

UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

MEMOIRE PRESENTE A
UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAITRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR
MARC PURCELL

ANALYSE DES MODES D'INTERACTIONS ENTRE L'ATRAZINE ET
L'APPAREIL PHOTOSYNTHETIQUE

AVRIL 1990

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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

A mes parents...

Ainsi qu'à tous les avocats
du diable de la science.

RESUME

Les triazines constituent un type d'herbicides bien connus qui inhibent le transfert photosynthétique d'électrons entre les quinones Q_A et Q_B . L'atrazine fait principalement l'objet de la présente recherche vu l'étendue de son champ d'intérêt au niveau de l'agriculture. Ce type d'herbicide est caractérisé fonctionnellement comme jouant un rôle de premier plan lors de la délocalisation de Q_B à son site d'action. Plusieurs biotypes sont maintenant connus pour développer une résistance naturelle à l'atrazine via un changement des propriétés du photosystème II (PSII). De plus, l'idée d'un deuxième site d'action des triazines, localisé du côté donneur du PSII, est un sujet d'actuelle discussion. Dans le présent travail, l'interaction entre l'atrazine et le photosystème II est analysée sous plusieurs aspects.

Les particules membranaires utilisées (membranes thylacoidiennes entières et enrichies en PSII) ont été isolées de biotypes résistants et susceptibles à l'atrazine chez les espèces suivantes, toutes nuisibles principalement aux cultures de maïs: Chénopodium album L., Amaranthus Powellii S Wats et Brassica rapa L. La méthodologie employée ici est basée sur le pouvoir réducteur d'électrons attribué aux donneurs artificiels utilisés (diphénylcarbazine et $MnCl_2$). Par des méthodes spectrophotométriques, la présence

d'un deuxième site d'action de l'atrazine du côté donneur du PSII a pu être caractérisée. Ce site s'est avéré également présent chez les biotypes résistants à l'atrazine. Les données relatives à la photoréduction de l'accepteur d'électrons (dichlorophénolindophénol), au dégagement d'oxygène et enfin, à la liaison de l'herbicide marqué (^{14}C -atrazine), s'accordent pour démontrer une inhibition compétitive de la liaison de l'atrazine par le diphénylcarbazine.

L'étude du cytochrome b-559 chez les deux biotypes, révèle qu'il y aurait plus de cytochrome à bas potentiel chez les plantes résistantes à l'atrazine. D'autre part, la photoréduction et la photooxydation du cytochrome en présence d'atrazine confirment son inter-relation avec la chaîne de transport d'électrons.

Finalement, une méthode électrochimique fut employée dans le but d'explorer davantage l'action des herbicides au niveau du PSII. La cellule photoélectrochimique utilisée comme biosenseur d'herbicides et de métaux lourds s'avère une méthode d'une sensibilité appréciable. De plus il est possible d'augmenter la sensibilité de détection en diminuant la quantité de chlorophylle ou encore en immobilisant les membranes dans une matrice de glutaraldéhyde.

REMERCIEMENTS

J'ai eu durant ce travail la chance et l'honneur de travailler avec M. Robert Carpentier, par qui, son accomplissement fut des plus agréables. J'aimerais le remercier tout particulièrement pour avoir été très disponible durant cette période et surtout d'avoir légué aux résultats, une personnalité toute singulière.

J'aimerais également souligner l'étroite collaboration de M. Gilles Leroux pour son aide technique et scientifique soutenue.

TABLE DES MATIERES

	page
RESUME.....	iii
REMERCIEMENTS.....	v
TABLE DES MATIERES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	x
ABBREVIATIONS.....	xix
CHAPITRES	
1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Objectifs du travail.....	1
1.2 Théories spectroscopiques.....	15
1.2.1 Photoréduction du DCPIP.....	15
1.2.2 Photoréduction et photooxydation du cytochrome b-559.....	15
1.3 Cellule photoélectrochimique.....	19
2. MATERIEL ET METHODES.....	22
2.1 Produits utilisés.....	22
2.2 Spectrométrie UV-visible.....	22
2.3 Electrode à oxygène.....	26
2.4 Production de photocourant.....	26
2.5 Description des méthodes.....	27
2.5.1 Particules membranaires.....	27
i) Extraction des membranes enrichies en photosystème II.....	27

ii) Extraction des membranes	
thylacoïdiennes.....	28
iii) Immobilisation des membranes	
thylacoïdiennes.....	29
2.5.2 Méthodes/manipulations.....	29
i) Photoréduction du DCPIP.....	29
ii) Mesures de dégagement d'oxygène...	30
iii) Mesures de liaison de l'atrazine	
marqué (^{14}C -atrazine).....	30
iv) Analyse du cytochrome b-559.....	31
v) Mesures photoélectrochimiques de	
l'inhibition du photosystème II...	32
3. RESULTATS ET DISCUSSION.....	33
3.1 site d'action de l'atrazine du côté luménal du	
PSII.....	33
3.2 Etude des relations existant entre molécules de	
type quinones.....	67
3.2.1 Compétition inhibiteurs/donneur	
d'électrons.....	67
3.2.2 Interaction donneur/accepteur	
d'électrons.....	75
3.2.3 Mesure de dégagement d'oxygène.....	77
3.2.4 Relation entre la liaison de l'atrazine	
et la levée de l'inhibition.....	77
3.3 Réactions d'oxydo-réduction du cytochrome	
b-559.....	86

3.3.1	Etude comparative du cytochrome b-559...	87
3.3.2	Photoréduction du cytochrome b-559.....	97
3.3.3	Photooxydation du cytochrome b-559.....	105
3.4	Les membranes thylacoïdiennes (natives et immobilisées) utilisées comme biosenseur d'herbicides et de métaux lourds.....	112
3.4.1	Détection de molécules inhibitrices de la photosynthèse.....	112
3.4.2	Sensibilité/diminution de la concentration en chlorophylle.....	123
3.4.3	Immobilisation des membranes thylacoïdiennes.....	126
4.	CONCLUSION.....	132
ANNEXES		
A.	Evaluation quantitative du complexe de liaison de l'inhibiteur.....	135
B.	Paramètres de vérification d'une cinétique d'ordre 1.....	136
BIBLIOGRAPHIE.....		137

LISTE DES TABLEAUX

	page
1. Caractéristiques des produits utilisés.....	23
2. Evaluation de la constante de liaison (K) et du nombre de sites de liaison (X_t ; chlorophylle par molécule d'atrazine liée).....	85
3. Etude comparative et quantitative du cytochrome b-559 à haut et bas potentiel chez les biotypes résistants et sensibles à l'atrazine.....	93
4. Réactions d'oxydoréduction du cytochrome b-559 en présence d'atrazine.....	109
5. Valeurs de I_{50} par inhibiteurs (d'après la méthode de Lineweaver Burk).....	130

LISTE DES FIGURES

	page
1. Structure interne et localisation du chloroplaste.....	2
2. Transport d'électrons à travers le thylacoïde.....	4
3. Localisation et visualisation des complexes protéiques du PSII.....	6
4. Structure moléculaire de l'atrazine et du diphénylcarbazine.....	11
5. Représentation schématique de la cellule photoélectrochimique.....	20
6. Inhibition de la photoréduction du DCPIP par l'atrazine en présence de DPC chez des PSII de <u>Chenopodium album</u> L.....	35
7. Inhibition de la photoréduction du DCPIP par l'atrazine en présence de DPC chez des PSII d' <u>Amaranthus Powellii</u> S Wats.....	38

8. Inhibition de la photoréduction du DCPIP par l'atrazine en présence de DPC chez des PSII de <u>Brassica rapa</u> L.....	39
9. Inhibition de la photoréduction du DCPIP par l'atrazine en présence de DPC chez des thylacoïdes de <u>Chenopodium album</u> L.....	41
10. Inhibition de la photoréduction du DCPIP par l'atrazine en présence de DPC chez des thylacoïdes d' <u>amaranthus Powelii</u> S Wats.....	43
11. Inhibition de la photoréduction du DCPIP par l'atrazine en présence de DPC chez des thylacoïdes de <u>Brassica rapa</u> L.....	44
12. Inhibition de la photoréduction du DCPIP par l'atrazine en présence de $MnCl_2$ chez des PSII et thylacoïdes de <u>Chenopodium album</u> L.....	46
13. Inhibition de la photoréduction du DCPIP par l'atrazine en présence de $MnCl_2$ chez des PSII et thylacoïdes d' <u>Amaranthus Powelii</u> S Wats.....	47

14. Inhibition de la photoréduction du DCPIP par l'atrazine en présence de $MnCl_2$ chez des PSII et thylacoïdes de <u>Brassica rapa</u> L.....	48
15. Atténuation de l'inhibition par l'atrazine en présence de DPC chez des PSII et thylacoïdes de <u>Chenopodium album</u> L. sensibles.....	50
16. Atténuation de l'inhibition par l'atrazine en présence de DPC chez des PSII et thylacoïdes de <u>Chenopodium album</u> L. résistants.....	52
17. Atténuation de l'inhibition par l'atrazine en présence de DPC chez des PSII et thylacoïdes de <u>Brassica rapa</u> L. sensibles.....	53
18. Atténuation de l'inhibition par l'atrazine en présence de DPC chez des PSII et thylacoïdes de <u>Brassica rapa</u> L. résistants.....	54
19. Atténuation de l'inhibition par l'atrazine en présence de DPC chez des PSII et thylacoïdes de <u>Amaranthus Powellii</u> S Wats. sensibles.....	56

