes les concentrations de Chl chez les membranes

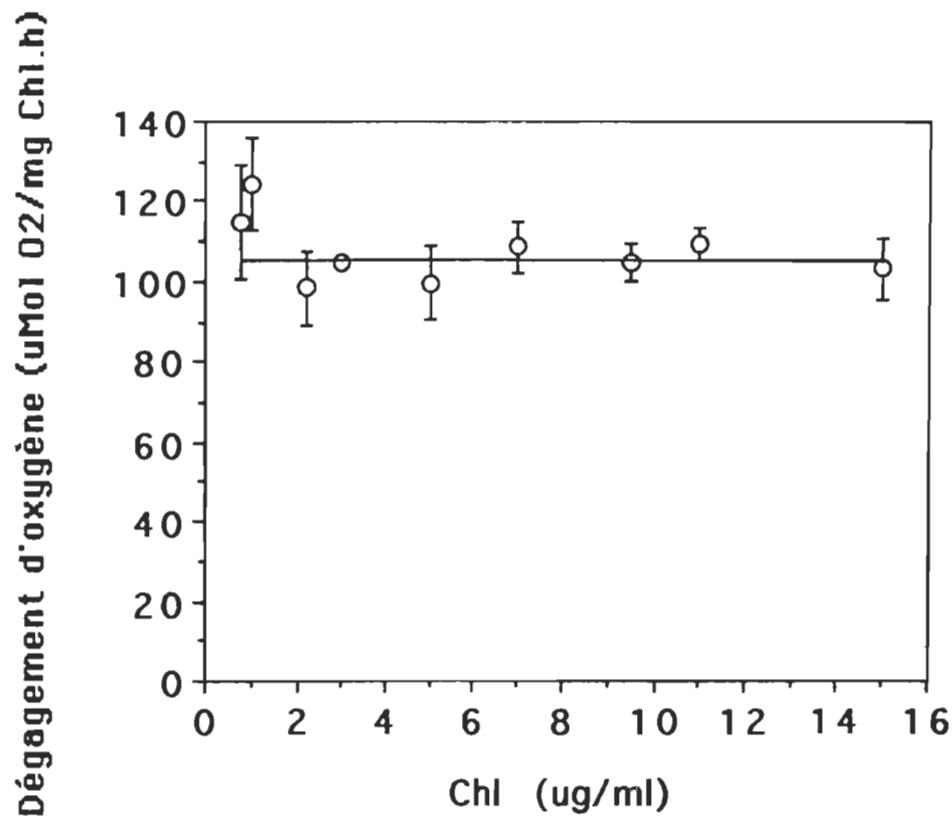


FIGURE 17. Dégagement d'oxygène ($\mu\text{Mol O}_2/\text{mg Chl.h}$) en fonction de la concentration de Chl ($\mu\text{g/mL}$) chez des membranes natives en présence de $100 \mu\text{M}$ de DCBQ.

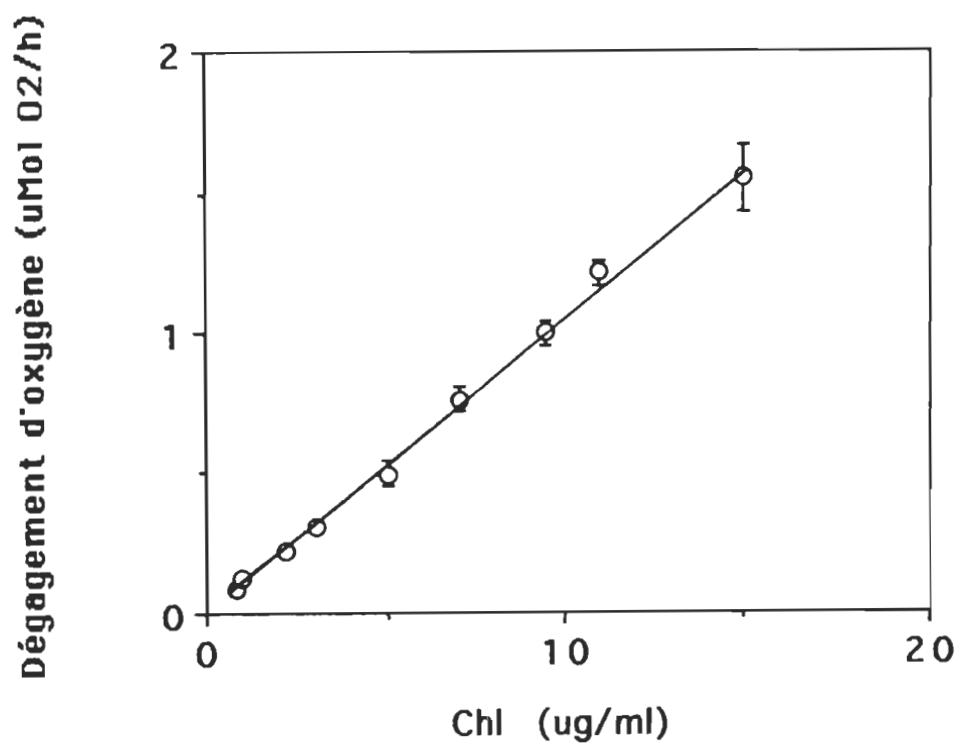


Figure 18. Dégagement d'oxygène (μ Mol O₂/h) en fonction de la concentration de Chl (μ g/mL) chez des membranes libres.

natives puisque peu importe la concentration en Chl, la quantité d'oxygène dégagée en $\mu\text{Mol O}_2/\text{mg Chl.h}$ est toujours la même. La relation linéaire présentée à la figure 18, où le dégagement d'oxygène des résultats provenant de la figure 17 est calculé en $\mu\text{Mol O}_2/\text{h}$ (sans tenir compte de la concentration de Chl) démontre, à son tour, que la quantité de lumière reçue par les membranes thylacoïdiennes est toujours suffisante puisque les thylacoïdes présents en plus fortes concentrations (en terme de Chl) dégagent plus d'oxygène. Evidemment, les membranes libres n'imposent aucune barrière de diffusion et n'engendrent aucun phénomène de dispersion.

3.1.3 Etude du temps de vie des membranes photosynthétiques sous différentes conditions d'entreposage

Il faut étudier le temps de vie des membranes thylacoïdiennes puisque la longévité du matériel est un important indice de stabilité. Or, pour toutes applications éventuelles des membranes photosynthétiques comme biocapteur, une grande stabilité est requise.

Les membranes thylacoïdiennes isolées sont malheureusement instables, même lorsqu'elles sont entreposées à 4 °C et à la noirceur (Papageorgiou, G.C., 1979). Comme démontré à la figure 19, après 48 h d'entreposage à 4 °C, à la noirceur, les membranes natives ont déjà perdu près de 40% de leur activité initiale, comparativement aux membranes immobilisées, qui après 168 h, présentent encore un

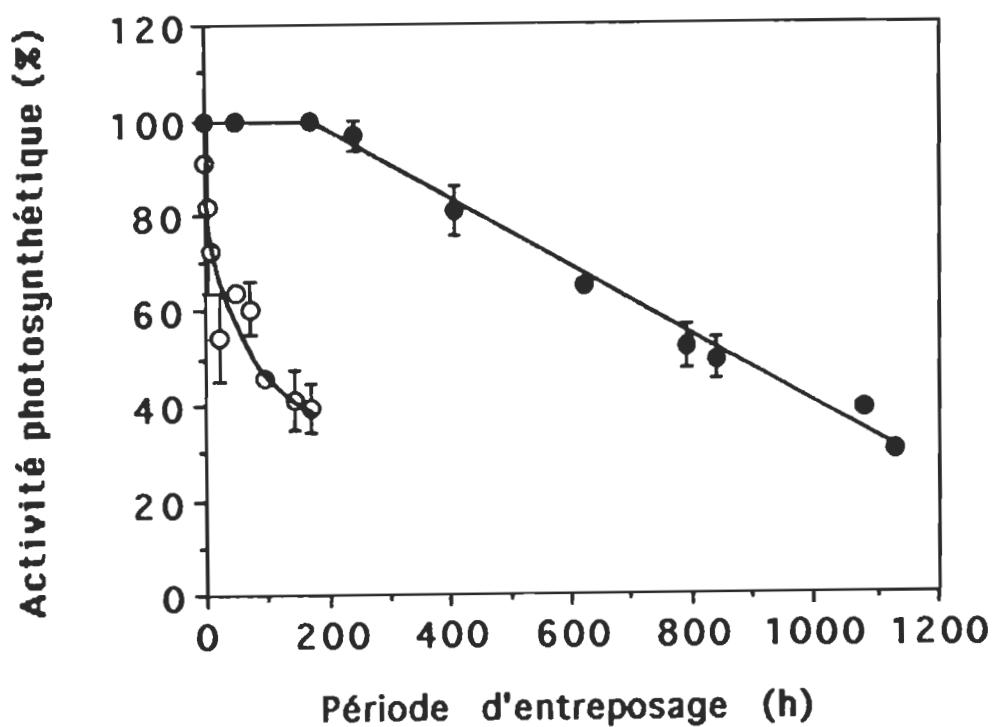


FIGURE 19. Activité photosynthétique (%) en fonction de la période d'entreposage (h) à l'obscurité et à 4 °C, pour des membranes natives (○) et immobilisées (●) concentrées à 11 µg/mL.

rendement de 100%. Même si 40% de l'activité photosynthétique est perdue suite à l'immobilisation du matériel dans une matrice de glutaraldéhyde et de BSA, il n'en demeure pas moins que la stabilité du matériel encore actif est grandement améliorée, sous de longues périodes d'entreposage, comparativement aux membranes libres (Carpentier, R. et al., 1989; Carpentier, R. et al., 1987). Ainsi, les membranes immobilisées dans une matrice de BSA-glutaraldéhyde sont plus résistantes au vieillissement.

Le glutaraldéhyde permet une protection partielle des chloroplastes contre la perte d'activité photosynthétique engendrée par les processus destructeurs de membranes (Papageorgiou, G.C., 1979). De plus, le glutaraldéhyde retarde le vieillissement de l'appareil à dégagement d'oxygène sans pour autant l'arrêter. Toutefois, la plus grande protection contre le vieillissement chez les membranes immobilisées est provoquée par le BSA. En effet, les molécules de BSA ont l'habileté de renverser les effets du vieillissement grâce à leur affinité pour les acides gras non couplés, relâchés lors du vieillissement ou sous l'effet de la lumière (Cocquempot, M.F. et al., 1981).

La protection apportée par la matrice d'immobilisation demeure lorsque les membranes sont entreposées à 22 °C et à l'obscurité (figure 20). En comparant les membranes natives qui ont déjà perdu 40% de leur activité initiale après seulement 1 1/2 h d'entreposage à l'obscurité et à 22 °C avec les membranes immobilisées pour qui ce même pourcentage est atteint après 42 h environ, il devient évident

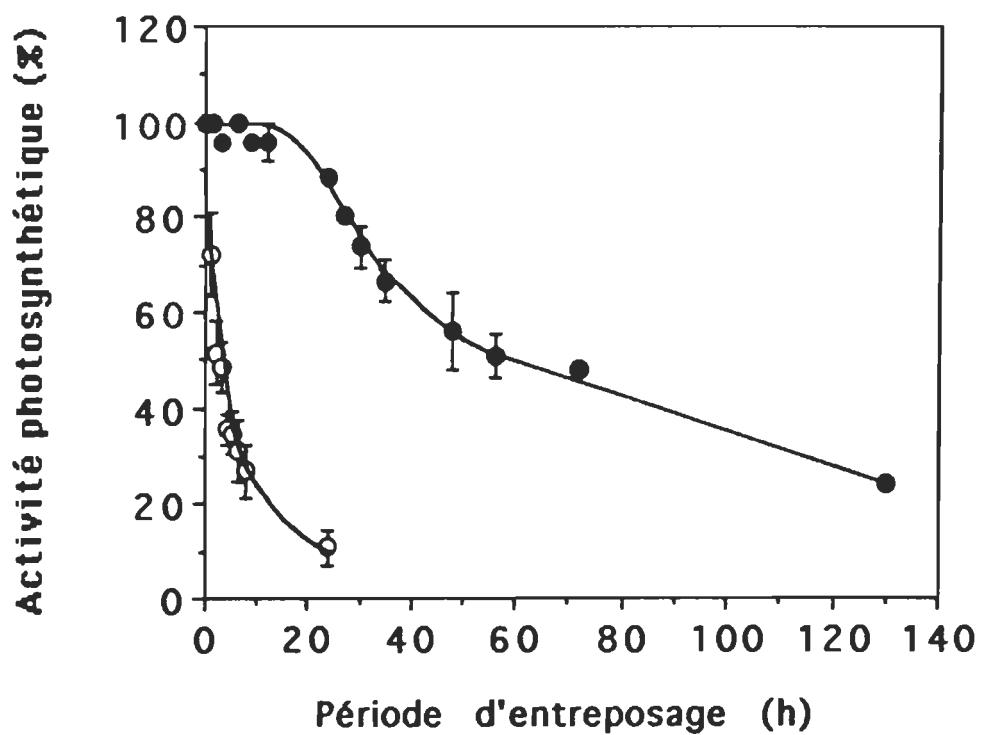


FIGURE 20. Entreposage à l'obscurité et à 22 °C des membranes natives (o) et immobilisées (●) concentrées à 11 μ g Chl/mL.

que l'immobilisation protège aussi les protéines extrinsèques, supportant les atomes de manganèse de l'appareil à dégagement d'oxygène, contre une dégradation rapide sous des températures plus chaudes (Inoue, H. et al., 1987).

La cinétique de la perte d'activité en fonction du temps est similaire à 4 °C (figure 19) et à 22 °C (figure 20) quoique beaucoup plus rapide à 22 °C (Hardt, H. et Kok, B., 1976). En effet, l'activité initiale des membranes immobilisées demeure pendant une quinzaine d'heures à 22 °C (figure 20) comparativement à 168 h, à 4 °C (figure 19). Ainsi, sous des températures plus chaudes, le degré de protection est inférieur à celui observé à 4 °C puisqu'une augmentation de température entraîne une désactivation plus rapide des pigments chlorophylliens (Jeanfils, J. et al., 1982). Tant qu'aux membranes libres, elles sont beaucoup plus sensibles à cette augmentation de température et, par conséquent, à la dégradation rapide des protéines. En effet, à 22 °C, elles perdent 40% de leur activité initiale après 1 1/2 h d'entreposage (figure 20) comparativement à 48 h, à 4 °C (figure 19).

La figure 21 démontre que peu importe la concentration en Chl et la façon dont les membranes sont immobilisées (en variant ou en gardant constant le rapport de Chl/BSA), les membranes immobilisées, lorsqu'elles sont entreposées à l'obscurité, à 4 °C, ont toujours le même comportement. De plus, elles conservent tous une activité initiale aussi longtemps, soit 168 h, qu'avec des membranes immobilisées à 11 µg Chl/mL selon la méthode de base décrite par M.F. Cocquempot et al.,

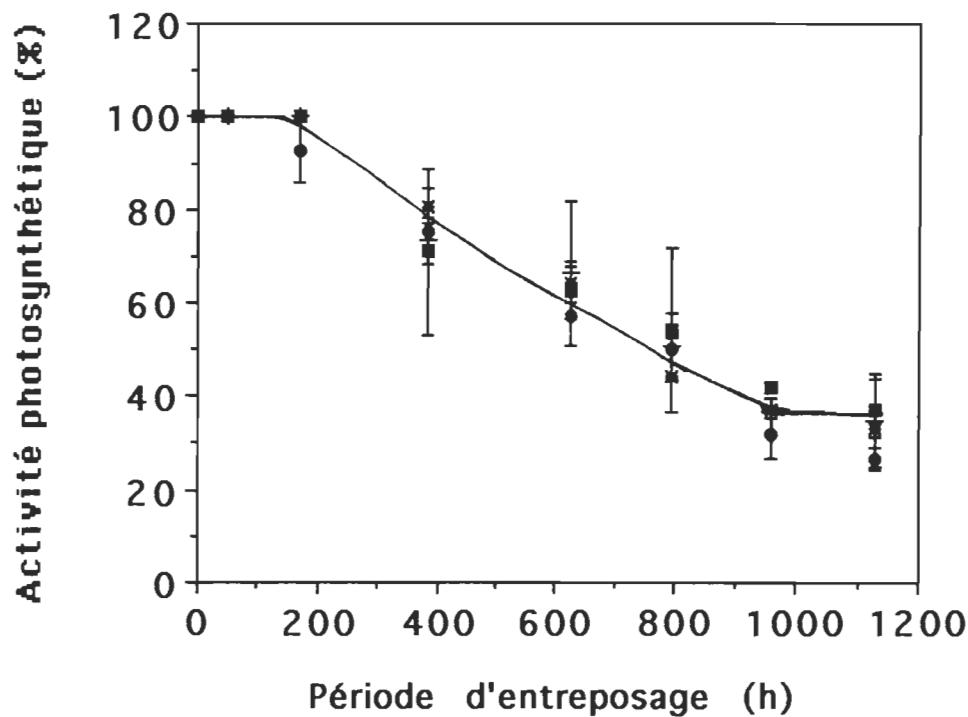


FIGURE 21. Entreposage à l'obscurité à 4 °C de différentes concentrations de Chl, 3 µg/mL (●) et 20 µg/mL (*) et pour différents volumes de matrices, 20 µL (■) et 138 µL (+).

(1981) (figure 19). La similarité au niveau du comportement des différentes matrices entreposées à l'obscurité n'est pas surprenante étant donné la constance, dans toutes les matrices, de la quantité de BSA et de glutaraldéhyde, agents stabilisants tel que mentionné plus haut, peu importe la façon dont elles sont préparées. Notons que la différence réside en la quantité de Chl par rapport à celle de BSA (section 2.2.1). Pour une concentration de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ où il y a plus de Chl, les échantillons vivent aussi longtemps. Alors, la conséquence de la variation du rapport de Chl/BSA consiste seulement en une diminution de l'activité initiale (figure 12). Elle n'a aucun effet sur le temps de vie puisque les molécules de Chl en surplus non protégées par le BSA sont tout de même immobilisées par le glutaraldéhyde.

A 22 °C, sous des conditions d'obscurité, des comportements similaires sont aussi observés entre les matrices de 20 et 75 μL (figure 22). Toutefois, après 50 h d'entreposage, la matrice de 20 μL semble se détériorer un peu plus rapidement que celle de 75 μL . Cette différence provient d'un dessèchement plus rapide de la part des petites matrices, même si les échantillons sont placés dans un bac recouvert (voir section 2.5). Cette affirmation repose sur les résultats obtenus à la figure 27 où l'effet de l'hydratation sur l'activité des membranes immobilisées est étudié. Les résultats sont plus significatifs à cette figure. Le dessèchement sera évidemment plus rapide chez des membranes exposées à la lumière, à découvert.