20. Atténuation de l'inhibition par l'atrazine en présence de DPC chez des PSII et thylacoïdes de <u>Amaranthus Powelii</u> S Wats. résistants.....	57
21. Atténuation de l'inhibition par l'atrazine en présence de $MnCl_2$ chez des PSII sensibles de <u>Chenopodium</u> , d' <u>Amaranthus</u> et de <u>Brassica</u>	58
22. Inhibition de la photoréduction du DCPIP par l'atrazine en présence de 0.5 mM DPC chez des PSII et thylacoïdes de <u>Chenopodium album</u> L.....	60
23. Inhibition de la photoréduction du DCPIP par l'atrazine en présence de 0.5 mM DPC chez des PSII et thylacoïdes d' <u>Amaranthus Powelii</u> S Wats.....	61
24. Inhibition de la photoréduction du DCPIP par l'atrazine en présence de 0.5 mM DPC chez des PSII et thylacoïdes de <u>Brassica rapa</u> L.....	62
25. Carte de digestion d'un fragment de la protéine D1 par la trypsine et le CNBr.....	65
26. Modèle des cinq hélices transmembranaires de la protéine D1.....	66

27. Inhibition de la photoréduction du DCPIP par l'atrazine en présence d'une forte concentration de DPC chez des thylacoïdes d'épinard.....	68
28. Inhibition de la photoréduction du DCPIP par le DCMU en présence d'une forte concentration de DPC chez des thylacoïdes d'épinard.....	69
29. Valeurs de photoréduction du DCPIP (haut) et d'inhibition de la photoréduction (bas) en fonction du DPC, en présence d'inhibiteurs chez des thylacoïdes d'épinard.....	71
30. Valeurs de photoréduction du DCPIP (haut) et d'inhibition de la photoréduction (bas) en fonction du DPC, en présence d'inhibiteurs chez des thylacoïdes d'orge.....	72
31. Double réciproque de la photoréduction du DCPIP en fonction du DPC et en présence d'inhibiteurs, chez les thylacoïdes d'orge.....	74
32. Photoréduction du DCPIP en fonction du DCPIP avec et sans DPC chez les thylacoïdes d'épinard.....	76

33. Dégagement d'oxygène en présence d'atrazine en fonction de donneurs d'électrons chez les thylacoïdes d'épinard.....	78
34. Liaison de l'atrazine marquée en fonction du DPC chez les thylacoïdes d'épinard.....	80
35. Atrazine- ¹⁴ C liée en fonction de l'atrazine- ¹⁴ C libre en présence d'inhibiteurs chez les thylacoïdes d'épinard.....	83
36. Photoréduction et photooxydation du cytochrome b-559 à haut et à bas potentiel chez les PSII de <u>Chenopodium album</u> L. sensible.....	88-89
37. Photoréduction et photooxydation du cytochrome b-559 à haut et à bas potentiel chez les PSII de <u>Chenopodium album</u> L. résistant.....	91-92
38. Photoréduction et photooxydation du cytochrome b-559 à haut et à bas potentiel chez l'épinard.....	95-96
39. Induction de la photoréduction du cytochrome b-559 à 561 nm.....	98

40. Spectre de différence d'absorption du cytochrome b-559 chez l'épinard.....	99
41. Induction de la photoréduction du cytochrome b-559 à 430 mW/cm ²	101
42. Courbe de saturation de la photoréduction du cytochrome b-559 en fonction de l'intensité lumineuse.....	102
43. Inhibition de la vitesse initiale (V_i) de la phtoréduction du cytochrome b-559 par l'atrazine chez l'épinard.....	103
44. Inhibition de la vitesse initiale (V_i) de la phtoréduction du cytochrome b-559 par le DCMU chez l'épinard.....	104
45. Inhibition comparative de la photoréduction du DCPIP et du cytochrome b-559 par l'atrazine et le DCMU chez les PSII d'épinard.....	106
46. Représentation semi-logarithmique de la photo- réduction du cytochrome b-559 en fonction du temps.....	107

47. Induction du photocourant des thylacoïdes natifs et immobilisés.....	114
48. Inhibition du photocourant par l'atrazine.....	115
49. Inhibition du photocourant par le Na_2SO_3	117
50. Inhibition du photocourant par le NaNO_2 et le CuCl_2	118
51. Inhibition du photocourant par le ZnCl_2 et le CdCl_2	120
52. Inhibition du photocourant par le HgCl_2 et le PbCl_2	122
53. Inhibition du photocourant par le DCMU en fonction de la concentration de chlorophylle.....	124
54. Simple réciproque du photocourant en fonction de la concentration de chlorophylle.....	125
55. Inhibition du photocourant par l'atrazine chez des thylacoïdes immobilisés.....	127

56. Inhibition du photocourant par le DCMU chez des thylacoïdes immobilisés.....	128
---	-----

LISTE DES ABREVIATIONS

Atrazine, 2-chloro-4-éthylamino-6-isopropylamine-s-triazine

BP, bas potentiel

CCCP, carbonyl cyanide-m-chlorophénylhydrazone

Chl, chlorophylle

CP, complexe protéique

DCMU, 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurea

DCPIP, 2-6 dichlorophénolindophénol

DMSO, diméthyl sulfoxide

DPC, diphénylcarbazine

EDTA, acide éthylènediaminetétraacétique

FCCP, carbonyl cyanide-p-trifluorométhoxyphénylhydrazone

Fd, ferrédoxine

HP, haut potentiel

K, constante de liaison

PMSF, phénylméthyl-sulfonyl fluoride

PSI, photosystème I

PSII, photosystème II

Q_A, premier accepteur du PSII

Q_B, deuxième accepteur d'électrons du PSII

TES, acide N-Tris [hydroxyméthyl] méthyl-2
-aminoéthanesulfonique

X_t, nombre de site de liaison

Z, premier donneur d'électrons au P680

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Objectifs du travail

Le réseau interne et complexe de membranes chloroplastiques, appelées thylacoïdes, est bien connu comme étant le siège de capture de l'énergie photonique dans le but de générer un transport d'électrons (Menke, 1962) (Fig. 1). La lumière est absorbée par des molécules de chlorophylle, lesquelles sont associées aux complexes protéiques qui constituent les membranes thylacoïdiennes (Junge, 1977). L'énergie lumineuse est transférée au centre réactionnel et absorbée par un dimère de chlorophylle-a. Il y aurait environ 220 à 260 molécules de chlorophylle par centre réactionnel du PSII, avec un rapport Chl a/Chl b \approx 2 (Ghanotakis, 1984; Murata, 1984). De cette concentration importante de chlorophylle-a, seulement de 4 à 6 sont associées aux protéines D1 et D2 (Namba, 1987); ce qui signifie que le CP47 et le CP43 lient chacun environ 30 molécules. La protéine D1 qui sera longuement discutée dans ce travail possède une nomenclature variée dépendant des auteurs; B (Bourges-Bocquet, 1973), R (Velthuis, 1974), Q_B (Crofts, 1983), Q₂ (Wraight, 1977), Q_{II} (Okamura, 1982) et enfin D1 dans les

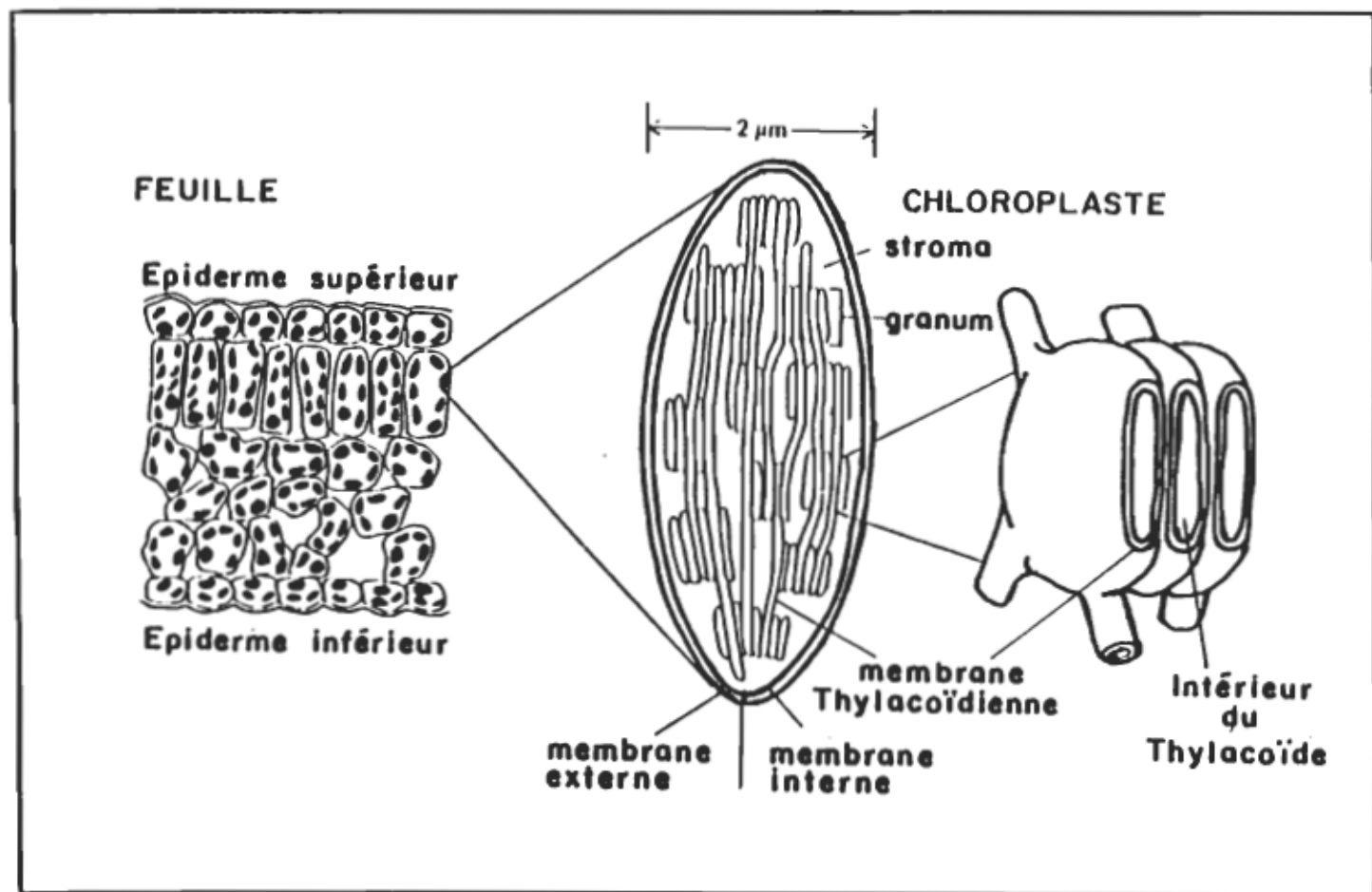


Figure 1. Structure interne et localisation du chloroplaste.

ouvrages récents. L'absorption des quanta de lumière par une molécule de chlorophylle du centre réactionnel, résulte en l'excitation et la perte d'un électron vers un accepteur adjacent, ce par quoi la séparation de charge est initiée (Sauer, 1979), (Fig. 2).

Le mécanisme de l'oxidation de l'eau peut être représenté par :



Cette réaction ne se produit pas en une seule étape (Renger, 1978). Le modèle généralement accepté de Kok et ses collaborateurs (Joliot et Kok, 1975), prédit que les cycles de scindement de l'eau se produisent à travers cinq états d'oxydation, appelés S. Donc pour chaque molécule d'eau, deux électrons sont lâchés pour ainsi réduire le centre réactionnel du photosystème II (PSII), voir Fig. 2. Ces électrons sont transférés à travers une large échelle de potentiels rédox, et ce avec la coopération des deux photosystèmes qui facilitent l'élévation des électrons d'un état rédox très positif (l'oxidation de l'eau) jusqu'à l'état suffisamment négatif pour réduire le NADP^+ . PSII et PSI sont en communication l'un et l'autre via une série de transporteurs, lesquels sont généralement représentés par le modèle du schéma en Z (Hill, 1960), voir Fig. 2.

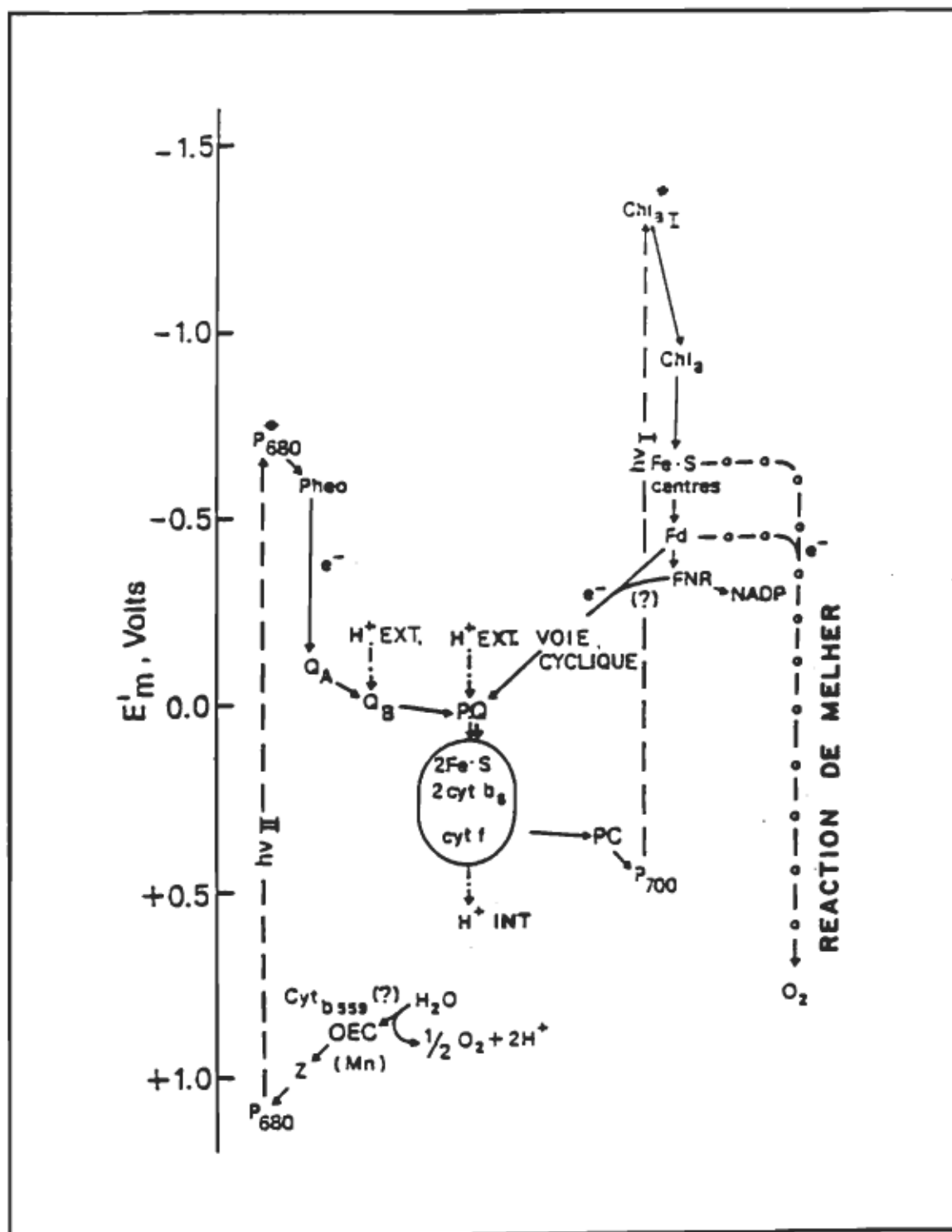


Figure 2. Transport d'électrons à travers le thylacoïde.

Les thylacoïdes se présentent sous forme de compartiments structuraux empilés et non-empilés où les photosystèmes ont une distribution hétérogène (Fig. 3). Anderson et Andersson (1981) ont démontré qu'il y a une distribution inégale des complexes pigment-protéine dans les régions empilées et non-empilées de la membrane. Les lamelles du stroma et les régions non-empilées de la membrane, lesquelles contiennent environ 30% de la chlorophylle totale, sont constituées de seulement 10-20% de PSII le reste étant presque totalement du PSI. Au contraire, les grana (régions empilées) sont très riches en PSII et en L.H.C. et substantiellement dépourvus en PSI (Foyer, 1984). Ces précisions sont d'une utilité capitale lors d'isolation membranaire de PSII et PSI dans le but de mieux élucider leurs interactions chimiques et biophysiques avec leur milieu.

Suivre le flux d'électrons et bien en connaître les interactions est capital pour analyser le jeu des inhibiteurs et des donneurs d'électrons à travers la chaîne. Dans le contexte de ce travail, l'accent sera mis particulièrement sur les éléments qui constituent le PSII. Comme mentionné plus haut, après le scindement de deux molécules d'eau, les quatre électrons produits, participent au "turnover" du centre réactionnel et ainsi une molécule d'oxygène est dégagée. Le complexe de dégagement d'O₂ participe donc au cycle des cinq états d'oxydation appelés S₀ à S₄ (Kok, 1970).

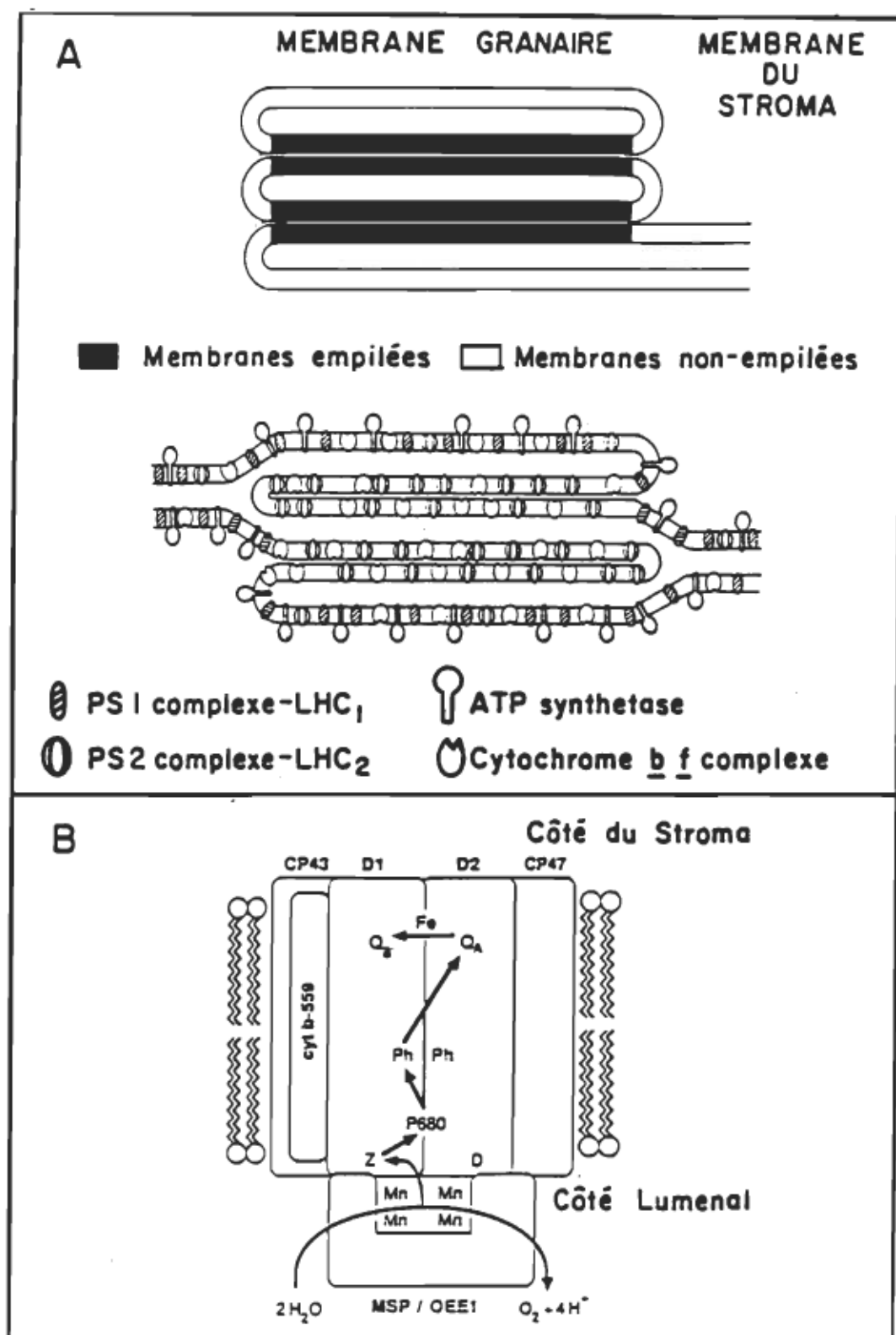
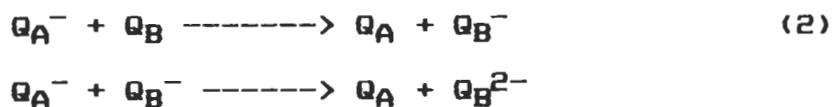


Figure 3. A) Hétérogénéité des complexes protéiques dans le thylacoïde; B) Protéines constituant le PSII.