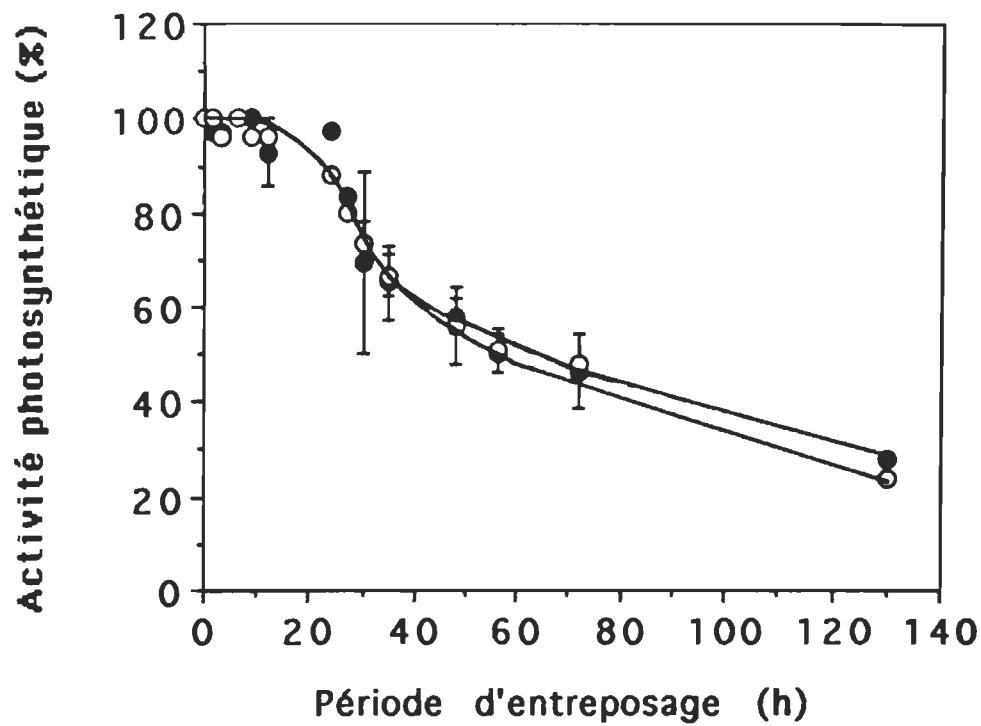


FIGURE 22. Activité photosynthétique (%) en fonction de la période d'entreposage (h) à l'obscurité et à 22 °C pour des volumes de matrices de 20 μ L (o) et 75 μ L (●).

Il importe également de connaître le comportement des membranes libres et immobilisées sous l'effet de la lumière puisque les conditions éventuelles d'utilisation sur le terrain supposent des manipulations du matériel biologique à la lumière.

Il est connu que l'énergie lumineuse est le principal facteur causant la détérioration des fonctions photosynthétiques chez les membranes libres. Plus spécifiquement, l'illumination des thylacoïdes provoque la dégradation de la protéine D₁. Le processus de dégradation de D₁ se fait en deux étapes: l'inactivation du site Q_B induit par des changements conformationnels et la dégradation de la protéine endommagée, possiblement par une protéase liée à la membrane. Ceci est accompagné d'une perte d'activité du PSII (Richter, M. et al., 1990).

A la lumière des résultats de la figure 23, on peut émettre l'hypothèse suivante: l'immobilisation des thylacoïdes dans une matrice de BSA/glutaraldéhyde les protège totalement contre cette dégradation de D₁ pendant au moins deux heures, lorsqu'ils sont entreposés à la lumière, à 4 °C. Par la suite, on remarque que la dégradation des membranes immobilisées se fait plus lentement que celle des membranes natives. La protection apportée par la matrice d'immobilisation provient possiblement de la barrière de diffusion qu'elle impose à l'oxygène (Carpentier, R. et al., 1987). Ceci limite la diffusion de l'oxygène à travers les membranes et, par le fait même, les réactions oxydatives. Notons que l'oxygène contribue d'une façon significative à la dégradation de la protéine D₁ (Richter, M. et al., 1990). Ainsi, l'immobilisation prévient la dégradation de D₁. De plus,

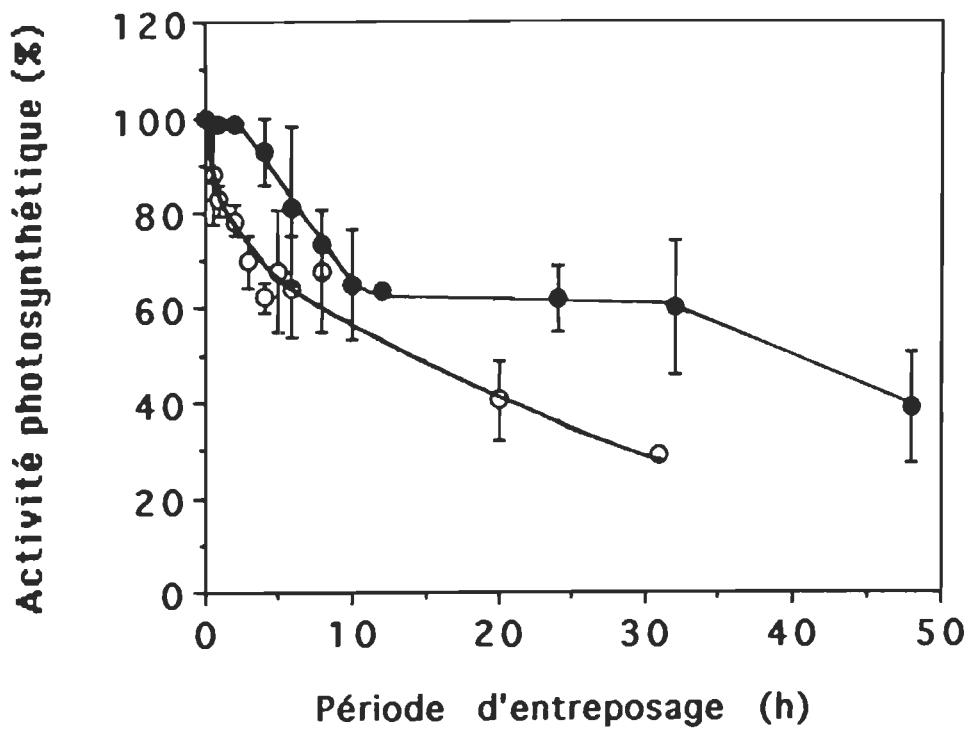


FIGURE 23. Activité photosynthétique (%) en fonction de la période d'entreposage (h) à la lumière et à 4 °C, pour des membranes natives (○) et immobilisées (●) renfermant 11 µg Chl/mL.

elle ralenti aussi, pour les mêmes raisons, la photooxydation des pigments photosynthétiques (Carpentier, R. et al., 1987; Jeanfils, J. et al., 1982). La forte dispersion de lumière induite par la matrice d'immobilisation, comme mentionné à la section 3.1.2, peut également protéger les membranes. Elles absorbent alors moins de lumière, comparativement aux membranes non immobilisées.

De plus, en comparant les résultats de la figure 23 avec ceux obtenus à 22 °C sous les mêmes conditions d'illumination (figure 24), on observe que la dégradation de D₁ est retardée à des températures plus froides comme le propose Richter et al. (1990). Effectivement, à 22 °C, 50 % de l'inactivation du PSII des membranes libres est atteinte après 2h (figure 24) comparativement à environ 12 h chez celles entreposées à 4 °C (figure 23). Chez les thylacoïdes immobilisés, le même phénomène s'observe. A 4 °C, 50 % de l'activité photosynthétique est inhibée après environ 40 h d'exposition à la lumière alors qu'22 °C, cela se produit suite à une dizaine d'heures d'exposition. Le ralentissement de la dégradation de la protéine D₁ à 4 °C comparativement à 22 °C (figure 23 et 24) semble plus marqué chez les membranes natives (6 fois plus lent) en comparaison avec les membranes immobilisées (4 fois plus lent). Il en est ainsi puisque les thylacoïdes immobilisés sont moins touchés par les variations de température (Bonenfant, D. et Carpentier, R., 1989).

Lorsque les membranes immobilisées sont exposées à la lumière, elles ont tendance à sécher à cause d'un phénomène d'évaporation. Rappelons qu'à la lumière, les échantillons sont entreposés dans un bac

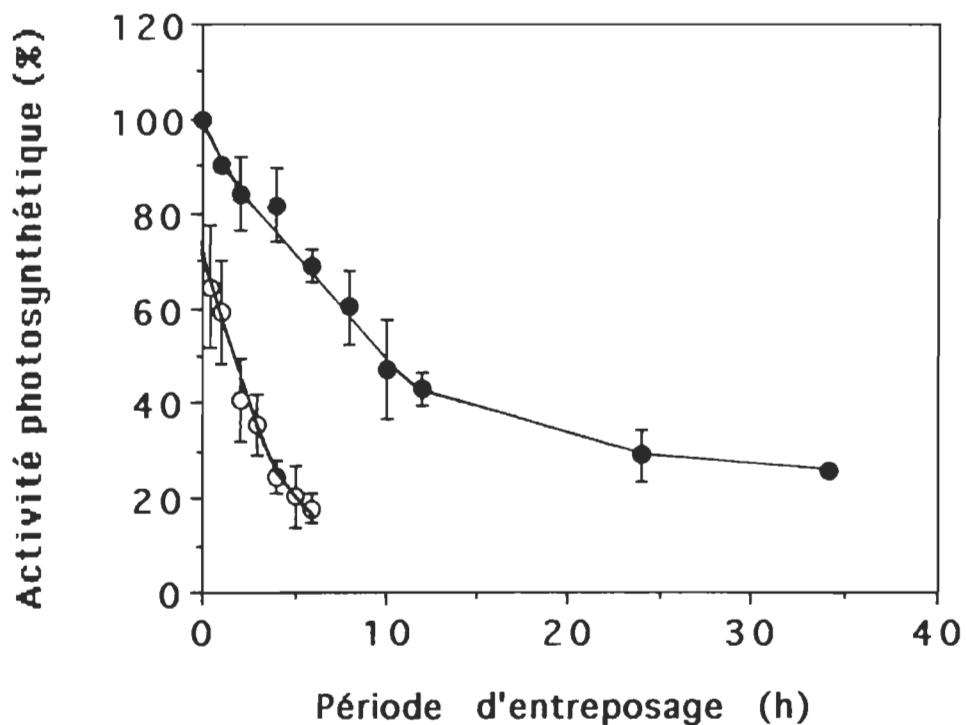


FIGURE 24. Activité photosynthétique (%) en fonction de la période d'entreposage (h) à la lumière à 22 °C pour des membranes natives (o) et immobilisées (●) renfermant 11 μ g Chl/mL.

non couvert (voir section 2.4). A 4 °C, un faible dessèchement des matrices de 20 μ L à la lumière semble avoir lieu plus rapidement que chez les matrices plus volumineuses, à cause du phénomène de dispersion de lumière plus important chez ces dernières (figure 25). Toutefois, l'effet est plus prononcé si les matrices sont entreposées à 22 °C, sous les mêmes conditions d'illumination (figure 26).

Le temps de vie plus court des plus petits volumes de matrice provient effectivement d'un dessèchement du matériel. En effet, la figure 27 démontre la sensibilité des membranes immobilisées à l'évaporation puisque les membranes hydratées (arroées avec de l'eau distillée) présentent un plus haut rendement photosynthétique après 10 h d'entreposage à la lumière. Ainsi, on peut supposer que les résultats obtenus aux figures 25 et 26 seraient tous identiques, peu importe le volume des matrices, si ce n'était pas du phénomène de déshydratation.

3.2 Inhibition de l'activité photosynthétique par des polluants

Plusieurs composés toxiques ont un effet inhibiteur sur la photosynthèse, au niveau du transport d'électrons. Le mode d'inhibition des deux principaux groupes, les herbicides et les métaux, a été élaboré à la section 1.5.1. En relation avec ces connaissances, la sensibilité des membranes natives et immobilisées est étudiée en présence de polluants, pour en connaître leur limite de détection.

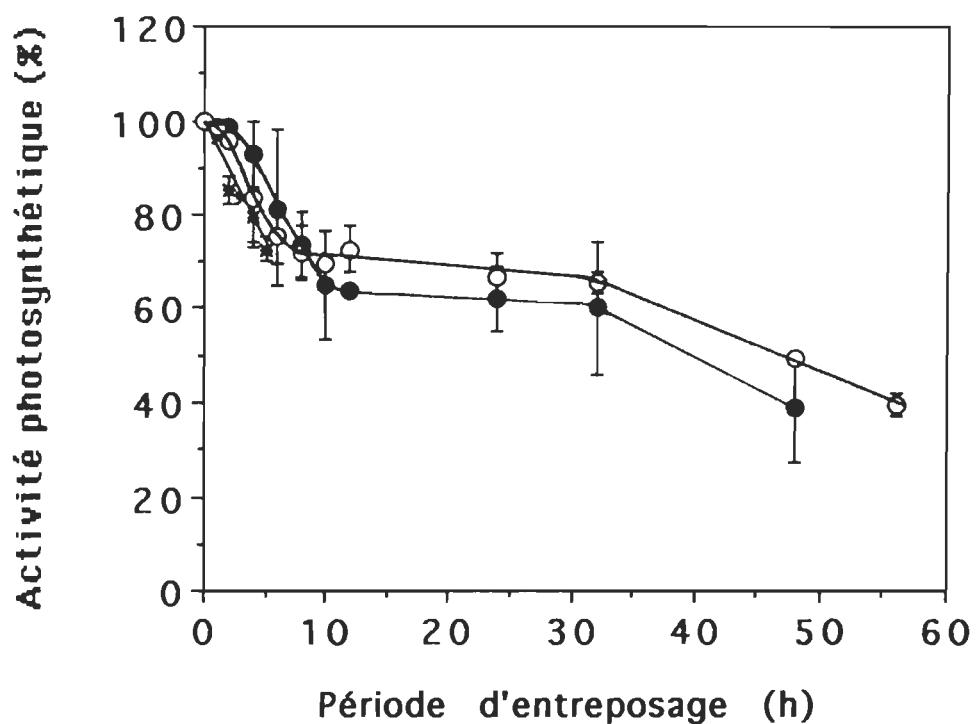


FIGURE 25. Activité photosynthétique (%) en fonction de la période d'entreposage (h) à la lumière et à 4 °C pour des matrices de 20 µL (*), 75 µL (●) et 138 µL (○).

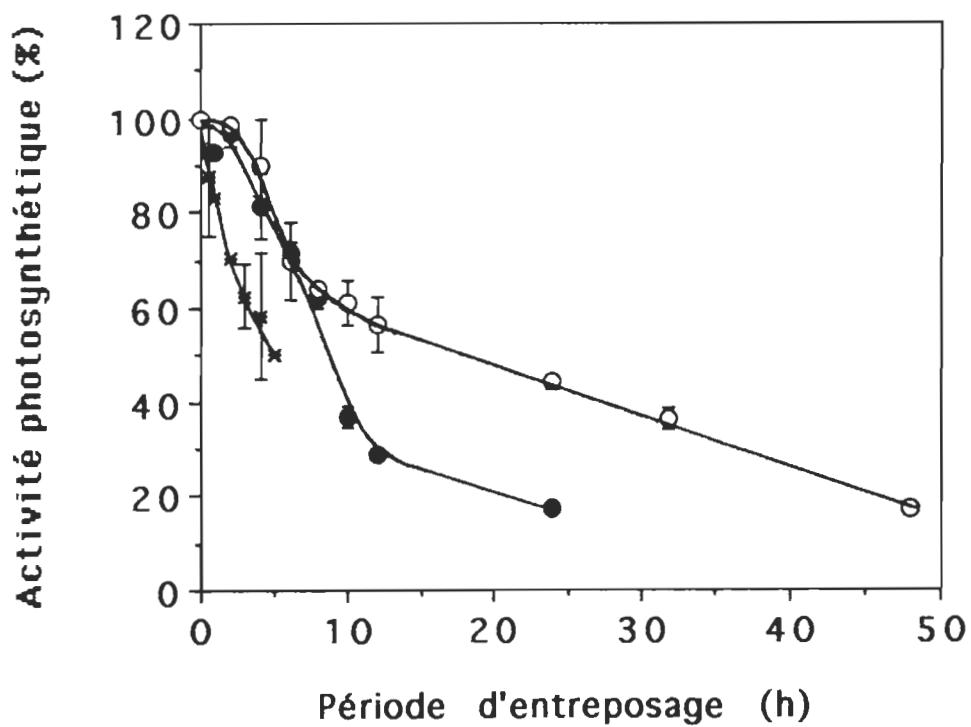


FIGURE 26. Activité photosynthétique (%) en fonction de la période d'entreposage (h) à la lumière et à 22 °C pour des matrices de 20 μL (*), 75 μL (●) et 138 μL (○).

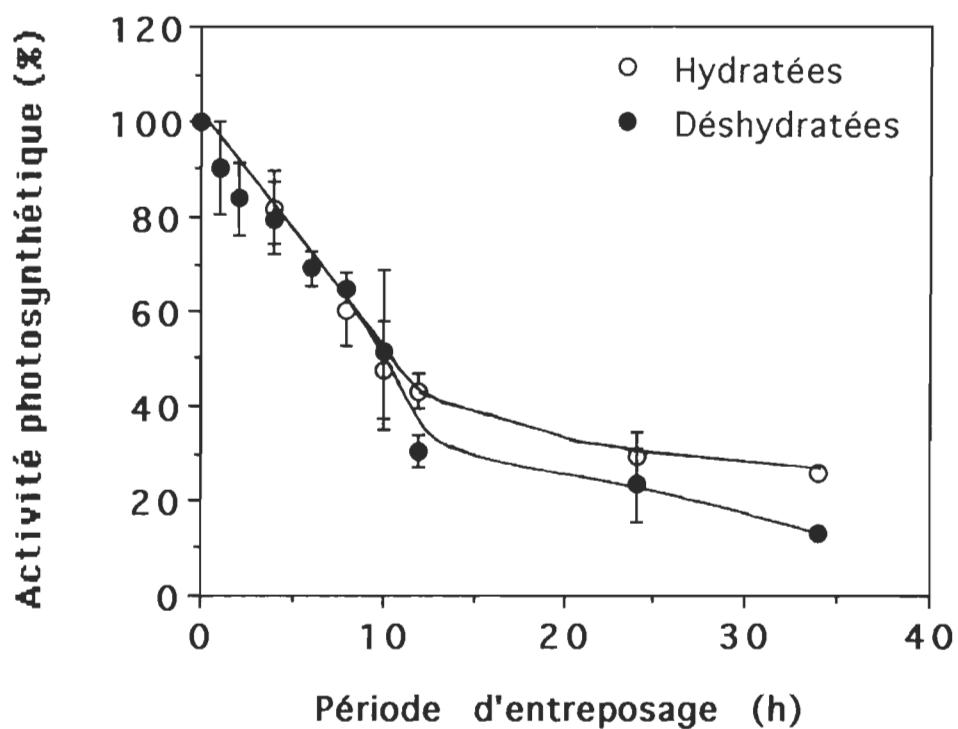


FIGURE 27. Effet de l'hydratation sur l'activité photosynthétique des membranes immobilisées comprenant 11 μg Chl/mL et entreposées à la lumière, à 22 °C

Le tableau 6 regroupe la valeur des I_{50} , c'est-à-dire la concentration de polluant pour laquelle 50% de l'activité photosynthétique est inhibée, pour trois herbicides, deux métaux, un sulfite et un nitrite. Ces valeurs sont obtenues à partir des tracés d'inhibition présentés dans les pages suivantes.