Ces électrons sont captés et emmagasinés par le P680, par l'intermédiaire de Z (Joliot, 1972; Bouges-Bocquet, 1980; Brettel, 1984), afin que s'écoule un cycle complet d'oxydo-réduction. Le P680 excité, lègue ces électrons un à un à la phéophytine (Klimov, 1980), suivie des plastoquinones Q_A et Q_B , première et deuxième quinone, accepteurs d'électrons de la chaîne du photosystème II, respectivement (Nugent, 1981; Evans, 1982; Rutherford, 1984). On a donc:



Nous observons ainsi une accumulation de deux électrons au niveau du deuxième accepteur du photosystème II. Les électrons sont par la suite transférés au bassin de plastoquinones (Rich, 1981; Velthuys, 1982). Donc si on résume l'activité au niveau de Q_B en quelques étapes:

- 1° un électron est distribué de Q_A^- réduit vers Q_B .
- 2° le deuxième accepteur d'électrons Q_B^- est stabilisé dans une "poche" de l'apoprotéine D1.
- 3° un second électron de Q_A^- (reréduit par le centre réactionnel du PSII) est transféré au site du second accepteur pour former l'anion doublement réduit, Q_B^{2-} .
- 4° cet anion est par la suite protoné et subséquemment

relâché de l'apoprotéine pour former PQH₂ via le bassin de plastoquinones.

La chaîne d'électrons se poursuit ainsi jusqu'au centre réactionnel du photosystème I par l'entremise du complexe des cytochromes b₆ et f (pour une revue détaillée de cette section, voir Foyer 1984).

Les triazines constituent un type d'herbicides bien connus qui inhibent le transfert d'électrons entre Q_A et Q_B (Arntzen, 1982; Vermaas 1984). Ces inhibiteurs se lient au polypeptide D1 du centre réactionnel du PSII sur le site Q_B (Mullet, 1981). Le poids moléculaire de cette protéine a fait l'objet de plusieurs recherches, et c'est d'ailleurs avec cette importante donnée (32 KDa: Gardner, 1981; Mullet, 1981; Pfister, 1981; Steinback, 1981; Kyle, 1983) qu'on peut à coup sûr, "suivre" cette protéine. Les herbicides du type triazine (Fig. 4) sont bien caractérisés fonctionnellement comme jouant un rôle de premier plan lors de la délocalisation (déplacement) de Q_B de son site d'action (Wraight, 1981; Velthuys, 1981; Crofts, 1983; Vermaas, 1983); ce processus est aussi réversible (Vermaas, 1984). Plusieurs biotypes sont maintenant connus pour développer une résistance naturelle à l'atrazine via un changement des propriétés du PSII (Arntzen, 1979). Le gène qui code pour la protéine D1 (appelé psbA) fait partie du génôme chloroplastique. La séquence d'acides

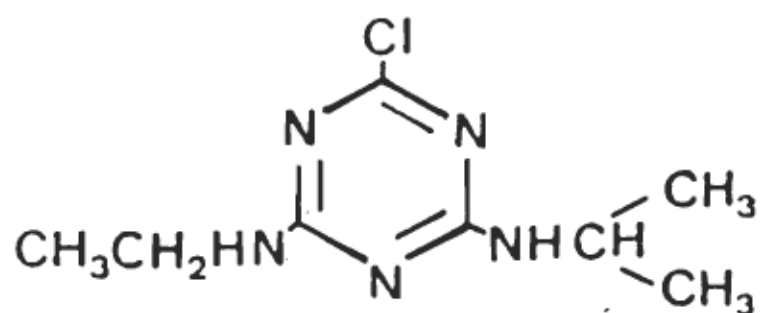
aminés des deux biotypes, soit résistant et sensible, a été comparée; les plantes résistantes contiennent seulement une substitution d'une sérine par une glycine (ces expériences ont été faite chez Amaranthus par Hirschberg, 1983).

L'idée d'un deuxième site d'action des triazines, localisé du côté donneur du PSII, est un sujet d'actualité. Par contre la nature du site d'action reste un thème controversé. Plusieurs rapports mentionnent la présence d'un authentique site de liaison (Schmid, 1977; Carpentier, 1985a, Carpentier, 1985b; Ikeuchi, 1988; Vasil'ev, 1988a; Vasil'ev, 1988b). L'effet inhibiteur du côté donneur du photosystème est aussi interprété en terme de modification conformationnelle de la portion luménale, du centre réactionnel du PSII, induite par la liaison de l'herbicide à Q_B (Trebst, 1987). Une partie de cette étude sera réservée à l'analyse d'un deuxième site d'action du côté luménal du photosystème II.

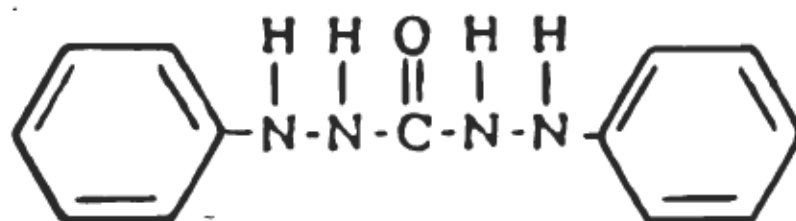
La méthodologie employée ici est basée sur le pouvoir réducteur relatif attribué aux différents donneurs artificiels d'électrons. Pour ce faire deux particules membranaires sont utilisées, soit les membranes thylacoïdiennes entières et des particules enrichies en PSII. Dans le cas de membranes entières, l'accessibilité aux deux sites (luménale et Q_B) est très différente; sachant que la membrane est refermée et non-fractionnée, il est plus difficile, voire même impossible pour une molécule peu hydrophobe de pénétrer du côté luménal à faible

concentration. En faisant varier les concentrations d'inhibiteurs, comme l'atrazine, il sera plus facile de déceler sur quelle face membranaire l'inhibiteur agit. Pour faire une comparaison équitable, ces résultats sont comparés avec ceux des particules de PSII. Les particules membranaires utilisées ont été isolées chez des biotypes résistants et sensibles à l'atrazine de Chenopodium album L., Amaranthus Powellii S Wats et Brassica rapa L., toutes des espèces nuisibles principalement aux cultures de maïs. Les donneurs artificiels d'électrons utilisés (DPC et $MnCl_2$), de par leur site d'action, situé dans la région de Z, nous donnent une information capitale sur l'emplacement du site d'action de l'inhibiteur par rapport à la chaîne de transport d'électrons. Comme énoncé plus haut, l'inhibiteur étudié est l'atrazine.

Un aspect à ne pas négliger est certainement la capacité ou la facilité pour un donneur artificiel, de céder ses électrons. A la lumière des résultats obtenus, il est clair que le DPC n'a pas le même "pouvoir" réducteur que le $MnCl_2$ qui a pourtant à peu près le même site d'action. Cet aspect est étudié en profondeur, pour ainsi en comprendre les différentes avenues du point de vue interactions donneur/inhibiteur. Cette dernière idée est appuyée au niveau chimique par la ressemblance des deux molécules (DPC-atrazine, voir figure 4). Plusieurs approches analytiques ont



ATRAZINE (s - triazine)



DIPHENYLCARBAZIDE (DPC)

Figure 4. Structure moléculaire de l'atrazine et du diphénylcarbazide.

été utilisées pour corroborer l'hypothèse d'une compétition DPC-atrazine, et ce autant du côté donneur qu'accepteur. Le DCMU est introduit à l'étude, vu ses propriétés inhibitrices et chimiques comparables à l'atrazine, pour bien caractériser la spécificité du ou des sites d'action.

Les membranes thylacoïdiennes des cellules eucaryotes contiennent deux types de cytochromes-b avec une bande d'absorption à 559 nm. Ces deux formes peuvent être distinguées par leur potentiel rédox moyen. Le cytochrome b-559 à haut potentiel (b-559_{HP}) présente un potentiel de +330 à +400 mV à pH 7-8 (Knaff, 1975; Horton, 1976; Rich, 1980). Les proportions de b-559_{HP} varient selon le type de plante, mais peuvent quand même compter pour un peu plus de la moitié du cytochrome total. Le cytochrome b-559 à bas potentiel (b-559_{BP}) possède un potentiel rédox moyen de +50 à +120 mV à pH 7-8 (Fan, 1970). Le cytochrome b-559_{BP} serait donc un accepteur d'électrons du PSII, tandis que celui à haut potentiel (b-559_{HP}) agirait comme donneur d'électrons au PSI (Losada, 1983; Hervas, 1985). Il y aurait par ailleurs deux cytochromes par centre réactionnel (Murata, 1984; Whitmarsh, 1984; Yamada, 1987).