Les valeurs de I_{50} (tableau 6) sont beaucoup plus faibles pour les herbicides que pour les métaux, et encore plus que le sulfite et le nitrite de sodium. Le degré de sensibilité des membranes pour les inhibiteurs dépend de leur accessibilité au site d'inhibition. En effet, le site d'action majeur des herbicides, situé entre Q_A et Q_B (voir section 1.5.1.1) est facile à atteindre puisqu'il se trouve face à la région stromatique (extérieur de thylacoïde) (figure 2). L'accessibilité de la poche de liaison de Q_B pour les herbicides est déterminé par la structure chimique de l'herbicide, spécialement ses dimensions moléculaires, ses charges et son degré d'hydrophobie (Naber, J.D. et Rensen, J.J.S.van, 1991). Les différences au niveau des I_{50} entre les herbicides du tableau 6 sont alors principalement dues à des variations au niveau de leur structure chimique. Pour les métaux, leurs sites d'action étant multiples, certains demeurent moins accessibles que d'autres (voir section 1.5.1.2). Tant qu'au sulfite de sodium, son point d'attaque étant le complexe de dégagement d'oxygène, situé sur le côté luminal (intérieur du thylacoïde), il est beaucoup plus difficile à atteindre pour l'inhibiteur (Beauregard, M., 1991).

Tableau 6

Valeurs du I_{50} pour différents inhibiteurs

Inhibiteurs	I_{50} (μM) membrane native	I_{50} (μM) membrane immobilisée
Herbicides:		
Atrazine	1.8	0.5
Diuron	0.008	0.005
Bromoxynil	7	10
Métaux:		
Mercure	30	60
Cuivre	100	40
Autres:		
Sulfite de sodium	110	230
Nitrite de sodium	4000	5000

3.2.1 Les herbicides

L'atrazine est l'herbicide étudié à titre de représentant de la famille des triazines. La figure 28 démontre que les concentrations d'atrazine détectées se retrouvent entre 9×10^{-9} M et 5×10^{-4} M pour les membranes natives et entre 5×10^{-9} M et 10^{-4} M chez les immobilisées. L'ensemble du tracé met en évidence un meilleur seuil de détection de la part des membranes immobilisées à l'atrazine. Cette meilleure détection peut s'expliquer par le déplacement latéral des centres réactionnels et les réarrangements intramoléculaires de l'ensemble des transporteurs d'électrons, à l'intérieur des membranes thylacoïdiennes, engendrés par le support artificiel (section 3.1.2). Ces changements favorisent probablement davantage l'accessibilité du site de liaison Q_B. Ainsi, cette plus grande accessibilité du site d'inhibition de l'atrazine chez les membranes immobilisées se manifeste par une meilleur capacité de détection de leur part.

Les I₅₀ des membranes natives et immobilisées en présence d'atrazine, inscrits au tableau 6, soit 1.8 et 0.5 μ M respectivement, se situent dans le rang des concentrations induisant 50% d'inhibition chez les algues. En effet, chez les algues, la valeur du Ec₅₀ (concentration inhibant 50% de la croissance et de la photosynthèse), se situent généralement entre 0.04 et 1.0 ppm, correspondant à 0.2 et 4.6 μ M (Stratton, G.W. et Giles, J., 1990). Cette comparaison des résultats prouvent la grande efficacité des membranes immobilisées à détecter de très faibles concentrations d'atrazine.

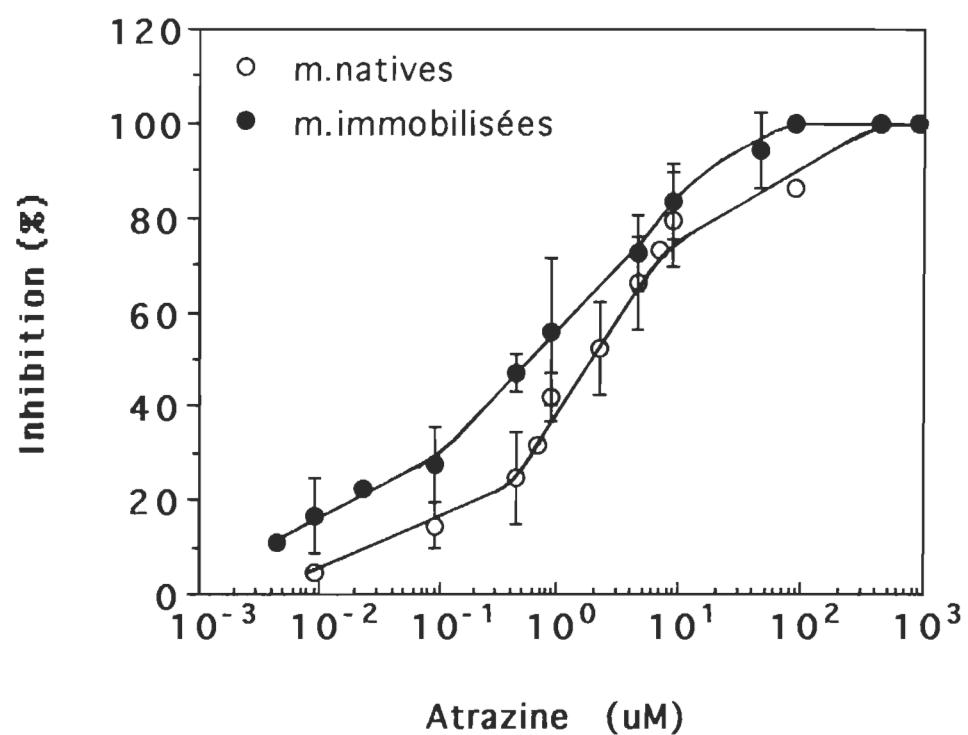


FIGURE 28. Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration d'atrazine.

Comme représentant de la famille des herbicides de type urée, c'est le diuron qui est étudié. Les concentrations de diuron détectées par le biosenseur à base de membranes photosynthétiques immobilisées se situent entre 10^{-9} et 10^{-5} M et entre 10^{-9} et 5×10^{-5} M avec des membranes libres (figure 29). La moyenne des points de chacune des courbes de la figure 29 reflète une meilleure capacité de détection au diuron par les thylacoïdes immobilisés et ce, de façon plus évidente aux concentrations inférieures à $10^{-1} \mu\text{M}$. Etant donné que le site d'inhibition des dérivés urées est le même que celui des dérivés triazines (section 1.5.1.1), la plus grande efficacité des membranes immobilisées à détecter le diuron s'explique alors avec les mêmes arguments que ceux apportés pour l'atrazine.

Tant qu'aux valeurs des I_{50} , en présence de diuron, chez les membranes natives ($0.008 \mu\text{M}$) et immobilisées ($0.005 \mu\text{M}$), elles sont inférieurs à celle obtenue, par le calcul du dégagement d'oxygène, chez Spirodela oligorrhiza en présence de diuron ($0.65 \mu\text{M}$) (Jansen, M.A.K. et al., 1989). Ainsi, le biocapteur de phytotoxicité, tel que proposé, offre également un meilleur rendement de détection au diuron.

Pour vérifier la sensibilité du biosenseur aux composés phénoliques, le bromoxynil est choisi comme exemple. Cet inhibiteur de la photosynthèse est décelé par les membranes libres et immobilisées lorsqu'il est présent à partir de 10^{-9} et 10^{-8} M respectivement (figure 30). Les membranes natives s'avèrent plus efficaces pour révéler la présence de bromoxynil. Le moins bon

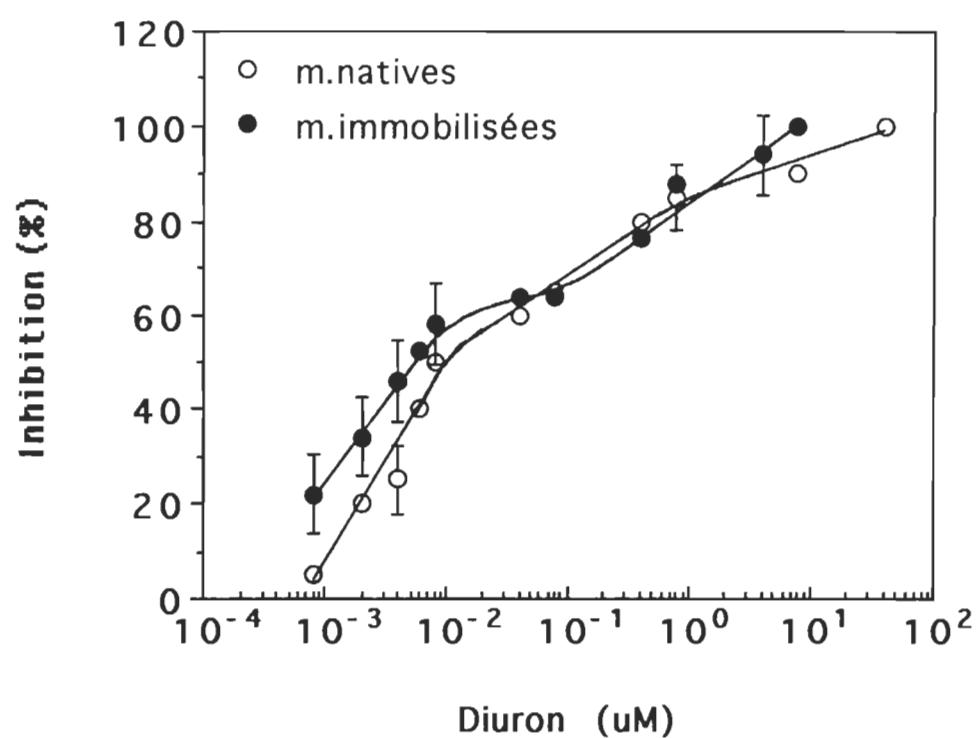


FIGURE 29. Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de diuron.

rendement des membranes immobilisées se justifie par le fait que le BSA prévient l'inhibition du transport d'électrons par les composés phénoliques et non par les autres herbicides (Trebst, A., 1980). La différence provient de l'interaction avec des acides aminés différents dans la poche de liaison (section 1.5.1.1). Les acides aminés auxquels se lient les phénols auraient probablement plus de groupements NH₂ libres, avec lesquels le BSA se lie. Ces liaisons entre les NH₂ libres des acides aminés et le BSA entraîneraient un changement conformationnel, nuisant aux liens éventuels des phénols.

Les I₅₀ des membranes natives (7 µM) et des membranes immobilisées (10 µM), transcrit au tableau 6, se situent dans un même ordre de grandeur que le I₅₀ obtenu chez *Spirodela oligorrhida* (9 µM), en calculant l'inhibition de l'oxygène dégagée en présence de bromoxynil (Jansen, M.A.K. et al., 1989).

3.2.2 Les métaux

A la figure 31, les courbes d'inhibition des membranes natives et immobilisées par le mercure sont tracées. Les concentrations de mercure sont décelées à partir de 10⁻⁸ M et 10⁻⁷ M respectivement. Ainsi, selon la figure 31, les membranes natives découvrent la présence de plus petites quantités de mercure comparativement aux membranes immobilisées. Etant donné la moins grande efficacité des thylacoïdes immobilisés à détecter le mercure et, en considérant que son principal site d'inhibition est le complexe de dégagement

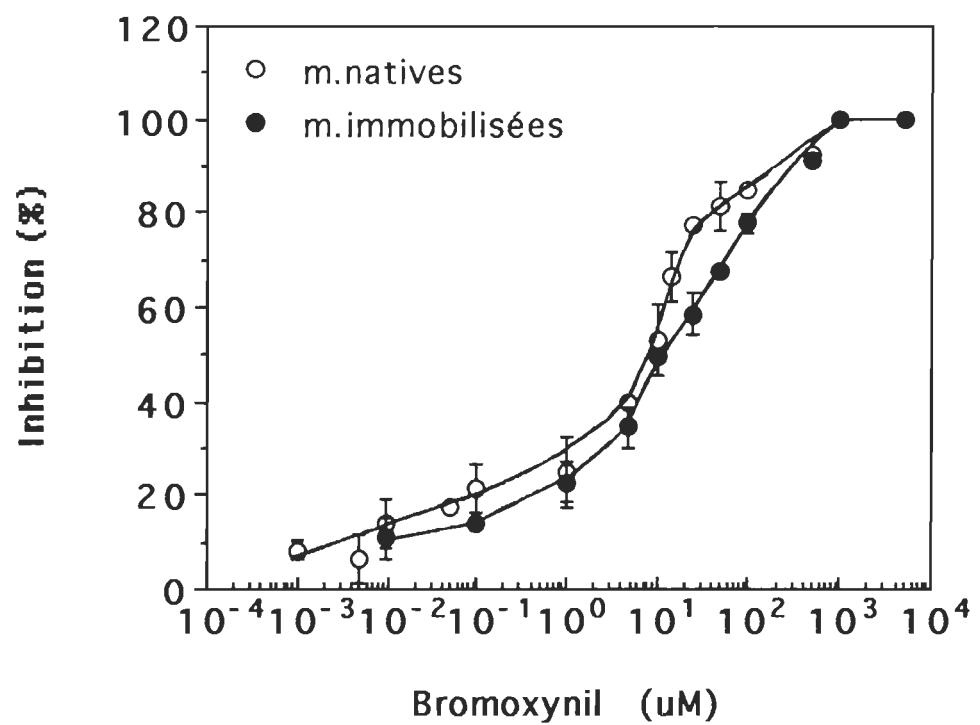


FIGURE 30. Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de bromoxynil.

d'oxygène (section 1.5.1.2), on peut supposer que l'immobilisation des membranes, en engendrant un réarrangement intramoléculaire des transporteurs, favorise l'accessibilité du site QB, tel qu'expliqué précédemment, mais défavorise, par le fait même, l'accessibilité au complexe de dégagement d'oxygène. Cette hypothèse pourrait excuser la moins bonne capacité des membranes immobilisées à déceler le mercure. Notons que la matrice d'immobilisation protège également les thylacoïdes contre le cadmium et le cobalt (Tripathy, B.C. et Mohanty, P., 1981). Une étude réalisée par Gimmler, H. et al., (1991) sur l'effet du HgCl_2 sur la photosynthèse chez des algues, accorde une valeur du I_{50} égale à $60 \mu\text{M}$ pour *Dunaliella parva* et $80 \mu\text{M}$ pour *Dunaliella acidophila* à pH 7. En comparant ces valeurs de I_{50} avec celles obtenues au tableau 6, soit $30 \mu\text{M}$ chez les membranes natives et $60 \mu\text{M}$ chez les immobilisées, la capacité de détection du mercure par les membranes immobilisées est tout de même bonne.

Contrairement au mercure, les membranes immobilisées sont meilleures pour détecter le cuivre que les natives (figure 32). Les concentrations les plus faibles, ayant un effet négatif sur l'activité photosynthétique des thylacoïdes libres et immobilisés sont de 10^{-7} et 10^{-8} M respectivement. La plus grande efficacité des membranes immobilisées à révéler la présence du cuivre peut également s'expliquer en relation avec ses sites d'inhibition (section 1.5.1.2). Le site d'inhibition localisé au complexe de dégagement d'oxygène étant peu accessible selon l'hypothèse soulevé précédemment, il n'en

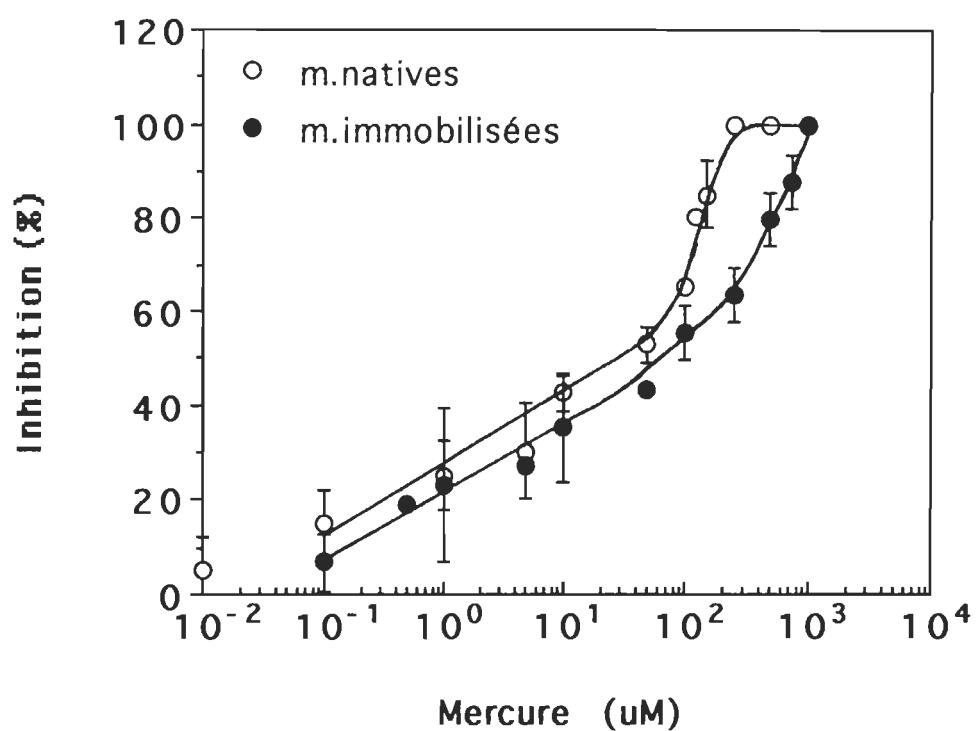


FIGURE 31. Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de mercure

demeure pas moins que les autres sites, comme le centre réactionnel du PSII et Q_B, seraient devenus plus accessibles à l'inhibiteur suite à l'immobilisation. Le meilleur rendement des membranes immobilisées vis-à-vis le cuivre confirme l'hypothèse de l'existence de sites d'inhibition entre le PSII et Q_B, soulevée dans un article de Droppa et Horvath (1990). Les valeurs de I_{50} des thylacoïdes libres et immobilisés sont respectivement de 100 et 40 μM (tableau 6). La comparaison avec la valeur obtenue chez *Dunaliella parva* (8000 μM) à pH 7 en étudiant l'effet du Cu^{2+} sur la photosynthèse démontre l'efficacité supérieure des membranes thylacoïdiennes, tel qu'étudié, à détecter de petites concentrations de cuivre. Toutefois, N. Takamura et al. (1989) mentionnent que le cuivre inhibera plutôt la photosynthèse que les autres fonctions telles la respiration, la formation des pigments ou la division cellulaire dépendamment des espèces d'algues.

3.2.3 Autres polluants

Pour le sulfite de sodium (figure 33), les concentrations sont dépistées à partir de 7.5×10^{-5} pour les thylacoïdes libres et à partir de 10^{-5} pour les immobilisés. Pour le nitrite de sodium (figure 34), les concentrations minimales engendrant une inhibition sont de 5×10^{-4} M pour les thylacoïdes libres et de 10^{-4} M pour les immobilisés. L'ensemble des courbes démontrent un seuil de détection inférieur pour les membranes natives. Toutefois, en présence de nitrite de sodium (figure 34), le démarquage est beaucoup moins prononcé.