Le cytochrome b-559 est donc photooxydable en présence de différents inhibiteurs du côté donneur du PSII (Knaff, 1969; Maroc, 1979; De Paula, 1985), et peut être photoréductible via Q_B ou le bassin de plastoquinones

(Tsujiimoto, 1985). Le cytochrome b-559_{gp} étant très stable, serait une forme altérée et non physiologique du cytochrome à haut potentiel (Heber, 1979; Tsujiimoto, 1985; Cramer, 1986; Rao, 1986; Barber, 1987).

Du point de vue moléculaire le cytochrome (sous ses deux formes) a été grandement étudié par plusieurs méthodes. D'après une modification des travaux de Garewal et Wasserman (1974), la complète dénaturation du complexe préalablement obtenu par ceux-ci mène à estimer le poids moléculaire du cytochrome b-559 aux environs de 9-10 KDa (Zielinski, 1980). La séquence d'acide aminés déduite révèle un polypeptide de 9.4 KDa (Widger, 1984; Widger 1985). Une étude plus approfondie (Tae, 1988; Vallon, 1989) détecte, chez le cytochrome purifié, la présence de deux polypeptides appelés α et β (dont le poids moléculaire chez l'épinard est de 9182 et 4268 Da, respectivement). La sous-unité α serait exposée à la face luménale de la membrane (Vallon, 1989). De plus, les deux formes du cytochrome auraient approximativement la même masse moléculaire (Ortega, 1989).

Le rôle du cytochrome reste encore énigmatique au niveau fonctionnel; il a tout de même été suggéré qu'il serait impliqué dans un mécanisme de sécurité, gardant le P680 dans sa forme réduite contre l'éventualité d'une perte d'activité du complexe de scindement de l'eau (Bendall, 1982). Ces aspects sont abordés en focalisant d'abord l'étude sur les quantités de cytochrome pour plusieurs types de plantes

autant résistantes que sensibles. Par le biais de l'oxydation et la réduction du cytochrome, l'analyse se poursuit dans l'optique d'élucider les mécanismes à l'origine des subtilités de son comportement. Par le biais d'inhibiteurs de types triazines, on peut mieux joindre les morceaux manquants à la compréhension de son rôle fonctionnel.

Une cellule photoélectrochimique a été utilisée pour étudier l'effet d'herbicides et de plusieurs métaux lourds sur les membranes thylacoïdiennes. Ce système à trois électrodes permet d'utiliser la séparation de charges de la photosynthèse pour en générer un photocourant. Ces analyses ont été faites avec des membranes thylacoïdiennes entières à partir de feuilles d'épinard.

L'idée d'utiliser la cellule comme biosenseur d'herbicides est introduite. Plusieurs mesures ont été faites avec l'atrazine et le DCMU à plusieurs concentrations. Des thylacoïdes natifs et immobilisés ont servi de modèle pour tester la sensibilité de la méthode.

1.2 Théories spectroscopiques

1.2.1 Photoréduction du DCPIP La réaction de Hill est une réaction d'oxydo-réduction photochimique, catalysée par les chloroplastes. L'eau est le donneur d'hydrogène et l'oxygène est libéré, suite à la photolyse de l'eau. L'accepteur d'hydrogène est une substance oxydante tels: l'oxalate ferrique (réactif de Hill), la pyridine nucléotide, le cytochrome c, ou encore le 2-6 dichlorophénolindophénol (DCPIP). En absence d'accepteur artificiel ajouté, l'accepteur d'hydrogène est le CO_2 . D'une façon schématique:



La réaction peut être étudiée en mesurant le volume d'oxygène dégagé ou en mesurant la réduction de l'accepteur d'hydrogène (Izawa, 1970; Izawa, 1980). Le DCPIP utilisé comme oxydant est bleu sous sa forme oxydée et incolore sous sa forme réduite. La réduction y est donc exprimée par la diminution de la densité optique à 600 nm.

1.2.2 Photoréduction et photooxydation du cytochrome

b-559. Le cytochrome b-559 à haut potentiel est sous forme réduite à l'obscurité (Horton, 1976). Ainsi, la lumière induit un changement d'absorbance mesurable, qui est directement relié à la quantité de cytochrome. Les réactions

d'oxydoréduction étudiées permettent donc de mieux comprendre son implication lors du transport d'électrons.

Les cytochromes b-559 à bas et à haut potentiel peuvent être détectés par leurs changements d'absorbances, en utilisant les réducteurs spécifiques à leur état rédox.

ferricyanure -----> oxyde le cytochrome à haut potentiel

hydroquinone

plastoquinol -----> réduisent le cytochrome b-559_{HP}

ferrocyanure (Rich, 1980)

ascorbate réduisent le cytochrome à bas

dithionite -----> potentiel (Lam, 1983; Whitford, 1984)

Les différents inhibiteurs du PSII du type triazine sont couramment utilisés pour analyser en profondeur le cheminement des électrons via le cytochrome b-559.

La photooxydation du cytochrome à haut potentiel préréduit, a été étudiée dans des fractions membranaires illuminées. L'addition de FCCP (ou le CCCP), à des membranes thylacoïdiennes, accélère ce processus. Pour rereduire le cytochrome, une forte intensité lumineuse est nécessaire pour lever l'inhibition partielle de l'enzyme impliqué lors du

scindement de l'eau par le FCCP (Cramer, 1972). La photooxydation est un mécanisme où il faut tout particulièrement tenir compte de l'intensité lumineuse appliquée (Heber 1979). La photooxydation n'est souvent permise qu'à faible intensité lumineuse; probablement du au fait que le dégagement d'oxygène compétitionne avec le cytochrome pour une oxydation équivalente et aussi parce qu'il y a une augmentation de la "pression réductrice" du bassin de plastoquinones. Il existe donc un cycle de réduction/oxydation obtenu par l'alternance des expositions à faible et à forte intensité lumineuse. Par contre, dans les deux cas, un inhibiteur de type triazine peut inhiber les réactions de photoréduction (Ben-Hayyim, 1971). Il est à noter qu'une photooxydation peut être observée en absence de FCCP si le système de scindement de l'eau a été complètement inhibé par le chlorure de terbium (Nakatani, 1984).

Le cytochrome b-559 est encore sur plusieurs points problématique mais quelques fonctions ont quand même été proposées:

1^o comme catalyseur du système de scindement de l'eau (Butler, 1978).

2^o impliqué dans le transport d'électrons facultatif entre le PSII et le PSI (Horton, 1975; Whitmarsh, 1977).

3^o transport d'électrons cyclique autour du PSII (Cramer, 1972; Radmer, 1975).

4^0 impliqué dans la translocation de protons (Butler, 1978; DeLaRosa, 1981).

Donc d'après ces assertions, le donneur d'électrons au cytochrome b-559 a été localisé entre le premier accepteur d'électrons du PSII et le cytochrome f. Expérimentalement cette conclusion est basée sur l'action du 2,5-dibromo-3-méthyl-6-isopropyl-p-benzoquinone (dibromoythymoquinone) bloquant le transport d'électrons entre le bassin de plastoquinones et le cytochrome f (Böhme, 1971a; Böhme, 1971b), inhibant ainsi la photooxydation mais pas la photoréduction du cytochrome b-559 (Whitmarsh, 1977; Böhme, 1971a); (c'est possible que dans ce cas, la molécule inhibitrice, soit régie par une dualité fonctionnelle du côté donneur du PSII). Comme déjà mentionné plus haut, l'atrazine inhibe le transport d'électrons au niveau du deuxième accepteur et peut ainsi bloquer complètement la photoréduction.

1.3 Cellule photoélectrochimique

Comme illustré à la figure 5, la cellule électrochimique est constituée d'une pièce de caoutchouc compressée entre deux blocs rigides. Le matériel liquide peut ainsi pénétrer dans la chambre (80 μ l) par le cannal supérieur, traversant le couvercle de plexiglass; pour ensuite laisser place à l'électrode de référence (au calomel). La cellule fonctionne sur un mode potentiostatique ou le maximum d'efficacité a été établi à 750 mV (Lemieux, 1988).

On peut donc capter les électrons véhiculés par la chaîne de transport d'électrons, à l'aide d'une électrode de platine (Allen, 1976; Carpentier, 1987). Dû à la génération d'électrons par le PSII, le PSI, au niveau du complexe Fe-S, peut ainsi par un mécanisme de réduction de l'oxygène dissous, former un superoxyde (réaction de Melher, 1951):



Le peroxyde d'hydrogène réagit avec l'électrode de travail en lui léguant un électron (Salin, 1987). Ces électrons ainsi