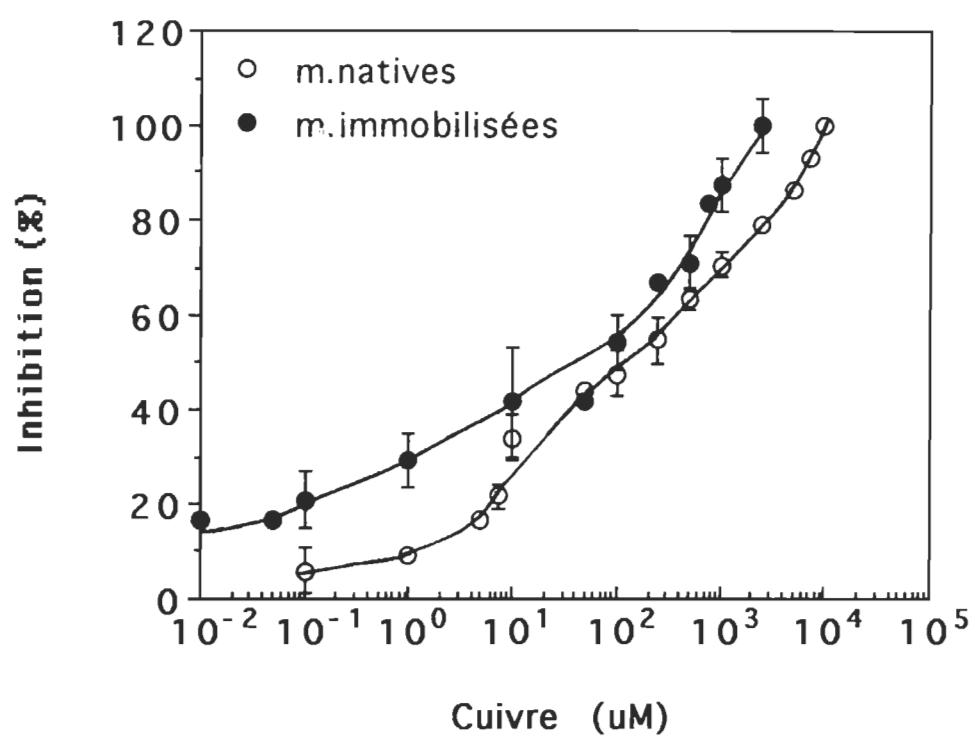


FIGURE 32. Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de cuivre.

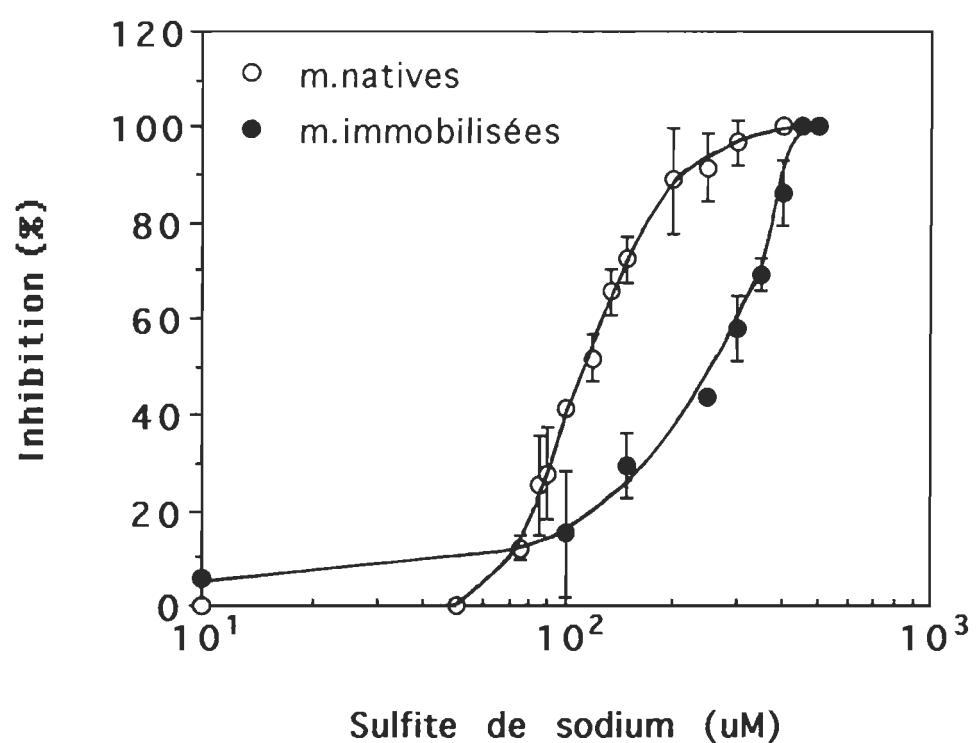


FIGURE 33. Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de sulfite de sodium.

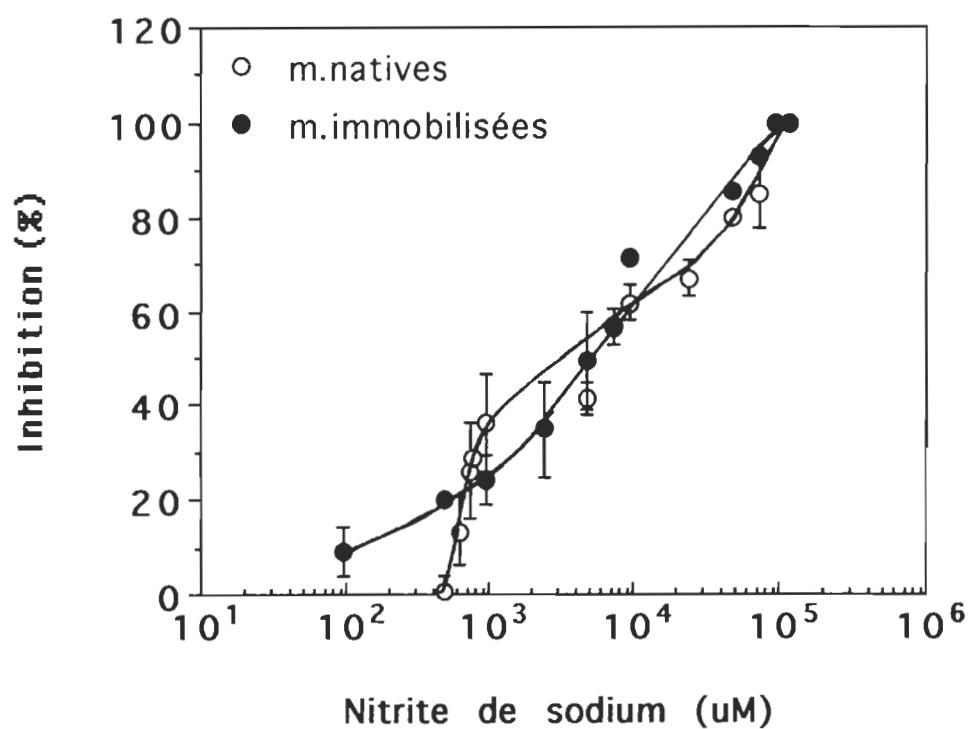


FIGURE 34. Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de nitrite de sodium.

Puisque le site d'inhibition des oxydes de soufre est au complexe de dégagement d'oxygène (Beauregard, M., 1991) et que les membranes natives sont de meilleures détecteurs pour ces inhibiteurs que les membranes immobilisées, comme dans le cas du mercure, cela vient renforcer l'hypothèse voulant que l'immobilisation défavorise l'accessibilité au complexe de dégagement d'oxygène suite aux changements conformationnels engendrés (section 3.2.2). Cette hypothèse justifie alors le moins bon rendement des membranes immobilisées pour déceler le sulfite de sodium. La moins grande capacité des membranes immobilisées à détecter de très petites concentrations de sulfite de sodium et de nitrite de sodium s'explique également par la barrière de diffusion que la matrice impose à ces composés (figure 40). Pour ces inhibiteurs, une période d'incubation de 10 min en présence de membranes immobilisées n'est pas suffisante alors qu'elle l'est pour des membranes natives (figure 39).

3.3 Temps d'incubation

Les courbes des figures 28 à 34 sont réalisées après 10 min d'incubation. Pour vérifier l'influence du temps d'incubation, une étude comparative entre 5, 10 et 15 min d'incubation est réalisée en présence d'une concentration d'inhibiteur s'approchant de leur I_{50} respectif obtenue après 10 min d'incubation.

En comparant le temps d'incubation, chez les thylacoïdes libres en présence d'herbicides (figure 35), on s'aperçoit qu'un temps d'incubation de 5 min n'est pas suffisant pour atteindre le maximum d'inhibition pour le diuron et le bromoxynil. Au contraire avec l'atrazine, le même pourcentage d'inhibition est obtenu après 5, 10 et 15 min. Chez des membranes immobilisées (figure 36), on remarque que pour le bromoxynil, après 5 min d'incubation, la moitié du pourcentage d'inhibition n'est même pas encore atteinte. Pour le diuron et l'atrazine, la différence entre 5 et 10 min est beaucoup moindre. L'ensemble de ces résultats obtenus avec les herbicides démontre la nécessité d'un temps d'incubation de 10 min. Une incubation de 5 min supplémentaires n'apporte rien de plus.

Les herbicides atteignent QB via les lipides ou la partie externe de la protéine D₁, près du stroma. Alors, les différences au niveau du temps requis pour chaque herbicide s'expliquent par différentes étapes limitant le processus de diffusion ou de liaison (Ducruet, J.M. et al., 1990).

Pour des métaux en présence de membranes natives (figure 37), on remarque également qu'autant pour le cuivre que pour le mercure, 10 min d'incubation est suffisant. Notons la différence remarquable, pour le mercure, après 5 min d'incubation comparativement à 10 et 15 min. Ces résultats supposent une plus grande difficulté de diffusion de la part du mercure. Chez les membranes immobilisées (figure 38), les mêmes résultats qu'avec les thylacoïdes libres s'observent. Toutefois,

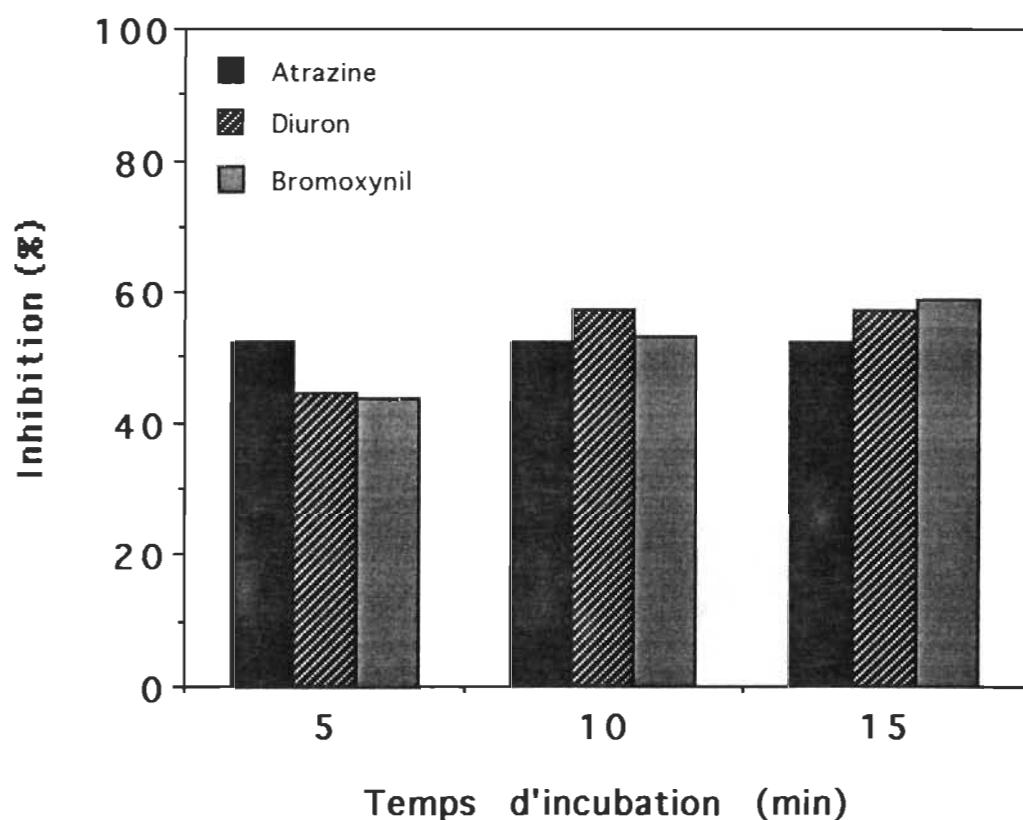


FIGURE 35. Influence du temps d'incubation chez des membranes natives en présence de 2.5×10^{-6} M d'atrazine, 5×10^{-6} M de diuron et 10^{-5} M de bromoxynil.

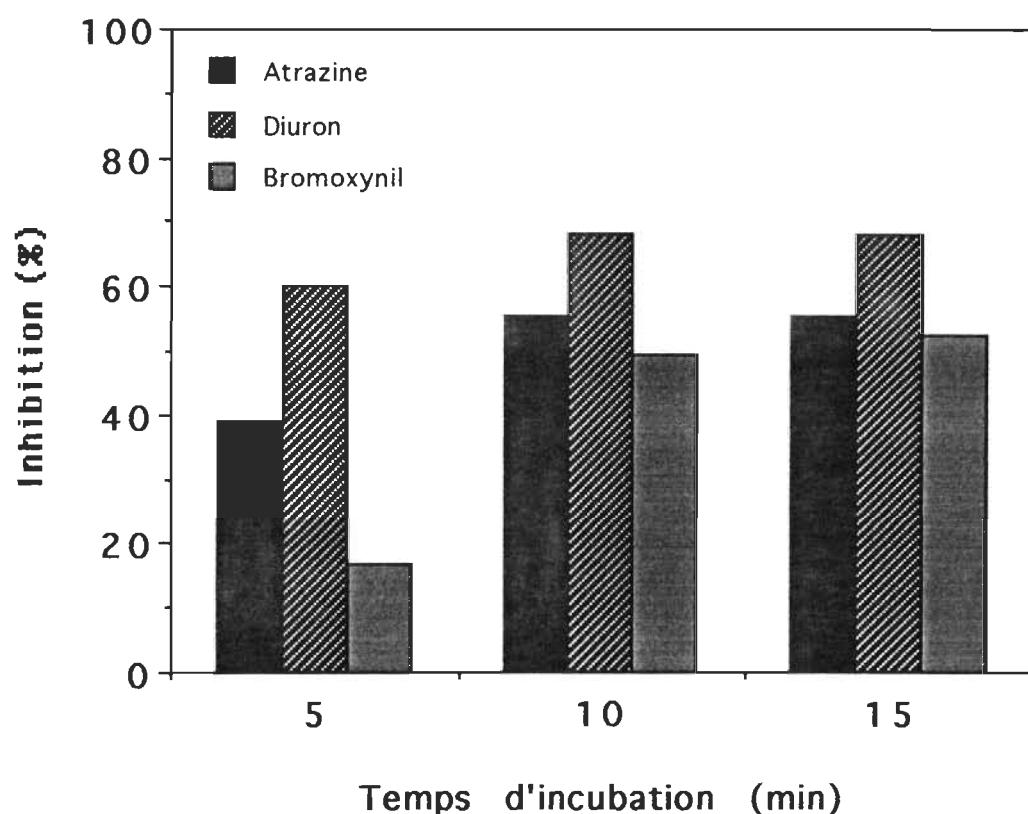


FIGURE 36. Influence du temps d'incubation chez des membranes immobilisées en présence de 10^{-6} M d'atrazine, 5×10^{-7} M de diuron et 10^{-5} M de bromoxynil.

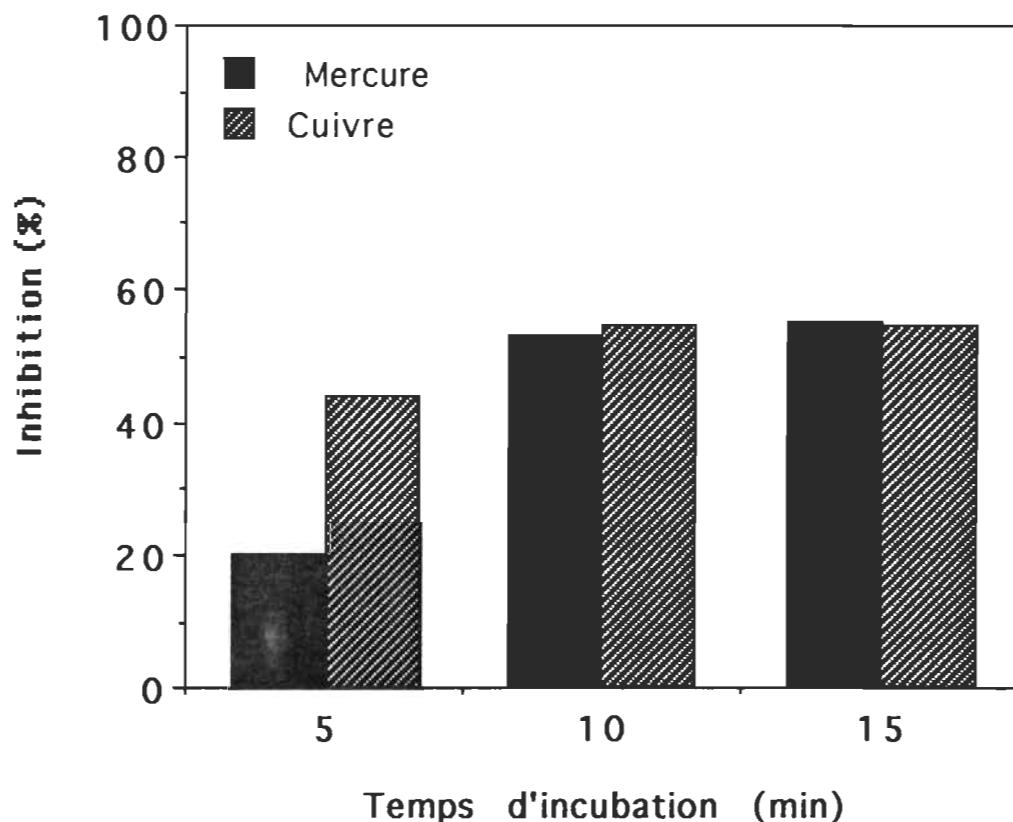


FIGURE 37. Influence du temps d'incubation pour des membranes libres en présence de 5×10^{-5} M de mercure et de 2.5×10^{-4} M de cuivre.

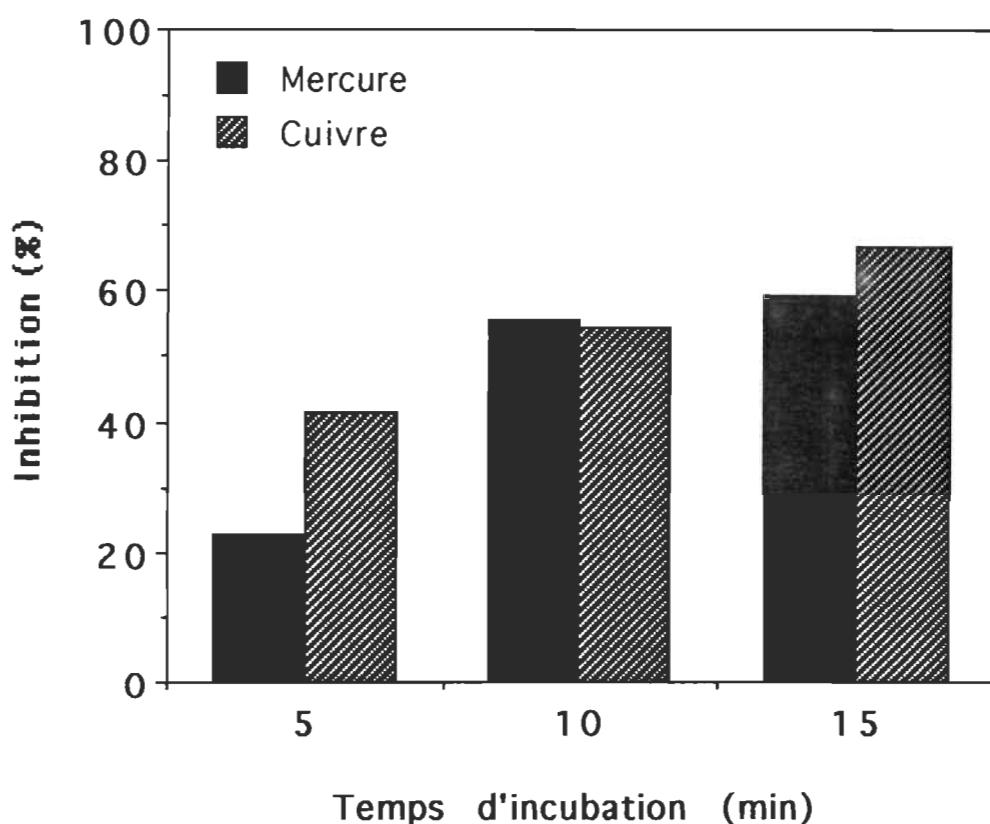


FIGURE 38. Influence du temps d'incubation pour des membranes immobilisées en présence de 10^{-4} M de mercure et de cuivre.

en présence de cuivre et de membranes immobilisées, un temps d'incubation de 15 min apporte un plus haut pourcentage d'inhibition comparativement à 10 min. On peut alors supposer que la matrice d'immobilisation impose une barrière plus grande au cuivre qu'au mercure.

Pour les autres polluants en présence de membranes libres (figure 39), on peut conclure que pour le nitrite de sodium, 10 min d'incubation est le temps approprié tandis que pour le sulfite de sodium, une période d'incubation de 5 min suffit. Le sulfite de sodium diffuse alors plus facilement que le nitrite de sodium.

En présence de thylacoïdes immobilisés (figure 40), une période de 10 min d'incubation ne s'avère pas le temps optimal pour les deux composés puisque 5 min supplémentaires apportent, dans les deux cas, une légère augmentation du pourcentage d'inhibition. Ainsi, la matrice d'immobilisation imposerait également une barrière de diffusion au nitrite de sodium et au sulfite de sodium.

3.4 Inhibition par des échantillons industriels

En général, plusieurs polluants sont présents dans un environnement aquatique pollué. Cette réalité suscite la nécessité d'étudier l'effet combiné de différents polluants. Pour ce faire, deux échantillons industriels dont les contenus furent analysés par une entreprise de la région, ont été mis en contact avec le biosenseur. La

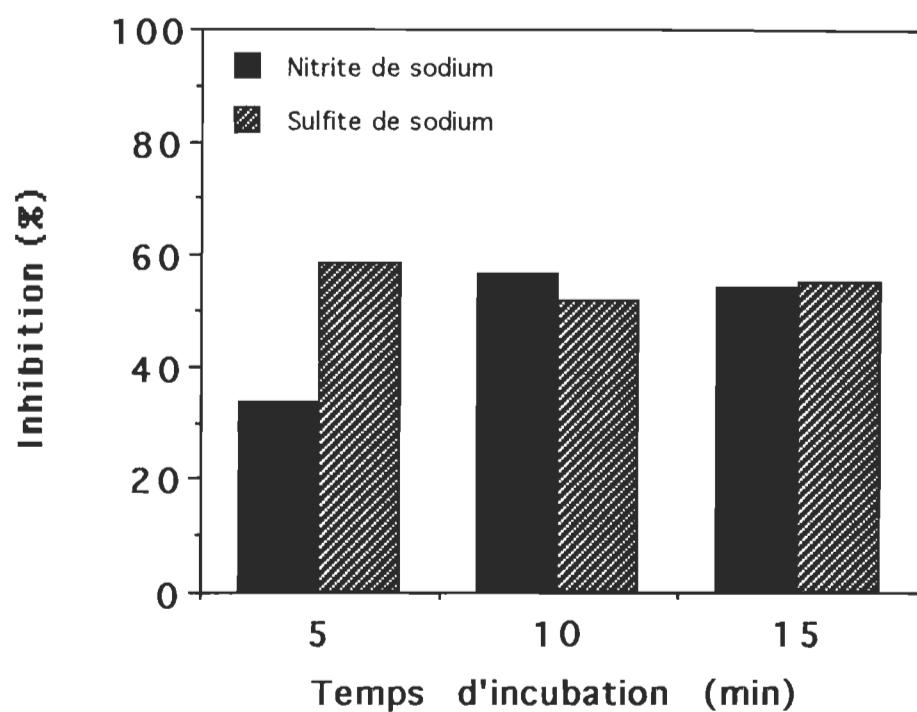


FIGURE 39. Influence du temps d'incubation pour des membranes natives en contact avec 7.5×10^{-3} M de nitrite de sodium et 1.2×10^{-4} M de sulfite de sodium.

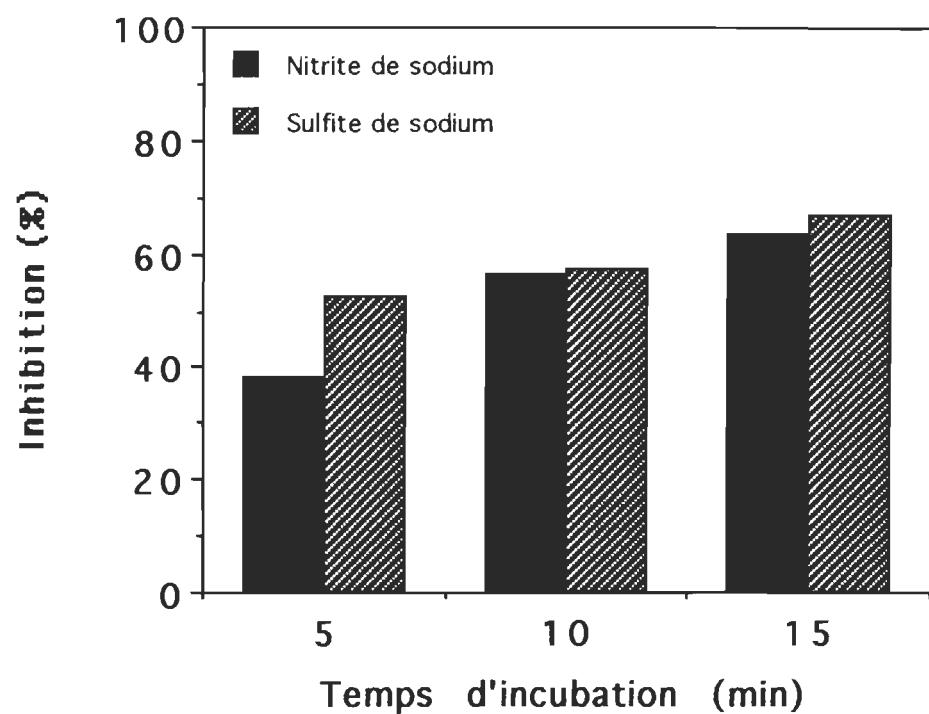


FIGURE 40. Influence du temps d'incubation pour des thylacoïdes immobilisés en contact avec 7.5×10^{-3} M de nitrite de sodium et 3×10^{-4} M de sulfite de sodium.

liste des paramètres analysés ainsi que leur concentration respective pour les deux solutions sont transcrits au tableau 7.

Les courbes d'inhibition pour les échantillons #1 et #2 sont tracées aux figures 41 et 42 respectivement. Pour l'échantillon #1, le I_{50} est atteint lorsque qu'il est présent à une concentration de 1.5 % v/v dans la cellule à dégagement d'oxygène. A l'opposé, pour l'échantillon #2, 50% du contenu de la cellule doit être composé de l'échantillon pour avoir 50% d'inhibition, en présence de membranes libres. Avec des membranes immobilisées, ce pourcentage augmente à 70%. L'échantillon #1 semble alors beaucoup plus toxique que l'échantillon #2.

La plus faible toxicité de la solution #2 peut être attribuée, entre autres, à la présence d'une plus grande concentration de calcium. En effet, le calcium protège l'appareil à dégagement d'oxygène contre l'effet inhibiteur de plusieurs toxiques. Par exemple, Rashid et al. (1991) ont démontré que les ions calcium préviennent l'inhibition des PSII par le zinc. De plus, le calcium joue un rôle structurel lors de l'oxydation de l'eau (section 1.4.2.3). De par ce rôle, il est généralement admis que le calcium stimule la photosynthèse (Ghanotakis, D.F., 1990). A la figure 42, on note une plus grande stimulation engendrée par le calcium chez les membranes libres que chez les immobilisées. Ces résultats laissent croire que le calcium a de la difficulté à diffuser à travers la matrice d'immobilisation.

Tableau 7

Paramètres analysés pour deux échantillons industriels

Paramètre analysé	Echantillon #1	Echantillon #2
Zn (mg/L)	0.083	4.155
Cu (mg/L)	0.047	0.084
Cr (mg/L)	0.050	0.064
Pb (mg/L)	0.050	0.109
Cd (mg/L)	0.019	0.026
Al (mg/L)	123	80
Na (mg/L)	2063	1370
Hg (μ g/L)	0.55	0.61
CN total (mg/L)	----	----
SD (mg/L)	6329	5062
SS (mg/L)	136/137	652
ST (mg/L)	7133	5746
pH	10.86	8.65
Ca (mg/L)	24	161
As (mg/L)	0.110	0.022
SO ₄ (mg/L)	3218	2508
F (mg/L)	105	80
CO ₃ (mg/L)	----	----

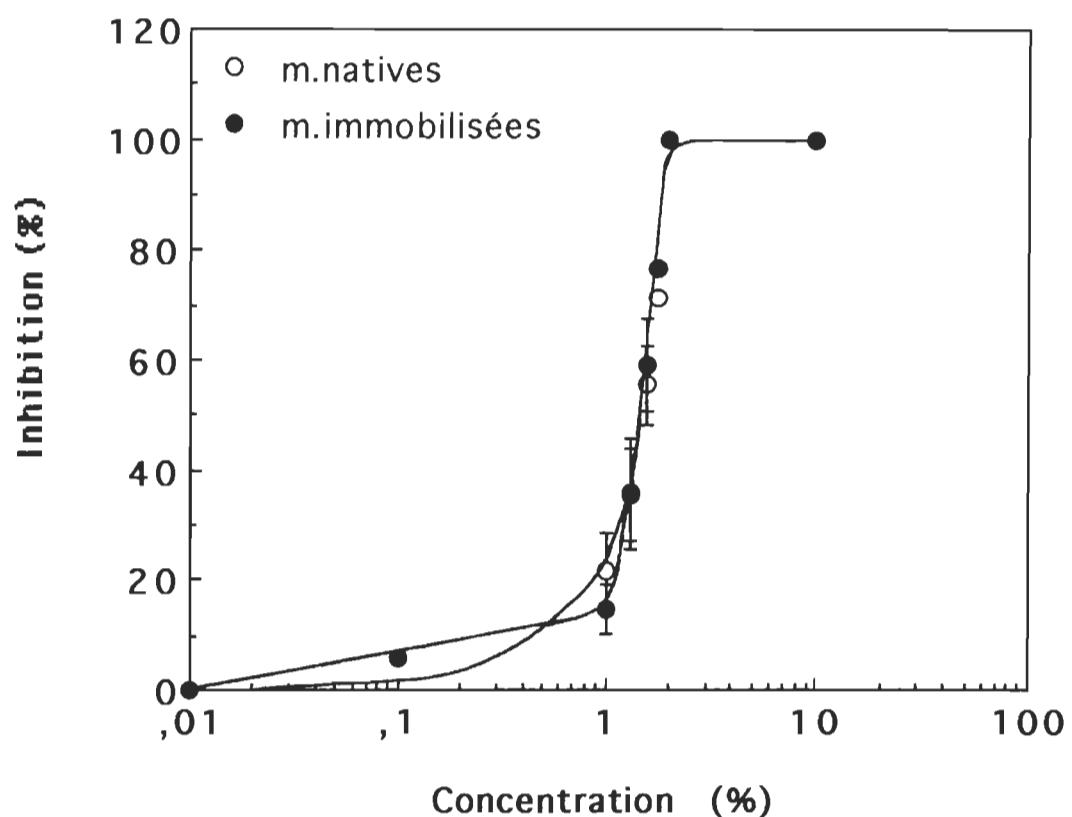


FIGURE 41. Effet inhibiteur de l'échantillon industriel #1 sur le dégagement d'oxygène.

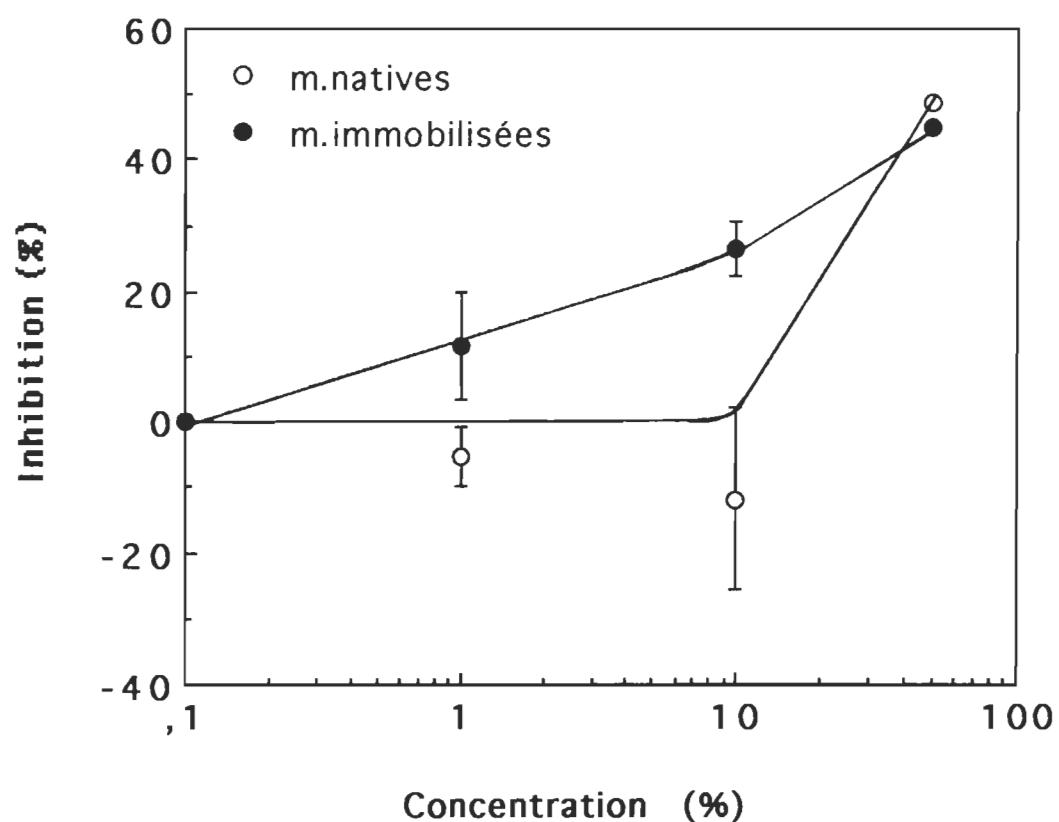


FIGURE 42. Effet inhibiteur de l'échantillon industriel #2 sur l'activité photosynthétique.

D'autre part, D.F. Ghanotakis (1990) a également découvert une compétition entre les ions sodium et calcium. Ainsi, la plus grande concentration d'ions sodium dans l'échantillon #1 empêcherait l'effet stimulateur du calcium qui d'ailleurs, est présent en moins grande quantité dans cette solution. La plus grande toxicité de l'échantillon #1 pourrait alors s'expliquer par cette compétition entre les ions sodium et calcium. Etant donné la similarité des courbes entre les membranes libres et immobilisées à la figure 41, on peut également supposer que le sodium diffuse facilement à l'intérieur de la matrice.

Les matières organiques dissoutes et en suspension peuvent également affecter la biodisponibilité des polluants et, par le fait même, leur toxicité (McCarthy, J.F. et Bartell, S.M., 1988).

3.5 Influence de la concentration en Chl sur l'inhibition

Comme abordé à la section 3.1.2, le seuil de détection du biocapteur de phytotoxicité devrait être plus bas vis-à-vis de très petites quantités de produits toxiques s'il renferme la plus petite concentration en Chl possible.

Les figures 43 et 44 démontrent effectivement ce principe lors de l'inhibition par l'atrazine et le cuivre respectivement, en fonction de la concentration en Chl, chez des membranes libres et immobilisées. Dans les deux graphiques, la façon dont les thylacoïdes sont immobilisés ne semble pas jouer un rôle très significatif.

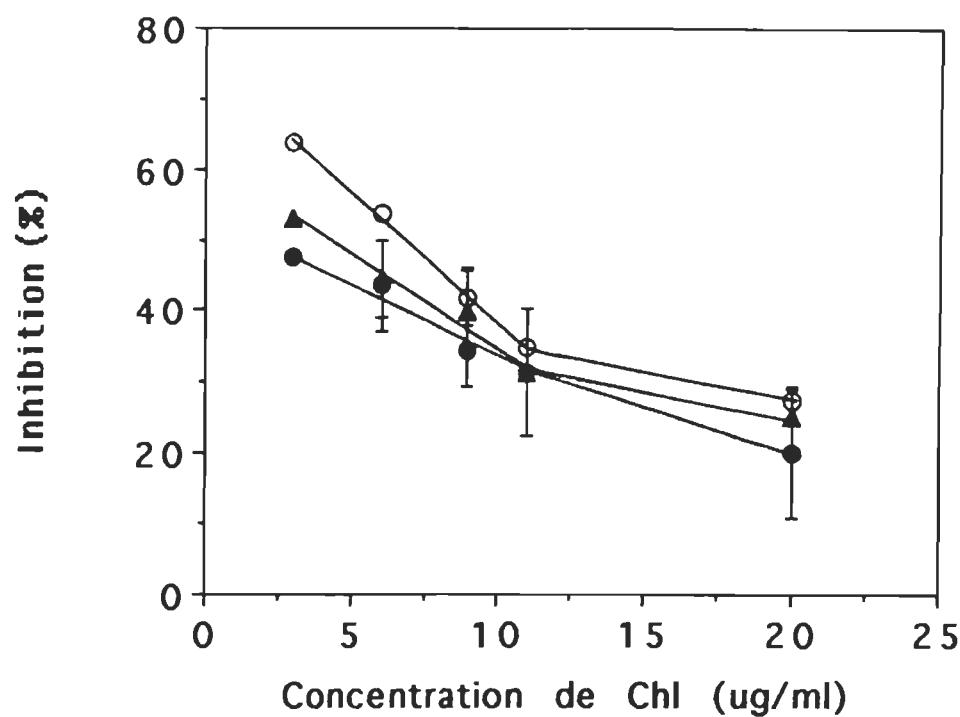


FIGURE 43. Effet de la concentration en Chl sur la sensibilité des membranes natives à 67.5×10^{-8} M d'atrazine (○) et des membranes immobilisées où le rapport de Chl/BSA est d'une part constant (▲) et d'autre part variable (●) à 9×10^{-8} M d'atrazine.