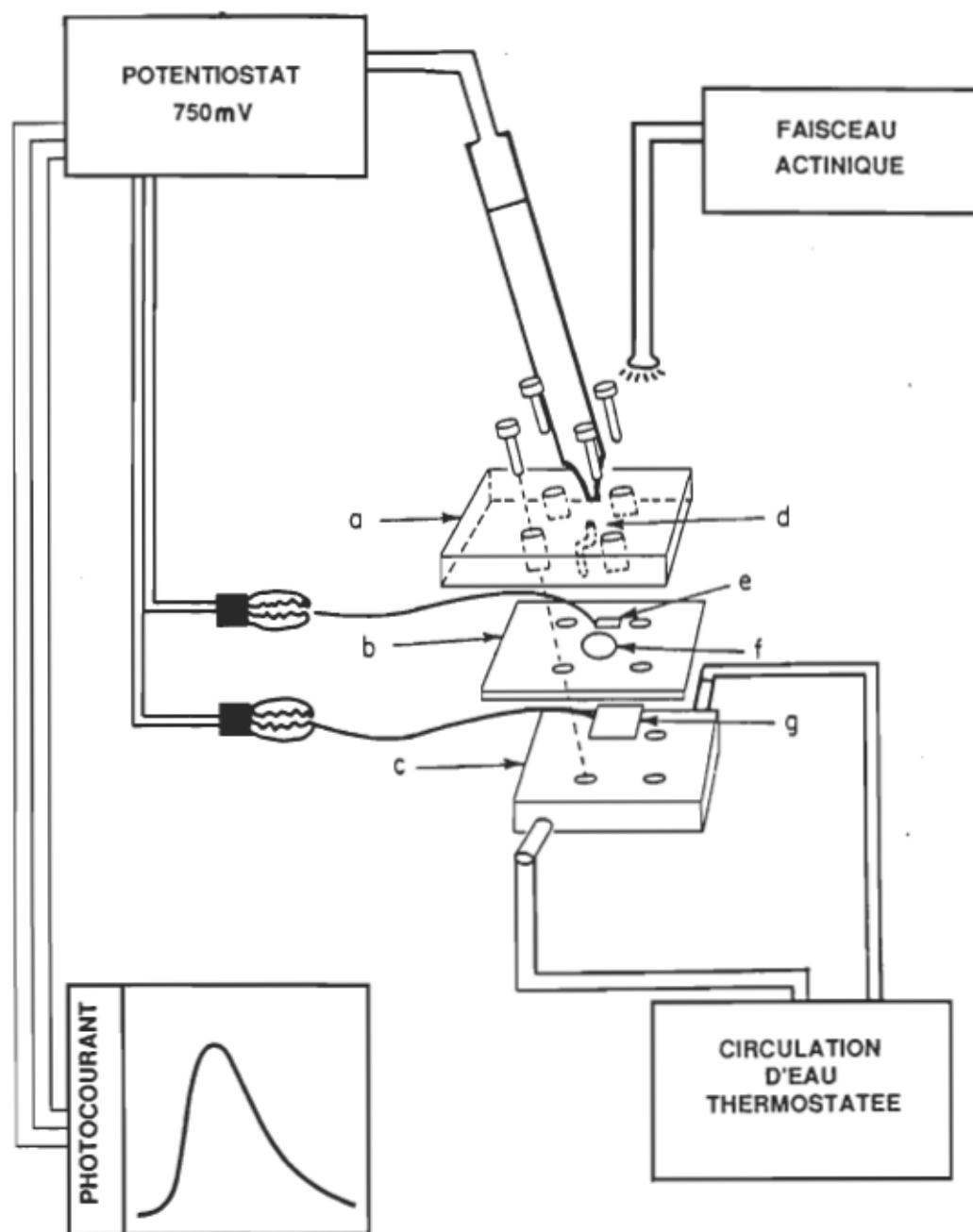


Figure 5. Représentation schématique de la cellule photoélectrochimique; a, couvercle de plexiglass; b, pièce de caoutchouc; c, base d'acier; d, cannel pour l'électrode de référence au calomel; e, contre électrode; f, chambre de la cellule; g, électrode de travail.

captés par le platine servent à la génération de photocourant (Greenbaum, 1989).

En utilisant des particules membranaires enrichies soit de PSII ou de PSI au lieu des thylacoïdes entiers, il est tout de même possible de faire réagir électriquement le platine. Le PSII nécessite un accepteur artificiel d'électrons tandis que le PSI requiert un donneur d'électrons (Mimeault, 1988; Lemieux, 1988). Le photosystème II produit une photoactivité maximale à pH 6.0 et présente un comportement photocourant-voltage monophasique. Au contraire, l'induction de photocourant par le photosystème I est maximale à pH 8.0 et une dépendance photocourant-voltage biphasique a été obtenue résultant probablement d'une barrière de potentiel rédox localisée du côté donneur du photosystème I (Mimeault, 1988).

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

2.1 Produits utilisés

La provenance des produits de même que leurs propriétés et/ou puretés sont indiquées dans le tableau 1.

2.2 Spectrométrie UV-visible

Les spectres mesurant les changements d'absorbance en fonction du temps ont été déterminés en utilisant un spectrophotomètre PERKIN-ELMER model 553 à double faisceau. Les mesures sont effectuées à 600 nm avec une résolution de 1 nm.

Les changements d'absorbance de la photoréduction et de la photooxydation du cytochrome b-559 sont très faibles. Ces mesures ont donc été prélevées grâce à un spectrophotomètre UV-VIS SLM AMINCO modèle DW-2000 en utilisant les deux monochromateurs dont un comme référence; la résolution étant fixée à 3 nm. Les courbes sont directement reproduites à l'aide d'une traceuse Hewlett-Packard modèle 7470A.

TABLEAU 1

CARACTÉRISTIQUES DES PRODUITS UTILISÉS

Produits	Provenance	Propriétés et/ou pureté
CHIMIQUE		
Acétone	Anachemia	pur.--> 99.5%
acide chlorhydrique	Fisher	sol.--> 1N
Albumine bovine (BSA)	Sigma	pur.--> 98-99%
Atrazine		pur.--> 90% (plus filtration)
Atrazine- ¹⁴ C	CIBA-GEIGY	act. sp.--> 19.5 µCi/mg pur.--> 97.1%
Borohydrure de sodium	Sigma	pur.--> plus de 98%
Catalase	Sigma	provenant de foie de boeuf. act.--> 10000-30000 unités/mg de protéine
1,4 Dioxane	Fisher	pur.--> 99%

TABLEAU 1 (suite)

DCMU	Sigma	pur.--> 80%
DMSO	Sigma	pur.--> plus de 99%
Eau	Lab. U.Q.T.R.	distillée-diminéralisée résistivité: 18 meg -ohms tension superficielle: $\geq 70 \pm 1$ dynes cm^{-1}
Ferricyanure de potassium	Sigma	pur.--> 99%
Glutaraldehyde	Sigma	25% solution aqueuse
Hydroquinone	Sigma	pur.--> plus de 99%
Hydrosulfite de sodium	Sigma	pur.--> 80%
PMSF	Sigma	Inhibe les protéases

VEGETALE:

<u>Amaranthus Powellii</u>	Champs de maïs	Biotype:	sens.
<u>S Wats</u>	du Québec		res.
<u>Brassica rapa L.</u>	" "		" "
<u>Chenopodium</u>	" "		" "
<u>album L.</u>			

TABLEAU 1 (suite)

Epinard	Supermarché	---
Orge	Chambre de	---
	croissance U.Q.T.R.	---

2.3 Electrode à oxygène

Le dégagement d'oxygène formé lors de la photolyse de l'eau, peut être un bon indice de l'activité électronique de la plante (voir section 1.1). Ces mesures sont effectuées avec une électrode à oxygène (type Clark) avec un moniteur YSI modèle 53. L'environnement de la cellule est thermostaté par un bain d'eau circulante (22°C).

2.4 Production de photocourant

Le photocourant mesuré pour tous les échantillons est évalué en mode potentiostatique (750 mV); fourni par un potentiostat à balayage de marque EG and G (modèle 362). L'électrolyte est en contact constant avec le potentiostat à l'aide d'une électrode de référence au calomel. Le montage est illustré à la figure 5. Pour la théorie se reporter à la section 1.3.

2.5 Description des méthodes

2.5.1 Particules membranaires

Tout les extraits membranaires, d'espèces et de biotypes différents, sont traités de façon identique. Ainsi, toutes les centrifugations sont effectuées dans une centrifugeuse Sorval RC-5B avec un rotor SS-34 à godets fixes et ce à 4°C.

i) Extraction des membranes enrichies en photosystème II

Environ 150 g de feuilles sont lavées, asséchées puis homogénéisées 3 ou 4 fois pendant 5 secondes (dépendant de la texture des feuilles) à vitesse maximale dans un homogénéisateur commercial. Le tampon d'homogénéisation est constitué de Tricine-NaOH 50 mM à pH 7.6, NaCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM; et juste avant son utilisation, nous avons ajouté 400 mM de sorbitol, 1 mM de phénylméthyl-sulfonyl fluoré (PMSF) et 1% d'acide ascorbique dans un volume final de 300 ml. L'homogénat est filtré sur coton fromage (12 couches) et centrifugé 6 minutes à 2000 x g. Le culot est resuspendu dans 60 ml d'un tampon constitué de Tricine-NaOH 50 mM (pH 7.6), NaCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM et 1% d'acide ascorbique et recentrifugé dans les mêmes conditions que précédemment. Le culot est resuspendu dans un volume minimal du même tampon. L'extrait est incubé dans un tampon contenant 10 mM de Mes-NaOH (pH 6.0), 1 mM MgCl₂, 3 mM NaCl, 6 mM d'acide

ascorbique, 0.062 unités/ml de catalase et 4% de Triton X-100 pendant 20 min à l'obscurité et à 4°C, pour l'obtention d'une solution à 1 mg Chl/ml, suivi d'une centrifugation de 10 min à 3500 x g. Le surnageant est recentrifugé 30 min à 17500 x g, et ainsi le culot est finalement resuspendu dans un tampon Mes-NaOH 20 mM (pH 6.0), NaCl 15 mM et MgCl₂ 10 mM, à une concentration de 2 mg Chl/ml. (Pour chacune des expériences, l'activité des membranes de PSII se situe entre 280 et 340 μM DCPIP/mg Chl·h).

ii) Extraction des membranes thylacoïdiennes

Environ 150 g de plantes sont lavées, asséchées et homogénéisées dans les mêmes conditions que pour les particules de PSII. Le tampon d'homogénéisation est constitué de 330 mM de sorbitol, 5 mM de MgCl₂ et 20 mM de Tes-NaOH (pH 7.5), dans un volume final de 300 ml. L'homogénat est filtré sur 12 couches de coton fromage et centrifugé une minute à 2000 x g. Le culot est resuspendu dans le tampon d'homogénéisation dilué 20 fois et centrifugé une minute à 4000 x g. Finalement le culot est resuspendu dans un tampon contenant du Tes-NaOH 50 mM (pH 7.5), 330 mM de sorbitol, MgCl₂ 2 mM, NH₄Cl 1 mM et 2 mM de EDTA, avec un volume minimal pour ainsi obtenir un extrait à 2 mg Chl/ml. (Pour chacune des expériences, l'activité des membranes thylacoïdiennes varie entre 200 et 280 μM DCPIP/mg Chl · h. et 430 μM O₂ ml⁻¹ · h⁻¹, pour chaque méthode).

iii) Immobilisation des membranes thylacoïdiennes

L'extraction des membranes se fait comme dans la section 2.5.1 ii), mais on resuspend dans un tampon phosphate; contenant 50 mM de tampon phosphate (NaH_2PO_4 et Na_2HPO_4) à pH 7.0, NaCl 150 μM et MgCl_2 à 1 mM. La matrice liquide est composée de tampon phosphate (18 mM), 5.6% d'albumine bovine (v/v) et 0.33% de glutaraldéhyde (v/v). Après avoir laissé reposer la solution deux minutes, on ajoute les membranes thylacoïdiennes pour obtenir une concentration finale en chlorophylle de 400 $\mu\text{g/ml}$. C'est ensuite mélangé à 4°C et rapidement congelé à -20°C pendant deux heures. La matrice ainsi obtenue se conserve à 4°C et à l'obscurité.