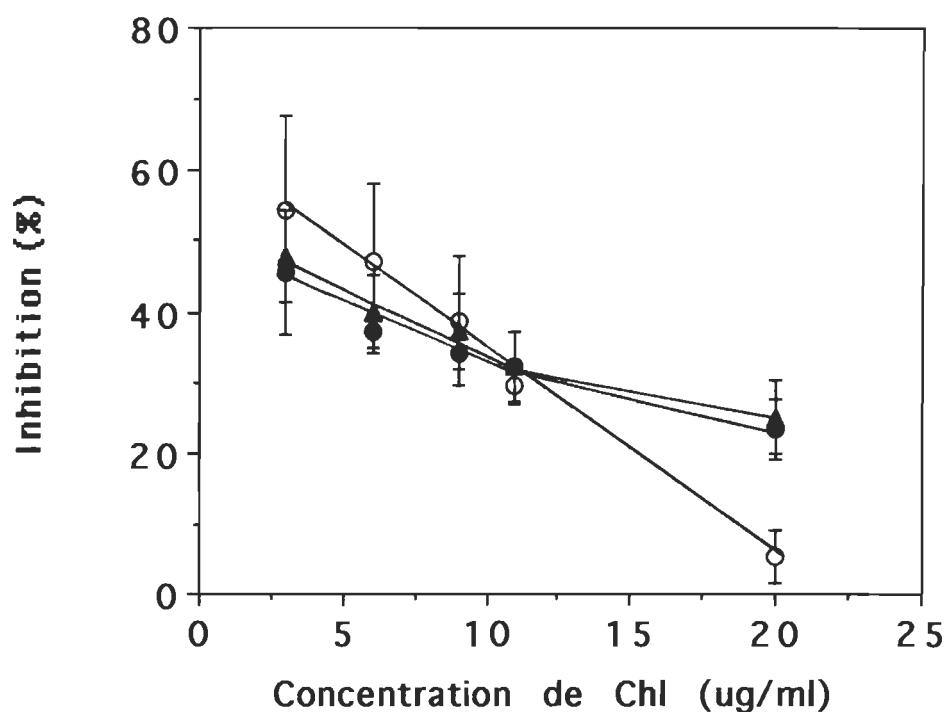


FIGURE 44. Effet de la concentration en Chl sur la sensibilité des membranes natives (○) à 10^{-5} M de cuivre et des membranes immobilisées où le rapport de Chl/BSA est d'une part constant (▲) et d'autre part variable (●), à 10^{-6} M de cuivre.

En présence de membranes natives, une diminution de la concentration de Chl de 11 $\mu\text{g}/\text{mL}$ à 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ entraîne une augmentation du pourcentage d'inhibition par l'atrazine de 30% (figure 43) comparativement à seulement 20% par le cuivre (figure 44).

D'autre part, une augmentation de la concentration de 11 $\mu\text{g}/\text{mL}$ à 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ provoque une diminution du pourcentage d'inhibition par l'atrazine de 10% (figure 43) comparativement à 30 % en présence de cuivre (figure 44).

Ces différences peuvent probablement s'expliquer par la plus grande diversité des sites d'inhibition du cuivre. En effet, une même membrane thylacoïdienne peut être inhibée par plusieurs molécules de cuivre en plusieurs endroits au niveau de la chaîne de transport d'électrons. Toutefois, une seule molécule de cuivre inhibant en un site suffit pour inhiber la photosynthèse. En plus d'être inutiles, les autres molécules de cuivre, sur d'autres sites d'inhibition, ne sont plus disponibles pour inhiber d'autres thylacoïdes présents dans le milieu.

À faible concentration de Chl, la probabilité qu'un seul site d'inhibition soit occupé par le cuivre sur chaque thylacoïde est moins grande qu'avec de l'atrazine se liant spécifiquement en un seul endroit (Q_B). Ceci peut expliquer la plus faible augmentation de la capacité de détection du cuivre pour des petites concentrations de Chl (20%) comparativement à l'atrazine (30%).

Pour de fortes concentrations de Chl, l'efficacité médiocre des membranes natives à détecter le cuivre peut s'expliquer, en plus de la grande diversité de ses sites d'inhibition, par la possibilité d'agrégations non spécifiques du cuivre sur les membranes libres et/ou par des interactions électrostatiques aléatoires. Ces agrégations et/ou ces interactions, engendrées par la non spécificité du cuivre le rendent beaucoup moins disponible pour inhiber les membranes photosynthétiques.

En présence de membranes immobilisées, la variation du pourcentage d'inhibition pour différentes concentrations de Chl est similaire que ces dernières soient en contact avec de l'atrazine ou du cuivre (figure 43 et 44). Il en est ainsi puisque le BSA balancerait les forces électrostatiques et empêcherait l'agrégation non spécifique du cuivre avec les membranes à cause de leur accessibilité rendue moins facile suite à l'immobilisation. De plus, on a démontré que l'immobilisation défavoriserait l'accessibilité au complexe de dégagement d'oxygène. Ceci a alors pour conséquence de diminuer le nombre de site d'inhibition potentiel du cuivre.

3.6 Influence de la température sur l'inhibition

La tolérance aux fluctuations de température est un important indice de stabilité. La température est un facteur important contrôlant le taux de photosynthèse chez les plantes. Le taux de photosynthèse

augmente jusqu'à la température optimale, au-delà de laquelle il décline rapidement (Davison, I.R., 1991). Il est probable qu'une diminution de la température entraîne un changement au niveau de la fluidité membranaire, défavorisant l'efficacité du transport d'électrons. Ces changements affecteraient particulièrement le PSII puisqu'il est l'élément le plus thermolabile de l'appareil photosynthétique (Davison, I.R., 1991). A des températures supérieures à l'optimale, il est la cause d'une diminution du rendement photosynthétique.

La figure 45 démontre le niveau de tolérance aux fluctuations des températures des thylacoïdes libres et immobilisés. L'augmentation de la tolérance chez les préparations immobilisées y est clairement démontrée. Les membranes immobilisées sont particulièrement stables entre 20 et 35 °C. Pour les membranes natives, on observe une augmentation de l'activité photosynthétique jusqu'à 30 °C. Pour des températures supérieures, c'est effectivement le déclin.

Les figures 46 et 47 présentent les courbes d'inhibition par l'atrazine et le cuivre en fonction des fluctuations de température. Chez les membranes libres, les changements au niveau de la fluidité membranaire provoqués par des températures inférieures à la température optimale, tel que déjà proposé, affectent le pourcentage d'inhibition engendré par le cuivre (figure 47) et non par l'atrazine (figure 46). En effet, la figure 47 démontre la moins grande capacité

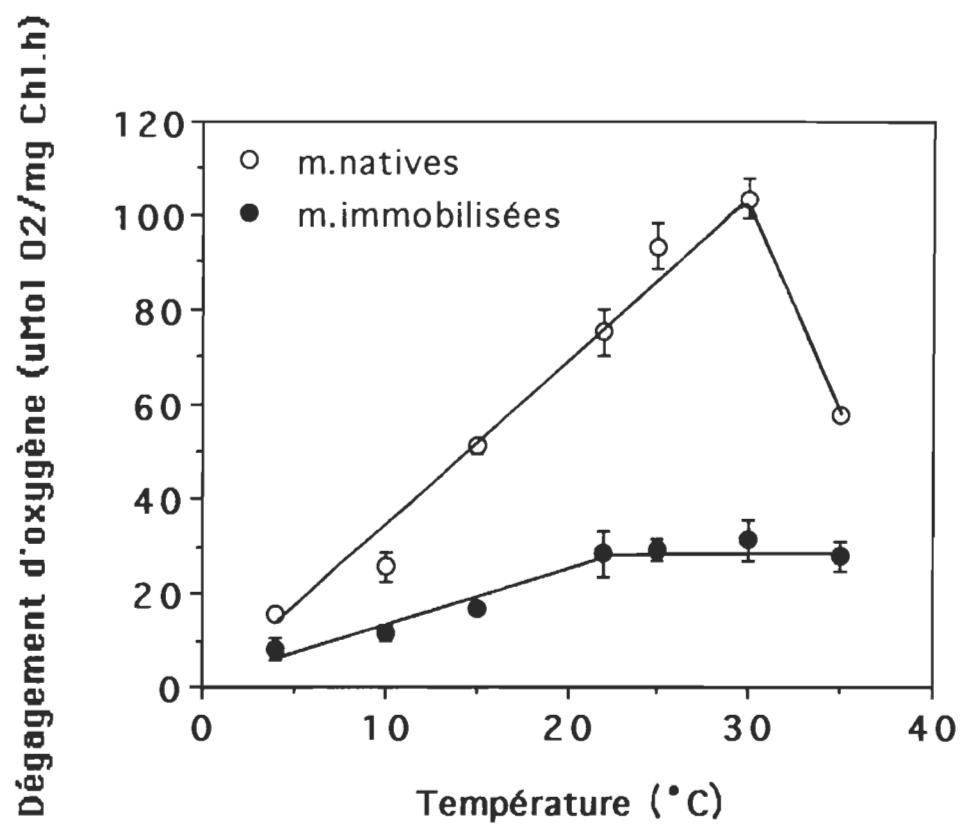


FIGURE 45. Influence de la température sur l'activité photosynthétique.

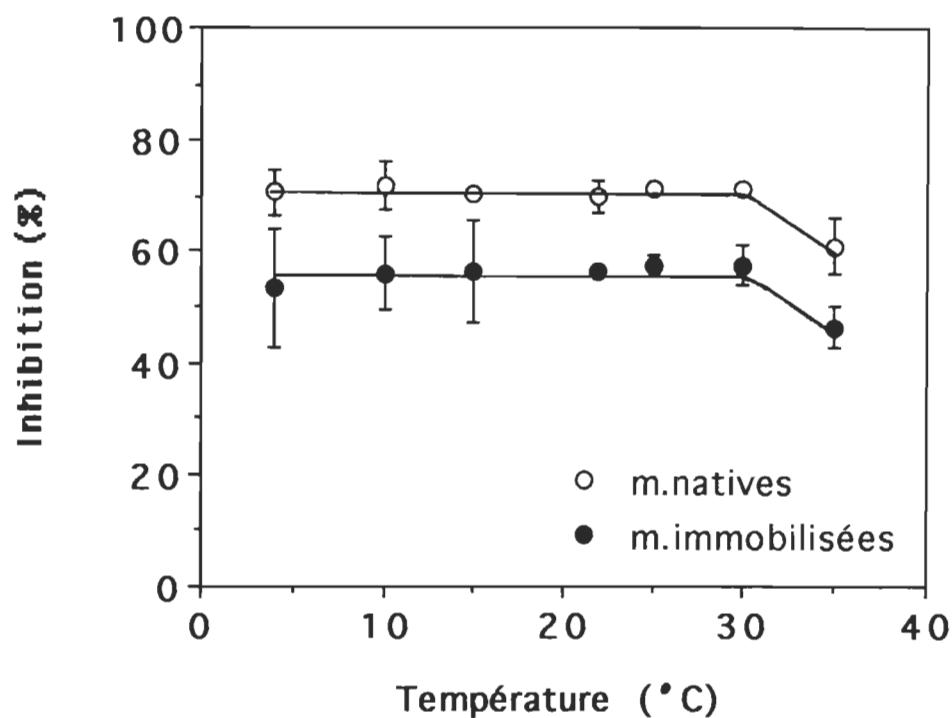


FIGURE 46. Influence de la température sur le pourcentage d'inhibition par l'atrazine: 22.5×10^{-7} M chez les membranes natives et 9×10^{-7} M chez les immobilisées.

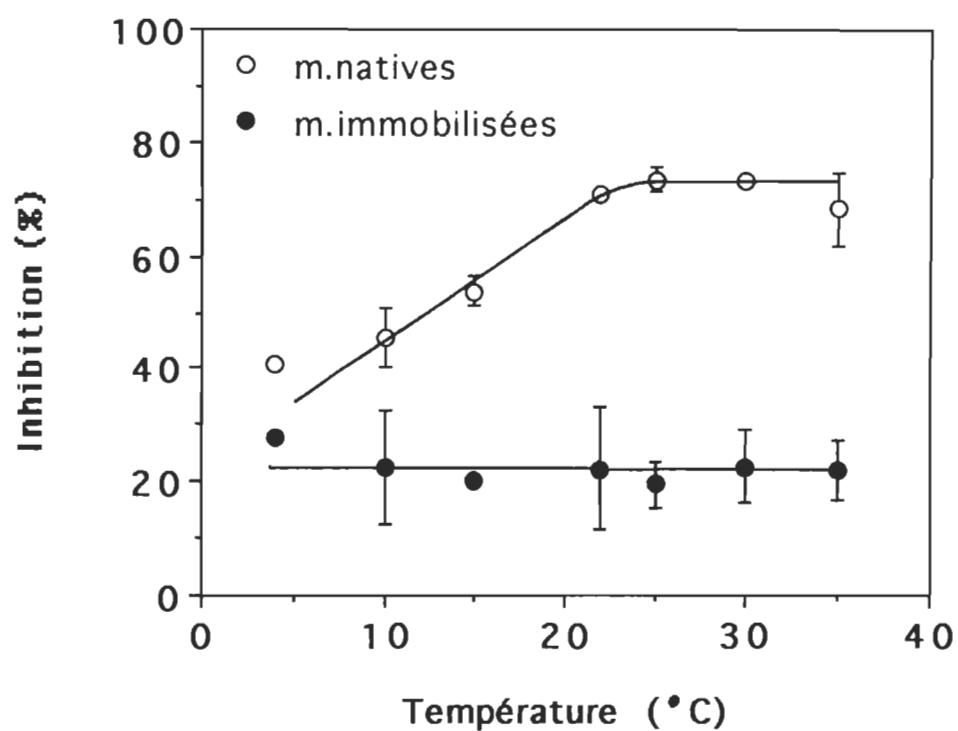


FIGURE 47. Influence de la température sur le pourcentage d'inhibition par le cuivre: 2.5×10^{-4} M chez les membranes natives et 10^{-4} M chez les immobilisées.

des thylacoïdes libres à détecter le cuivre, à de basses températures.

Ce résultat peut s'expliquer en admettant que les changements au niveau de la fluidité membranaire à de basses températures affecteraient l'accessibilité du cuivre à ses sites d'inhibition et non celle de l'atrazine. Ce problème ne se présente pas chez les membranes immobilisées puisque l'immobilisation protège les membranes contre les fluctuations de températures (figure 45).

Des études supplémentaires avec d'autres polluants seraient toutefois nécessaires pour savoir si l'on peut toujours utiliser les membranes immobilisées comme biocapteur sans se soucier des fluctuations de températures.

3.7 Influence du pH sur l'inhibition

La figure 48 démontre que le pH optimal des membranes libres est de 7.0 tandis que celui des thylacoïdes immobilisés est de 6.0. Le ratio de l'oxygène dégagée à pH 4.0 et à pH optimal (pH 7.0) est plus élevé chez les fragments membranaires libres (12.0) qu'avec les immobilisés (2.5) où le pH optimal est de 6.0. Ceci démontre la grande protection apportée par l'immobilisation aux fluctuations de pH.

La forte inhibition du transport d'électrons à des pH basiques serait engendrée par une inactivation du complexe de dégagement d'oxygène. Ceci serait attribué au fait que les hauts pH externes affectent le pH interne (à l'intérieur des thylacoïdes). Et, c'est ce nouveau pH interne qui inactive le complexe de dégagement d'oxygène

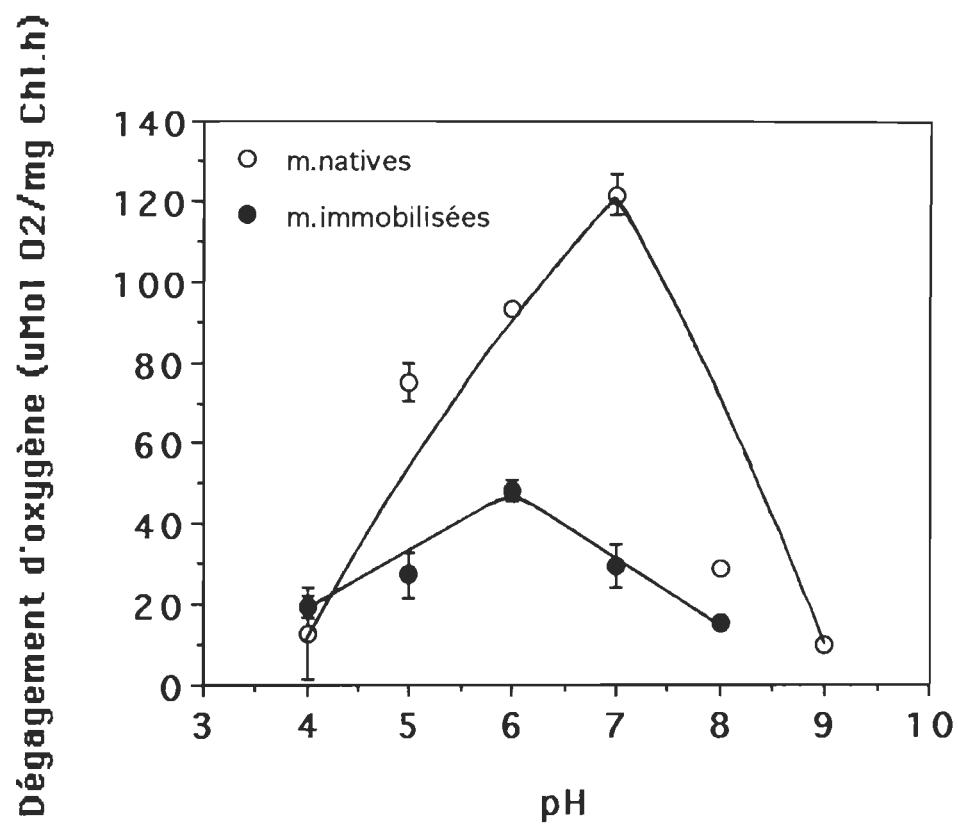


FIGURE 48. Influence du pH sur l'activité photosynthétique.

(Trebst, A., 1980).

Les figures 49 et 50 démontrent l'inhibition par l'atrazine et le cuivre respectivement en fonction du pH. Le pourcentage d'inhibition par l'atrazine est affecté par les pH inférieurs à 6 et ce, autant en présence de membranes natives qu'immobilisées. Giardi, M.T. et al. (1989) ont obtenu des résultats similaires, soit une diminution de l'affinité de l'atrazine pour son site d'inhibition à des pH inférieurs à 5.5. Selon cette équipe de chercheurs, il est bien connu que les molécules d'atrazine ne sont pas stables à ces pH puisqu'elles se transforment facilement en hydroxy-atrazine. L'hydroxy-atrazine est un métabolite non toxique pour les thylacoïdes. Il provient de la dégradation de produits d'atrazine (Giardi, M.T. et al., 1989).

En présence du cuivre, le pourcentage d'inhibition est encore plus touché par les variations de pH comparativement à l'atrazine. Ce phénomène pourrait s'expliquer de la même manière qu'avec l'atrazine. Probablement que les molécules de cuivre forment, entre pH 4 et 9, des complexes non toxiques pour les thylacoïdes avec des contre ions. Par exemple, à partir de pH 6.4, le cuivre se complexe en $\text{Cu}(\text{OH})_2$ (Ringbom, A., 1967).