2.5.2 Méthodes/manipulations

i) Photoréduction du DCPIP Le milieu réactionnel est contenu dans une cuvette de 3 ml (30 μM de DCPIP pour 5 μg Chl/ml) et illuminé avec un faisceau actinique (halogène) au quartz de 150 W à intensité maximale. La lumière est préalablement filtrée par un filtre de 3 cm d'eau pour ainsi éviter la surchauffe des filtres et des échantillons; et deux filtres à transmittance spécifique, Schott RG 665 et Ealing 35-6857. Le phototube est protégé par un filtre à transmittance contrôlée dans le rouge (Ealing 35-5396 RTB). Les détails théoriques sont mentionnés dans la section 1.2.1.

Pour chaque mesure, un contrôle est prélevé du matériel végétal en présence d'éthanol pour chaque concentration de la solution d'atrazine. Le même type de vérification est effectuée dans le cas des solutions de DPC avec l'acétone.

ii) Mesures de dégagement d'oxygène Le milieu réactionnel de la cellule est formé de Mes-NaOH 20 mM à pH 6,5, NaCl 1 mM et de $MgCl_2$ 500 μ M pour un volume final de 3 ml. Le 2,5-dichloro-p-benzoquinone (DCBQ) est utilisé comme accepteur d'électrons artificiel au niveau du transfert entre Q_B et le bassin de plastoquinones. L'extrait membranaire est à 11 μ g de chlorophylle/ml. La solution est désoxygénée par un barbotage de 45 secondes à l'azote et éclairée à l'aide d'un projecteur (halogène) au quartz de 150 W à intensité maximale.

iii) Mesures de liaison de l'atrazine marqué (^{14}C -atrazine) Les mesures sont effectuées à l'aide de thylacoïdes extraits par la méthode décrite à la section 2.5.1 ii. L'atrazine radioactive est préalablement diluée dans l'éthanol (conc. finale <1%) et directement introduite dans le tampon de resuspension. La concentration en chlorophylle est fixée à 50 μ M, et l'extrait est maintenu dans un tube Eppendorff de 1.0 ml pour une incubation de 10 minutes. Après une centrifugation de 4 minutes, pour séparer l'atrazine lié aux membranes de l'atrazine libre, 750 μ l de

surageant sont prélevés pour l'analyse de l'atrazine libre et introduits dans 5 ml de liquide à scintillation. Des lectures ont été effectuées sur chaque échantillon pendant 10 minutes à l'aide d'un compteur à scintillation de marque LKB.

iv) Analyse du cytochrome b-559 Deux mesures importantes ont été effectuées autour de l'étude du cytochrome, soit la visualisation du changement d'absorbance en fonction de la longueur d'onde et les réactions de photooxydoréduction en fonction du temps. Le protocole expérimental varie légèrement dépendant du résultat escompté. Dans les deux cas, les membranes de photosystème II sont éclairées avec un projecteur du même type que celui mentionné plus haut et le spectrophotomètre fonctionne en mode double faisceaux.

Le tampon de réaction reste le même que celui de la resuspension du PSII, mesuré avec 125 µg Chl/ml. Les échantillons sont mesurés avec une incubation minimale, soit de quelques secondes. L'ordre des composés ajoutés est respecté et ainsi le temps entre chaque mesure du même échantillon est considéré constant. Le ferricyanure de potassium est ajouté le premier à raison de 2 mM suivi de l'hydroquinone 2 mM, de l'acide ascorbique 6 mM et de l'hydrosulfite de sodium en excès. Il faut préalablement réduire l'hydroquinone avec du borohydrure sodique et de l'acide chlorhydrique.

Les spectres d'oxydoréduction du cytochrome b-559 sont analysés dans un tampon contenant 20% de Ficoll (P/V), Tes-NaOH 50 mM (pH 7.5), $MgCl_2$ 1 mM, NaCl 10 mM, sorbitol 330 mM, $MnCl_2$ 1 mM et 0.07% d'EDTA (P/V) et dont la concentration en chlorophylle est de 250 $\mu g/ml$. La cuvette est éclairée par un projecteur (halogène) au quartz de 150 W et ce à travers un filtre de 3 cm d'eau et un filtre à transmittance contrôlée (Schott RG-665). Le tube photomultiplicateur est protégé par les filtres 4-76 et 4-96 de Corning.

Le cytochrome est mesuré selon une adaptation de la méthode de Houchins (1984), (voir la section résultats pour les précisions au sujet du ferricyanure de potassium et du FCCP).

v) Mesures photoélectrochimiques de l'inhibition

du photosystème II Les mesures sur les thylacoides sont effectuées dans leur propre tampon de resuspension à raison de 250 μg Chl/ml. Avec ce type d'analyse, l'électrode de travail est deux fois plus mince (0.025 mm) que l'électrode potentiostatique (0.050 mm), et le potentiel imposé est de 750mV. Après chaque mesure, la chambre de la cellule est lavée trois fois avec de l'eau distillée.

Dans le cas des membranes immobilisées, la matrice est préalablement infiltrée d'une solution contenant l'inhibiteur; chaque échantillon ne servant que pour une mesure.

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 Site d'action de l'atrazine du côté luménal du PSII

Les inhibiteurs de types triazines, dont l'atrazine fait partie, sont bien connus pour inhiber le transfert d'électrons entre les quinones Q_A et Q_B (Arntzen, 1982; Vermaas, 1984). La position de l'apoprotéine D1 a été identifiée pour la première fois à l'aide des gels de polyacrylamide-SDS par l'habileté intrinsèque de cette protéine à lier les herbicides. L'azidoatrazine fut employée pour caractériser la liaison covalente à une protéine de poids moléculaire de 32,000 daltons (Gardner, 1981; Mullet, 1981; Pfister, 1981; Steinback, 1981; Kyle, 1983). Les précisions qu'a apporté la biologie moléculaire, permettent maintenant de localiser l'effet de l'atrazine du côté accepteur de la protéine D1 du PSII. Etant donné que cette protéine est transmembranaire, l'étude d'un deuxième site d'action des inhibiteurs de types triazine du côté luménal (donneur) du photosystème II permet d'élaborer une stratégie bilatérale (dualité du site d'action). Le sujet est exploité en analysant séparément les deux côtés du PSII à l'aide de donneurs d'électrons artificiels agissant du côté luménal.

Du point de vue arrangement tridimensionnel, les particules membranaires de photosystème II et de membranes thylacoïdiennes entières sont très différentes. Les thylacoïdes, tel qu'extraits par la méthode décrite à la section 2.5.1 ii, sont complets et non-fractionnés. Ce qui résulte dans le fait que l'accessibilité aux différents sites varie selon qu'on est du côté du stroma ou du lumen. Il est donc plus difficile pour une molécule peu hydrophobe d'atteindre le côté donneur d'électrons que d'interagir du côté accepteur. Par contre, les membranes enrichies en photosystème II sont fractionnées (par l'effet du Triton) et donc l'accessibilité aux deux sites est semblable. Ce concept s'avère capital dans l'élucidation du site d'action de l'atrazine sur le PSII.

Les figures 6, 7 et 8 démontrent la levée de l'inhibition (du transport d'électrons) due à la présence du DPC, un donneur artificiel d'électrons. Le DPC est reconnu comme étant actif au niveau luménal du PSII dans la région de Z (Schmid, 1977; Dekker, 1984), premier donneur d'électrons au P680 (Rich, 1987; Demetriou, 1988). Dans les particules membranaires de PSII de Chenopodium album L. (Fig. 6), une forte concentration d'atrazine (10^{-4} M) réussit à inhiber 83% de l'activité photosynthétique chez le biotype sensible; par contre à mesure que la concentration en DPC augmente, cette inhibition est levée et ce de façon significative. Ainsi,