La diminution du pourcentage d'inhibition présente à des pH supérieurs à 6.0 (figure 50) peut également se justifier par l'inactivation du complexe de dégagement d'oxygène à pH basique, tel

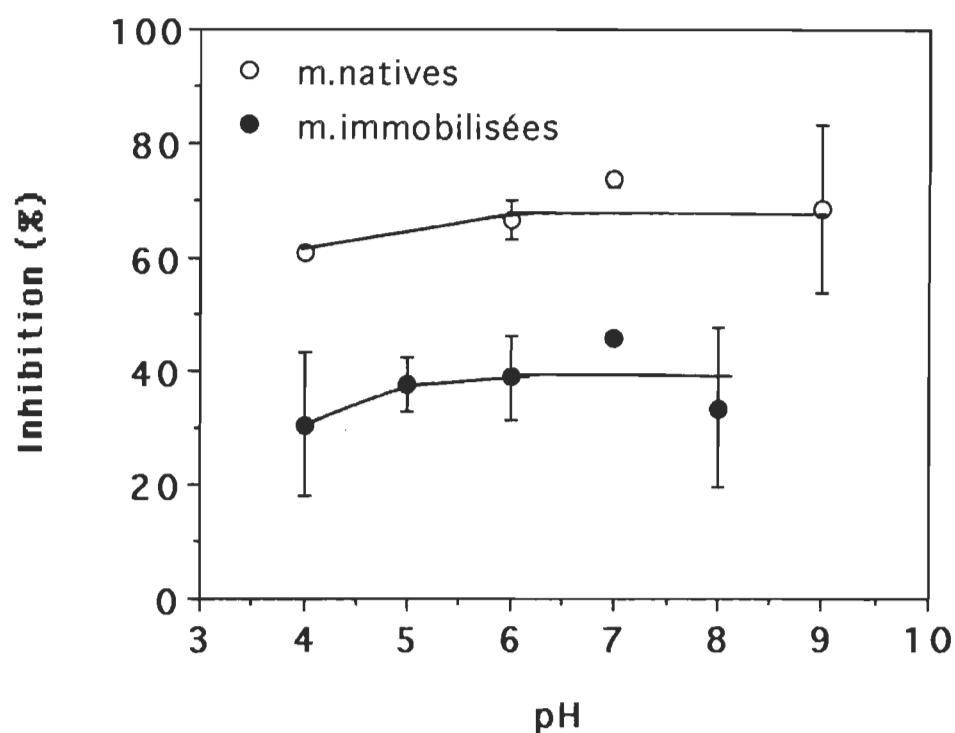


FIGURE 49. Influence du pH sur le pourcentage d'inhibition par l'atrazine: 22.5×10^{-7} M chez les membranes natives et 9×10^{-7} M chez les immobilisées.

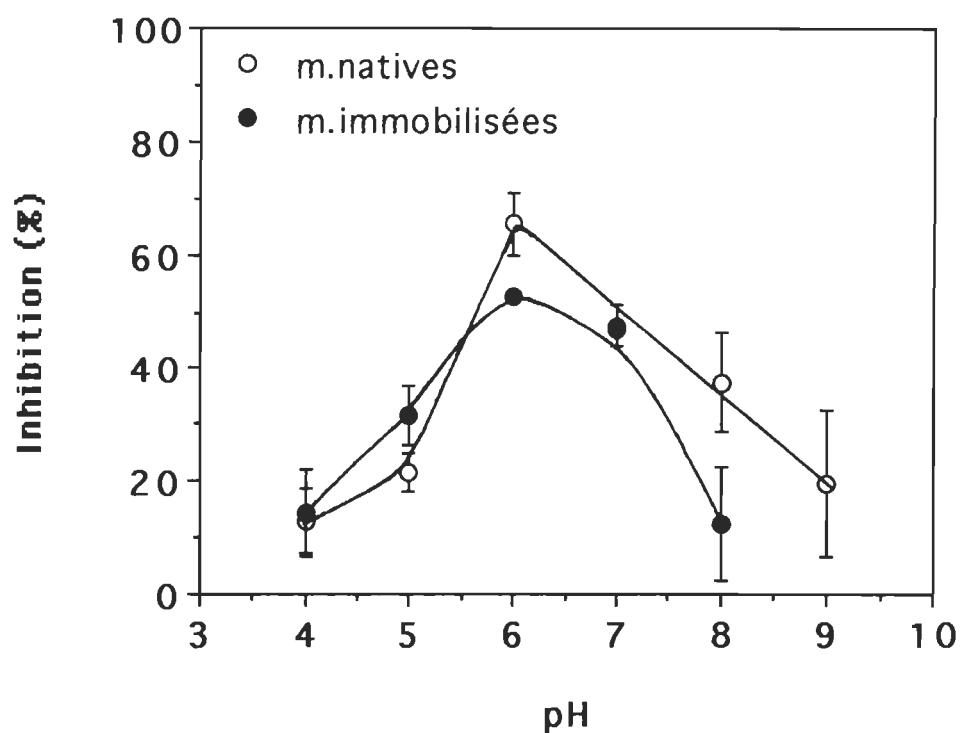


FIGURE 50. Influence du pH sur le pourcentage d'inhibition par le cuivre: 2.5×10^{-4} M chez les membranes natives et 10^{-4} M chez les immobilisées.

que mentionné plus haut. En effet, étant donné que le cuivre a un effet inhibiteur au complexe de dégagement d'oxygène, alors, une inactivation de ce dernier par des pH élevés sous-entend une plus faible possibilité d'inhibition par le cuivre puisque ce site est déjà inhibé par le pH.

Ce phénomène ne s'observe pas en présence d'atrazine puisque son site d'inhibition se situe au niveau de Q_B plutôt qu'au complexe de dégagement d'oxygène. Q_B n'est pas dégradé par des pH élevés.

Etant donné que le problème provient possiblement d'une transformation de la part des inhibiteurs à différents pH en complexes moins toxiques pour les thylacoïdes, que ces derniers soient libres ou immobilisés n'apportent aucune différence.

Des recherches supplémentaires seraient souhaitables pour connaître l'effet du pH sur l'inhibition par d'autres polluants. Selon les résultats obtenus jusqu'à maintenant, il semble que l'emploi de membranes immobilisées comme biosenseur de phytotoxicité nécessite une connaissance du pH de l'eau polluée, pour interpréter les résultats.

3.8 Discussion générale

Le rendement photosynthétique des membranes immobilisées peut être influencé par plusieurs facteurs. Parmi ceux-ci, il y a la concentration ionique des tampons, la concentration de l'accepteur d'électrons et la quantité de BSA par rapport à celle de Chl.

La présence de fortes concentrations ioniques est souhaitable lors de l'extraction puisque les ions protègent l'activité photosynthétique en maintenant l'empilement des membranes thylacoidiennes. La concentration optimale de DCBQ est variable selon la concentration en Chl. Pour 11 μg Chl/mL, elle est de 400 μM . Tant qu'à la quantité de BSA par rapport à celle de Chl, elle doit être suffisante afin que le BSA puisse jouer son plein rôle d'agent protecteur contre l'effet inhibiteur du glutaraldéhyde.

Les thylacoïdes immobilisés sont toujours plus stables que les extraits non traités, quelles que soient les conditions d'entreposage. Le degré de stabilité est toutefois influencé par la température et la lumière. Les conditions offrant la meilleure stabilité sont celles où les échantillons sont conservés à 4 °C et à l'obscurité.

L'immobilisation dans une matrice de BSA et de glutaraldéhyde permet une grande stabilité aux fluctuations de température en les protégeant contre les variations de la fluidité membranaire engendrées par une diminution de la température. De plus, la matrice

d'immobilisation apporte également une protection contre les variations de pH.

Parmi les polluants étudiés, les membranes immobilisées ont un seuil minimal de détection plus bas que les membranes libres pour l'atrazine, le DCMU et le cuivre. Elles peuvent également détecter la présence de bromoxynil, de mercure, de sulfite de sodium et de nitrite de sodium. Leurs I_{50} face à ces polluants est toujours plus bas ou, au moins, aussi bas que ceux retrouvés dans la littérature.

Pour ce qui est de l'habileté du biosenseur à base de membranes immobilisées à préciser la présence d'une pollution engendrée par plusieurs polluants, elle est aussi bonne et parfois meilleure que celle des membranes natives.

Le principal facteur influençant la sensibilité des membranes immobilisées face aux produits toxiques est l'accessibilité de leurs sites d'inhibition. L'immobilisation favoriserait, par les changements conformationnels qu'elle induit, l'accessibilité du site Q_B et du centre réactionnel du PSII tout en défavorisant l'accessibilité aux sites d'inhibition situés au complexe de dégagement d'oxygène. Pour un même site d'inhibition, la structure chimique du polluant dont dépend l'interaction avec les acides aminés joue aussi un rôle sur la sensibilité du biosenseur à base de membranes photosynthétiques. Enfin, le seuil

de détection d'un tel biocapteur peut être améliorée en diminuant la quantité de Chl présente.

CHAPITRE 4

CONCLUSION

Le but ultime de cette étude était de vérifier l'applicabilité des membranes photosynthétiques immobilisées en tant que biosenseur de phytotoxicité.

Les résultats démontrent que l'utilisation des membranes thylacoïdiennes immobilisées comme biocapteur permet un avancement significatif au niveau de la biotechnologie du biosenseur. La principale raison découle de la meilleure stabilité, offerte par les membranes immobilisées, aux conditions d'entreposage ainsi qu'aux fluctuations de température et de pH. Cette amélioration de la stabilité devrait permettre la réalisation de bioessais sur le terrain.

De plus, l'emploi de membranes immobilisées diminue de beaucoup la fréquence des manipulations reliées à leur préparation grâce à la longévité de leur activité photosynthétique sous des conditions d'entreposage. La matrice d'immobilisation ralentit également leur dégradation sous des conditions d'illuminatiuon. Mais le plus important, c'est l'intervalle de temps (les deux premières heures) où il n'y a aucune dégradation du matériel biologique exposé à la lumière. Cette période de grande stabilité permet la prise de mesures de

phytotoxicité non seulement sur le terrain mais également sous la lumière du jour.

D'autre part, il devient avantageux d'utiliser des membranes photosynthétiques immobilisées puisqu'elles sont souvent plus sensibles à de très petites quantités de polluants que les membranes libres. Cette plus grande efficacité de détection de plusieurs produits toxiques a lieu possiblement grâce à la plus grande accessibilité du site Q_B , engendré par le processus d'immobilisation induisant des changements conformationnels. Q_B étant le site d'inhibition de la plupart des herbicides et de plusieurs métaux, l'immobilisation des membranes ne peut être qu'avantageuse.

La méthode d'immobilisation permet de diminuer le seuil minimal de détection en permettant la présence de très faibles quantités de Chl. Toutefois, à cause de la perte d'activité photosynthétique engendrée par l'immobilisation, plus la concentration en Chl est petite, plus il devient difficile d'y voir l'inhibition provoquée par l'ajout de polluants. Ce sont les limites de l'appareil à dégagement d'oxygène qui en sont responsables. La diminution du rendement photosynthétique due à l'immobilisation devient également un facteur limitant lors de la prise de mesures à des températures très froides et à des pH très acides puisque ces conditions provoquent une perte d'activité supplémentaire. Pour minimiser ces contraintes, il importe de toujours

utiliser des épinards ou autre matériel photosynthétique d'une grande fraîcheur, pour qu'après l'immobilisation l'activité soit la plus élevée possible.

Une des limites de l'emploi de membranes photosynthétiques immobilisées en tant que biosenseur est leur manque de spécificité. En effet, un tel biocapteur permet de dépister la présence ou l'absence de potentiel toxique d'un effluent sans toutefois déterminer le ou les polluants responsables de la toxicité.

Par contre, si la tendance des résultats obtenus lors des études de l'influence de la température et du pH sur l'inhibition par l'atrazine et le cuivre se confirmerait par l'étude d'autres polluants, le biosenseur de pollution tel que proposé, apporterait une certaine sélectivité entre les polluants organiques et inorganiques.

Quoi qu'il en soit, ces bioessais étant peu coûteux, rapides (une dizaine de minutes), simples, reproductibles et réalisables sur le terrain, ils permettront d'assurer un contrôle très serré de la qualité de l'eau en assurant une vérification régulière de son potentiel toxique. Suite à la détection d'une toxicité, il est évident que des analyses plus poussées peuvent être nécessaires pour identifier les polluants.

Ainsi, un biosenseur de phytotoxicité à base de membranes photosynthétiques immobilisées répond aux critères sur lesquels est basé le choix d'un bioessai soit: la sensibilité, la simplicité, la

reproductivité, la rapidité, le coût et la représentativité. Il est généralement admis qu'il existe une similitude au niveau de l'appareil photosynthétique d'une espèce à l'autre. C'est ce principe qui permet de qualifier les membranes d'épinard comme étant un matériel biologique représentatif du milieu.

Avant de caractériser un tel biosenseur de commercial, il importe de poursuivre la recherche. Il est nécessaire d'étudier le mode d'inhibition d'autres métaux étant donné la diversité de leurs sites d'inhibition. D'autres études sur l'inhibition à différentes températures et à différents pH permettraient de préciser s'il est nécessaire, lors de la réalisation de biotests, de se soucier de la température et du pH de l'échantillon. Il faudrait également vérifier si l'élément de toxicité apporté par le pH peut s'ajouter aux paramètres détectés. De plus une meilleure connaissance du comportement des mélanges de polluants, tel que retrouvés sur le terrain, s'avère primordiale. Certains composés tels le calcium stimuleraient l'appareil photosynthétique. De plus, certains composés en s'associant avec les matières en suspension deviendraient moins biodisponibles. Il importe alors de vérifier si le potentiel toxique obtenu avec le biosenseur à base de membranes photosynthétiques immobilisées est représentatif du degré de pollution phytotoxique en le comparant avec celui obtenu par d'autres bioessais.

L'indice recherché par les mesures de phytotoxicité est le niveau de toxicité. En laboratoire, le paramètre de base exprimant le niveau de toxicité d'un échantillon a été le I_{50} . Toutefois, dans la perspective où ce type de biocapteur est avantageux pour vérifier régulièrement et rapidement le potentiel toxique des effluents, le paramètre de base devrait s'obtenir également le plus rapidement possible. Etant donné que le I_{50} se détermine à partir de plusieurs mesures, il serait plus profitable de rechercher simplement le % d'inhibition.

Connaissant les concentrations correspondant aux normes environnementales, on peut vérifier leurs valeurs, exprimées en pourcentage d'inhibition, pour ensuite les comparer avec le pourcentage d'inhibition obtenu à l'aide du biotest à base de membranes photosynthétiques immobilisées.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, C.D., Randtke, S., Thurman, E.M., et Hulsey, R.A. Occurrence and treatment of atrazine and its degradation products in drinking water. Proc. Am. Water Works Ass., 1990, 109, 1-24.
- Affolter, D., et Hall, D.O. Long-term stability of photosynthetic electron transport in polyvinyl foam immobilized cyanobacteria. Elsevier Science , 1986, pp. 193-201.
- Ankley, G.T., Hoke, R.A., Giesy, J.P., et Winger, P.V. Evaluation of the toxicity of marine sediments and dredge spoils with the microtox bioassay. Chemosphere, 1989, 18, no.9/10, 2069-2075.
- Apostolova, E.L., et Kafalieva, D.N. Changes in the microviscosity of chloroplast membranes after glutaraldehyde treatment., Comptes rendus de l'Académie bulgare des sciences (Tome 38), 1985, 8, 1061-1063.
- Bailliez, C., Largeau, C., Berkaloff, C., et Casadevall, E. Immobilization of *Botryococcus braunii* in alginate: influence on chlorophyll content, photosynthetic activity and degeneration during batch cultures. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1986, 23, 361-366.

Baker, N.R. A possible role for photosystem II in environmental perturbations of photosynthesis. *Physiol. Plant.*, 1991, 81, 563-570.

Baumann, G., et Günther, G. Factors affecting photosynthetic activity and stability of isolated mesophyll cells from *Chenopodium album*. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 1986, 181, 519-531.

Barber, J. Regulation of thylakoid membrane structure by surface electrical charge. In G.C. Papageorgiou, J. Barber et, S. Papa (Eds.), *Ion interactions in energy transfer biomembranes*. New York: Plenum Press, 1986, pp.15-27.

Bassi, R., Rigoni, F., et Giacometti, G. C. Chlorophyll binding proteins with antenna function in higher plants and green algae. *Photochem. Photobiol.*, 1990, 52, 1187-1206.

Beauregard, M. Involvement of sulfite and sulfate anions in the SO_2^- induced inhibition of the oxygen evolving enzyme photosystem II in chloroplasts : a review. *Environ. Exp. Bot.*, 1991, 31, no.1, 11-21.

Belluck, D.A., Benjamin, S.L. et, Dawson, T. Groundwater contamination by atrazine and its metabolites. In Somasundaram, L. et Coats, J.R. (Eds.), *Pesticide transformation*

- products, Washington, American chemical society, 1991, pp.254-273.
- Blondin, G.A., Knobeloch, L.M., Read, H.W., et Harkin, J.M. An in vitro submitochondrial bioassay for predicting acute toxicity in fish. In G.W. Suter II et M.A. Levis (Eds.), Aquatic toxicology and environmental Fate (vol.11). Philadelphia: American society for testing and materials, 1989, pp.551-563.
- Bonenfant, D., et Carpentier, R. Stabilization of the structure and functions of a photosystem I susmembrane fraction by immobilisation in an albumin-glutaraldehyde matrix. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1990, 26, no.1, 59-71.
- Bowlby, N., Petersen, J., Babcock, G.T., et Yocum, C.F. Alteration of Q_B activity in photosystem II. *Curr. Res. in Photosynth.*, 1990, 1, 539-542.
- Broun, G., Thomas, D., Gellf, G., Domurado, D., Berjonneau, A.M., et Guillon, C. New methods for binding enzyme molecules into a water-insoluble matrix: properties after insolubilization. *Biotechnol. and Bioeng.* (vol.XV), John Wiley & Sons, Inc., 1973, pp.359-375.
- Brown, D.H., et Wells, J.M. Physiological effects of heavy metals on the moss *Rhytidadelphus squarrosus*. *Ann. Bot.*, 1990, 66, 641-647.

Bruce, K., et Turner, J.E. The interaction of cadmium and certain other metal ions with proteins and nucleic acids. *Toxicology*, 1980, 16, 1-37.

Carpentier, R., Fuerst, E.P., Nakatani, H.Y., et Arntzen, C.J. A second site for herbicide action in photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, 808, 293-299.

Carpentier, R., Leblanc, R.M., et Mimeault, M. Photoinhibition and chlorophyll photobleaching in immobilized thylakoid membranes. *Enzyme Microb. Technol.*, 1987, 9, 489-493.

Carpentier, R., et Lemieux, S. Immobilization of a photosystem II submembrane fraction in a glutaraldehyde cross-linked matrix. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1987, 15, 107-117.

Carpentier, R., Leblanc, R., et Mimeault, M. Monitoring electron transfer by photoacoustic spectroscopy in native and immobilized thylakoid membranes. *Biotechnol. Bioeng.*, 1988, 32, 64-67.

Carpentier, R., Lemieux, S., et Mimeault, M. Photocurrent generation by thylakoid membranes immobilized in an albumin-glutaraldehyde cross-linked matrix. *Biotechnol. Lett.*, 1988, 10, no.2, 133-136.

Carpentier, R., Lemieux, S., Mimeault, M., Purcell, M., et Goetze, D.C. A photoelectrochemical cell using immobilized photosynthetic membranes. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1989, 22, 391-401.

Carpentier, R., Loranger, C., Chartrand, J., et Purcell, M. Photoelectrochemical cell containing chloroplast membranes as a biosensor for phytotoxicity measurements. *Anal. Chim. Acta*, 1991, 249, 55-60.

Chow, W.S., Hope, A.B., et Anderson, J.M. A reassessment of the use of herbicide binding to measure photosystem II reaction centres in plants thylakoids. *Photosynth. Res.*, 1990, 24, 109-113.

Clijsters, H., et Assche, F. van. Inhibition of photosynthesis by heavy metals. *Photosynth. Res.*, 1985, 7, 31-40.

Cocquempot, M.F., Thomas, D., Champigny, M.L., et Moyse, A. Immobilization of thylakoids in porous particles and stabilization of the photochemical processes by glutaraldehyde action at subzero temperature. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1979, 8, 37-41.

Cocquempot, M.F., Garde, V.L., et Thomas, D. Stabilization of biological photosystems: immobilization of thylakoids and chromatophores

for hydrogen production and ATP regeneration. *Biochimie*, 1980, 62, 615-621.

Cocquempot, M.F., Thomasset, B., Barbotin, J.N., Gelif, G., et Thomas, D. Comparative stabilization of biological photosystems by several immobilization procedures. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1981, 11, 193-198.

Cocquempot, M.F., et Thomas, D. Immobilized chloroplast membranes: kinetic aspects of their continuous use in batch and chemostat. *Enzyme Microb. Technol.*, 1984, 6, 321-324.

Cocquempot, M.F., Hervagault, J.F., et Thomas, D. Kinetic study of immobilized chloroplast membranes operating in a continuous flow system. *Enzyme Microb. Technol.*, 1986, 9, 533-536.

Coillie, R. van Toxicologie. Notes de cours non-publié, U.Q.T.R., 1990.

Davison, I.R. Environmental effects on algal photosynthesis: Temperature. *J. Phycol.*, 1991, 27, 2-8.

Delieu, T., et Walker, D.A. An improved cathode for the measurement of photosynthetic oxygen evolution by isolated chloroplasts, *New. Phytol.*, 1972, 71, 201-225.

Dismukes, G.C. Mixed valency in multinuclear manganese enzymes and clusters. In Kluwer Academic (Ed.), Applications in Chemistry, Physics and Biology, USA, 1990, pp.1-18.

Dodge, A. D. Herbicides interacting with photosystem I. In A.D. Dodge (Ed.), Herbicides and Plant Metabolism. Great Britain: Cambridge University Press, 1989, pp.37-50.

Draber, W., Pittel, B., et Trebst, A. Modeling of photosystem II inhibitors of the herbicide-binding protein. Magee, P.S., Douglas, R.H., et Block, J.H. (Ed), Probing Bioactive Mechanisms, American Chemical Society, 1989, pp.215-228.

Droppa, M., et Horvàth, G. The role of copper in photosynthesis. Plant Sci., 1990, 9, 111-123.

Ducruet, J.M., Creuzet, S., et Viénot, J. Kinetics of action of different photosystem II herbicides on thylakoids. Z. Naturforsch., 1990, 45 c, 348-352.

Enami, I., Mochizuki, Y., Takahashi, S., Kakuno, T., Horio, T., Satoh, K., et Katoh, S. Evidence from crosslinking for nearest-neighbor relationships among the three extrinsic proteins of spinach photosystem II complexes that are associated with oxygen evolution. Plant Cell Physiol., 1990, 31, no.5, 725-729.

Foyer, C.H. Photosynthesis, A wiley-interscience publication. United States: John Wiley & Sons, Inc., 1984, 219p.

Fuerst, E.P., et Norman, M.A. Interactions of herbicides with photosynthetic electron transport. *Weed Sci.*, 1991, 39, 458-464.

Frank, H.A., Violette, C.A., Trautman, J.K., Shreve, A.P., Owens, T.G., et Albrecht, A.C. Carotenoids in photosynthesis: structure and photochemistry. *Pure Appl. Chem.*, 1991, 63, no.1, 109-114.

Ghanotakis, D.F., et Yocum, C.F. Photosystem II and the oxygen-evolving complex. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.*, 1990, 41, 255-276.

Giardi, M.T., Barber, J., Giardina, M.C., et Bassi, R. Studies on the herbicide binding site in isolated photosystem II core complexes from a flat-bed isoelectrofocusing method. *Z. Naturforsch.*, 1990, 45 c, 366-372.

Gimmler, H., Treffny, B., Kowalski, M., et Zimmermann, U. The resistance of Dunaliella acidophila against heavy metals: the importance of the zeta potential. *J. Plant Physiol.*, 1991, 138, 708-716.

Govindjee, et Coleman, W. La production d'oxygène par les plantes.
Pour la science, 1990, 150, 42-49.

Gronow, M., Kingdon, C.F.M., et Anderton, D.J. Biosensors in molecular biology and biotechnology. J.M. Walker (Ed.), E.B. Gingold, 1985, pp. 295-324.

Hader, D.J., et Tevini, M. Photosynthesis , General photobiology.
Toronto: Pergamon Press, 1987, pp. 112-165.

Hansson, O., et Wydrzynski, T. Current perceptions of photosystem II.
Photosynth. Res., 1990, 23, 131-162.

Hardt, H., et Kok, B. Stabilization by glutaraldehyde of high-rate electron transport in isolated chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta, 1976, 449, 125-135.

Hardt, H., et Kok, B. Plastocyanin as the possible site of photosynthetic electron transport inhibition by glutaraldehyde. Plant Physiol., 1977, 60, 225-229.

Homann, P.H. Explorations in the "inner sanctum of the photosynthetic process", the water oxidizing system., Plant Physiol., 1988, 88, 1-5.

Inoue, H., Kaneko, M., et Kitamura, T. Stabilization by glutaraldehyde of photosystem 2 particules against variuos inhibitory treatments of oxygen evolution. *Photosynthetica*, 1987, 21, no.4, 591-594.

Isaakidou, J. et, Papageorgiou, G.C. Functional effects of chemical modification of unstacked and stacked chloroplasts with glutaraldehyde. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1979, 195, no.2, 280-287.

Itoh, S., et Iwaki, M. Competitive bindings of herbicide and quinone to photosystem I phylloquinone (A-1) binding site. In M. Baltscheffsky (Ed.), *Current Research in Photosynthesis* (Vol 2). Netherlands: Kluwer Academic, 1990, pp.651-654.

Izawa, S. Acceptors and donors for chloroplast electron transport. *Methods Enzymol.*, 1980, 69, 413-435.

Jasen, M.A.K., Malkin, S., et Edelman, M. Differential sensitivity of 32 kDa-D₁ protein degradation and photosynthetic electron flow to photosystem II herbicides. *Z. Naturforsch.*, 1990, 45 c, 408-411.

Jeanfils, J., Cocquempot, M.F., et Collard, F. Low temperature (77 K) emission spectra and photosystem activities of chloroplasts and thylakoids immobilized in a cross-linked Albumin Matrix and stored at room temperature in daylingt. *Photosynthetica*, 1982, 16, no.2, 245-250.

Jeanfils, J., et Collard, F. Effet of immobilizing *Scenedesmus obliquus* cells in a matrix on oxygen evolution and fluorescence properties. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1983, , 254-257.

Jeanfils, J., Cocquempot, M.F., et Thomas, D. Study of fluorescence kinetics and of PSII activity in fixed or immobilized chloroplast membranes. *Enzyme Microb. Technol.*, 1986, 8, 157-160.

Kirilovsky, D., Ducruet, J.M., et Etienne, A.L. Primary events occurring in photoinhibition in *Synechocystis 6714* wild-type and an atrazine-resistant mutant. *Biochim. Biophys. Acta*, 1990, 1020, 87-93.

Leeuwen, P.J.van, Marten, H.V., et Gorkom, H.J.van. Photosynthetic oxygen evolution. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1990, 1018, 173-176.

Lemieux, S., et Carpentier, R. Properties of immobilized thylakoid membranes in photosynthetic photoelectrochemical cell. *Photochem. Photobiol.*, 1988, 48, no.1, 115-121.

Lindberg, K., Wydrzynski, T., Vänngard, T., et Andréasson, L.E. Slow release of chloride from ^{36}Cl -labeled photosystem II membranes. *FEBS Lett.*, 1990, 264, no.1, 153-155.

Mamoru, M., et Katoh, T. Carotenoids in photosynthesis: absorption, transfer and dissipation of light energy. *Pure Appl. Chem.*, 1991, 63, no.1, 123-130.

Mathis, P. Primary processes in photosynthetic reaction centers. *Pure Appl. Chem.*, 1990, 62, no.8, 1521-1530.

McCarthy J.F., et Bartell, S.M. How the trophic status of a community can alter the bioavailability and toxic effects of contaminants. In J.Cairns, Jr, et J.R. Pratt (Eds.), *Functional testing of aquatic biota for estimating hazards of chemicals*, ASTM STP 988. Philadelphia, 1988, pp.3-16.

Melis, A. Dynamics of photosynthetic membrane composition and function. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1991, 1058, 87-106.

Munawar, M, et Munawar, J.F. Phytoplankton bioassays for evaluating toxicity of in situ sediment contaminants. *Hydrobiologia*, 1987, 149, 87-105.

Naber, J.D., et Rensen, J.J.S. van Activity of photosystem II herbicides is related with their residence times at D₁ protein. *Z. Naturforsch.*, 1991, 46 c, 575-578.

Nedbal, L., Setlikova, E., Masojidek, J., et Setlik, I. The nature of photoinhibition in isolated thylakoids. *Biochim. Biophys. Acta*, 1986, 848, 108-119.

Papageorgiou, G.C., Molecular and functional aspects of immobilized chloroplast membranes. In J. Barber (Ed.), *Topics in photosynthesis* (vol.3), Amsterbam: Elsevier, 1979, pp.211-241.

Papageorgiou, G.C., et Demosthenopoulou-Karaoulani, E. Stabilization of the morphology and the photosynthetic function of isolated intact chloroplast with glutaraldehyde, *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 1982, 105, 201-210.

Papageorgiou, G.C., Immobilization of photosynthetically active intact chloroplasts in a crosslinked albumin matrix. *Biotechnol. Lett.*, 1983, 5, 819-824.

Papageorgiou, G.C., et Lagoyanni, T. Immobilization of photosynthetically active cyanobacteria in glutaraldehyde-crosslinked albumin matrix. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1986, 23, 417-423.

Papageorgiou, G.C. Immobilized photosynthetic microorganisms. *Photosynthetica*, 1987, 21, no.3, 367-383.

Papageorgiou, G.C., Fujimura, Y, et Murata, N. Protection of the oxygen-evolving photosystem II complex by glycinebetaine. *Biochim. Biophys. Acta*, 1991, 1057, 361-366.

Papageorgiou, G.C. et, Lagoyanni, T. Interactions of iodide ions with isolated photosystem 2 particles. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1991, 285, no.2, 339-343.

Phillips, D.J.H. The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments- A review. *Environ. Poll.*, 1977, 13, 281-317.

Purcell, M., et Carpentier, R. A phytotoxicity biosensor using photosynthetic membranes. *Water Poll. Res. J. Canada*, 1990, 25, no.2, 175-185.

Purcell, M., et Carpentier, R. Immobilized plant thylakoid membranes as a biosensor for herbicides. *Biotechnol. Tech.*, 1990, 4, no.5, 363-368.

Purcell, M., Leroux, G.D., et Carpentier, R. Atrazine action on the donor side of photosystem II in triazine- resistant and -susceptible weed biotypes. *Pest. Biochem. Physiol.*, 1990, 37, 83-89.

Purcell, M., Leroux, G.D., et Carpentier, R. Interaction of the electron donor diphenylcarbazide with the herbicide-binding niche of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta*, 1991, 1058, 374-378.

Rai, L.C., Singh, A.K., et Mallick, N. Studies on photosynthesis, the associated electron transport system and some physiological variables of Chlorella vulgaris under heavy metal stress. *J. Plant Physiol.*, 1991, 137, 419-424.

Rao, K.K., et Hall, D.O. Photosynthetic production of fuels and chemicals in immobilized systems. *Trends in Biotechnology.*(vol.2) Amsterdam: Elsevier Science, 1984, no.5, 124-129.

Rashid, A., Bernier, M., Pazdernick, L. et Carpentier, R. Interaction of Zn $^{2+}$ with the donor side of photosystem II. *Photosynth. Res.*, 1991, 30, 123-130.

Rawson, D.M., Willmer, A.J., et Cardosi, M.F. The development of whole cell biosensors for on-line screening of herbicide pollution of surface waters. In *Toxicity Assessment: An international Quarterly* (vol.2). John Wiley & Sons, Inc., 1987, pp.325-340.

Renger, G. The photosynthetic oxygen evolving complex: functional mechanism and structural organization., ISI Atlas of Science: Biochemistry, 1988, 41-47.

Rensen, J.J.S. van Herbicides interacting with photosystem II. In A.D Dodge (Ed.), *Herbicides and plant metabolism*, Great Britain: Cambridge University Press, 1989, pp. 21-36.

Richter, M., Rühle, W., et Wild, A. Studies on the mechanism of photosystem II photoinhibition I. A two-step degradation of D₁-protein. *Photosynth. Res.*, 1990, 24, 229-235.

Richter, M., Rühle, W., et Wild, A. Studies on the mechanism of photosystem II photoinhibition II. The involvement of toxic oxygen species. *Photosynth. Res.*, 1990, 24, 237-243.

Ringbom, A. *Les complexes en chimie analytique*. Paris: Dunod, 1967.

Rutherford, A.W. Photosystem II, the water-splitting enzyme. *TIBS*, 1989, 14, 227-232.

Sahu, A., Shaw, B.P., Panigrahi, A.K., et Misra, B.N. Effects of phenyl mercuric acetate on oxygen evolution in a nitrogen fixing blue-green alga, *Westiellopsis prolifica* Janet. *Microb. Lett.*, 1988, 37, 119-123.

Santarius, K.A. Freezing of isolated thylakoid membranes in complex media. VII. The effect of bovine serum albumin. *Biochem. Physiol. Pflanzen.*, 1991, 187, 149-162.

Shaw, B.P., Sahu, A., et Panigrahi, A.K. Effects of the effluent from a chlor-alkali factory on a blue-green alga: changes in the oxygen evolution rate. *Microb. Lett.*, 1988, 37, 89-96.

Stauber, J.L., et Florence, T.M. Mechanism of toxicity of ionic copper and copper complexes to algae. *Marine Biol.*, 1987, 94, 511-519.

Stratton, G.W., Burrell, R., et Corke, C.T. Technique for identifying and minimizing solvent-pesticide interactions in bioassays. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 1982, 11, 437-445.

Stratton, G.W., et Giles, J. Importance of bioassay volume in toxicity tests using algae and aquatic invertebrates. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1990, 44, 420-427.

Sundby, C., Larsson, U.K., et Andersson, B. Ionic effects on the lateral segregation of chlorophyll-proteins during restacking of thylakoid membranes. In G.C. Papageorgiou, J. Barber, et Papa, S. (Eds.), *Ion interactions in energy transfer biomembranes*. New York: Plenum Press, 1986, pp.237-249.

Synkova, H., et Sestak, Z. Immobilization of chloroplasts from young and old leaves of lettuce, pea, spinach and tobacco. *Photosynthetica*, 1991, 25, no.1, 1-10.

Takamura, N., Kasai, F., et Watanabe, M.M. Effects of Cu, Cd and Zn on photosynthesis of freshwater benthic algae. *J. Appl. Phycol.*, 1989, 1, 39-52.

Tanaka-Kitatani, Y., Satoh, K, et Katoh, S. Interaction of benzoquinones with Q_A^- and Q_B^- in oxygen-evolving photosystem II particles from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Plant Cell Physiol.*, 1990, 31, no.7, 1039-1047.

Teige, M., Huchzermeyer, B., et Schultz, G. Inhibition of chloroplast ATPsynthetase/ATPase is a primary effect of heavy metal toxicity in spinach plants. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 1990, 186, 165-168.

Thomasset, B., Thomasset, T., Vejux, A., Jeanfils, J., Barbotin, J.N., Thomas, D. Immobilized thylakoids in a cross-linked albumin matrix. *Plant Physiol.*, 1982, 70, 714-722.

Thomasset, B., Barbotin, J.N., Thomas, D., Thomasset, T., Vejux, A., et Jeanfils, J. Fluorescence and photoacoustic spectroscopy of immobilized thylakoids, *Biotechnology and Bioengineering* (vol. XXV), John Wiley & Sons, Inc., 1983, pp.2453-2468.

Thomasset, B., Barbotin. J.N., et Thomas, D. The effects of high concentration of salts on photosynthetic electron transport of immobilized thylakoids: functional stability. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1984, 19, 387-392.

Thomasset, B., Barbotin, J.N., et Thomas, D. The effects of oxygen solubility and high concentrations of salts on photosynthetic electron transport in chloroplast membranes. *Biochem. J.*, 1984, 218, 539-545.

Thomasset, B., Barbotin, J.N., et Thomas, D. Immobilized chloroplast membranes: effects of cations and antichaotropes anions. In G.C. Papageorgiou, J. Barber, et S. Papa (Eds.), *Ion interactions in energy transfer biomembranes*. New York: Plenum Press, 1986, pp.313-321.

Thomasset, B., Friboulet, A., Barbotin, J.N., et Thomas, D. Modulation by a high citrate concentration of kinetic parameters and of functional stability of two immobilized thylakoid systems. *Biotechnol. Bioeng.* 1986, 28, 1200-1205.

Thomasset, B., et Thomas, D. Influence of immobilization procedure and salt environment on functional stability of chloroplast membranes: experimental data and numerical analysis. *Biotechnol. Bioeng.*, 1988, 32, 764-770.

Tietjen, K.G., Kluth, J.F., Andree, R., Haug, M., Lindig, M., Müller, K.H., Wroblowsky, H.J. et, Trebst, A. The herbicide binding niche of photosystem II-A model. *Pestic. Sci.*, 1991, 31, 65-72.

Trebst, A. Inhibitors in electron flow: tools for the functional and structural localization of carriers and energy conservation sites. *Methods Enzymol.*, 1980, 69, 675-715.

Trebst, A., The orientation of herbicides in their binding niche on photosystem II. *Dechema Biotechnol. Conf.*, 1988, 1, 295-300.

Trebst, A., Kluth, J., et Draber, W. Molecular analysis of photosystem II inhibition. In VCH (Ed.), *Pesticide Chemistry: Advances in International Research*. Hamburg, 1990, pp.111-120.

Tripathy, B.C., et Mohanty, P. Stabilization by glutaraldehyde fixation of chloroplast membrane structure and function against heavy metal ion induced damage. *Plant Science Lett.*, 1981, 253-261.

Voet, D., et Voet, G.J. Photosynthesis. In John Wiley & Sons (Ed.), *Biochemistry*, United States: Wiley, 1990, pp. 586-616.

Wietschorke, G.M., Lühmann, H.J., et Kreeb, K.H. Single and combined effects of lead, herbicide and temperature on net photosynthetic rate of *Hypogymnia physodes*, a corticolous lichen. *Photosynthetica*, 1990, 24, no1, 102-109.

Witt, H.T. Some recent functional and structural contributions to the molecular mechanism of photosynthesis. The Roots of Modern Biochemistry, 1988, 713-720.

Wong, P.K., et Chang, L. Effects of copper, chromium and nickel on growth, photosynthesis and chlorophyll a synthesis of Chlorella pyrenoidosa 251. Environ. Poll., 1991, 72, 127-139.

Yamamoto, Y. Molecular organisation of oxygen-evolution system in chloroplast. Bot. Mag. Tokyo, 1989, 102, 565-582.

Yanase, D., Andoh, A., et Yasudomi, N. A new simple bioassay to evaluate photosynthetic electron-transport inhibition utilizing paraquat phytotoxicity. Pest. Biochem. Physiol., 1990, 38, 92-98.

Yoshida, S. Heuristic Approaches to finding new herbicides active in the chloroplast. Z. Naturforsch., 1990, 45 c, 329-335.