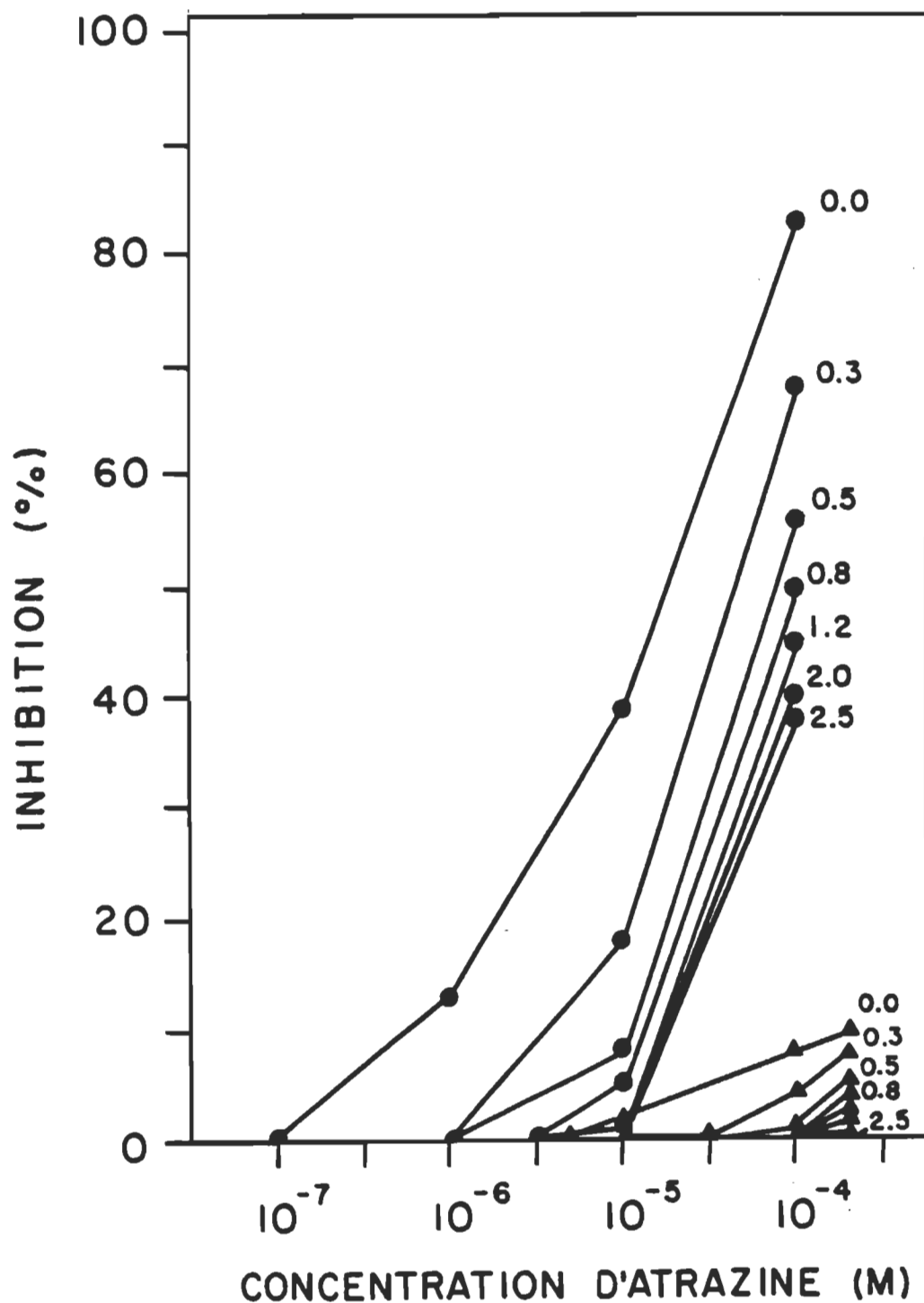


Figure 6. Inhibition de la photoréduction du DCPIP par l'atrazine en présence de DPC chez des PSII de *Chenopodium album* L. sensibles (●) et résistants (▲). Les chiffres adjacents aux tracés indiquent la concentration de DPC (mM).

lorsque la concentration de donneur artificiel est augmentée à 2.5 mM, l'inhibition est réduite à 38% et cela même à cette forte concentration d'atrazine. Ce résultat est tout à fait admissible si nous faisons l'hypothèse d'un site d'action de l'atrazine du côté donneur du PSII et compte tenu du fait que l'accessibilité aux sites d'inhibition est homogène chez les particules de PSII, d'où cette levée d'inhibition significative (45%). En abaissant la concentration d'inhibiteur dans le milieu réactionnel à 10^{-5} M, il est beaucoup plus facile de lever l'inhibition. Ainsi, une concentration en DPC de 2.0 mM élimine toute trace d'inhibition par rapport au témoin. A 10^{-6} M d'atrazine, on réussit à supprimer toute l'inhibition avec une quantité minimale de donneur d'électrons artificiel (0.3 mM).

On remarque déjà à prime abord, qu'avec de faibles concentrations d'atrazine autant qu'avec de fortes concentrations, on réussit à lever l'inhibition dans une proportion similaire. On peut donc supposer que l'atrazine se lie au niveau Q_B ainsi que du côté luménal à forte concentration autant qu'à faible concentration; ce qui explique la régularité du mode d'action du diphénylcarbazine. Dans le cas du biotype résistant à l'atrazine, l'inhibition maximale atteinte est de 10% avec une concentration de 3×10^{-4} M en absence de DPC. Une concentration de 10^{-5} M réussit à inhiber seulement 2% de l'activité photosynthétique, et ce en absence de DPC, contre 39% chez le biotype sensible. La

levée d'inhibition suit le même schème que chez le biotype sensible; soit une levée proportionnelle à la diminution d'inhibiteur du PSII.

Pour s'assurer de la reproductibilité de ces résultats, deux autres espèces ont été étudiées. Les courbes présentées à la figure 7 (Amaranthus) diffèrent légèrement de celles de Chenopodium à causes de différences structurales et physiques de chaque espèce de membrane. L'inhibition du transport d'électrons par une concentration de 10^{-4} M d'atrazine atteint 91% en absence de DPC. De faibles quantités de donneurs artificiels d'électrons lèvent une proportion importante de l'inhibition, soit par exemple 41% avec 0.5 mM de DPC. Il est, par contre, beaucoup plus difficile d'évaluer le biotype résistant vu son très faible taux d'inhibition; avec une concentration moyenne d'atrazine (10^{-5} M), l'activité photosynthétique n'est pas affectée. Les résultats obtenus avec une troisième espèce, Brassica rapa, corroborent ceux des deux espèces précédentes (Fig. 8). On remarque que Brassica rapa L. est plus sensible à l'atrazine puisque à fortes concentrations (1×10^{-4} à 3×10^{-4} M), le transfert d'électrons entre les quinones Q_A et Q_B est complètement inhibé chez le biotype sensible. Par contre l'effet d'inhibition est considérablement réduit à de plus faibles concentrations d'atrazine (10^{-5} M), pour ainsi faire chuter l'inhibition de 100% à 58% et encore à 7% en présence de 10^{-6} M d'atrazine en absence de DPC.

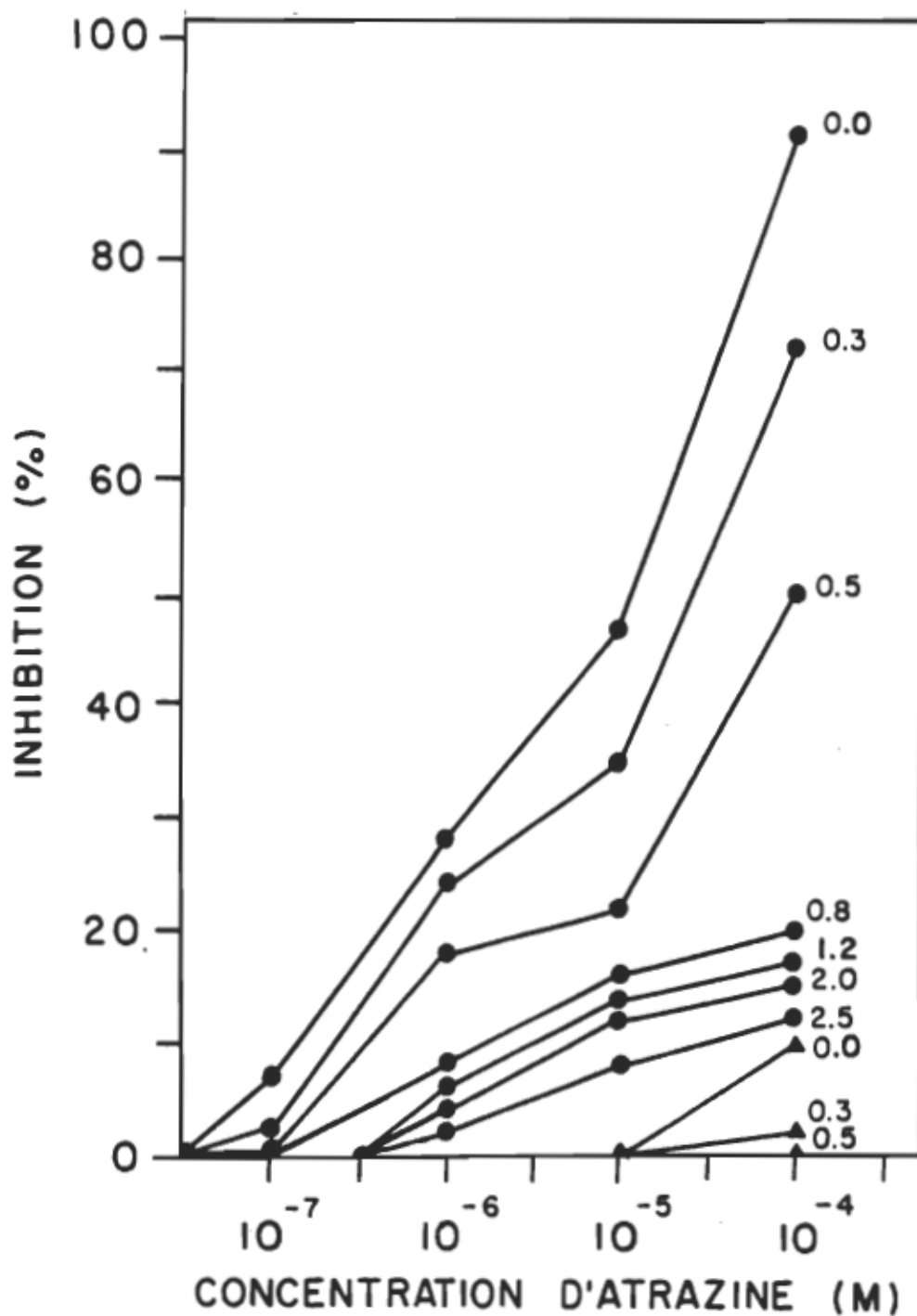


Figure 7. Inhibition de la photoréduction du DCPIP par l'atrazine en présence de DPC chez des PSII d'*Amaranthus Powellii* S. Wats sensibles (●) et résistants (▲). Les chiffres adjacents aux tracés indiquent la concentration de DPC (mM).

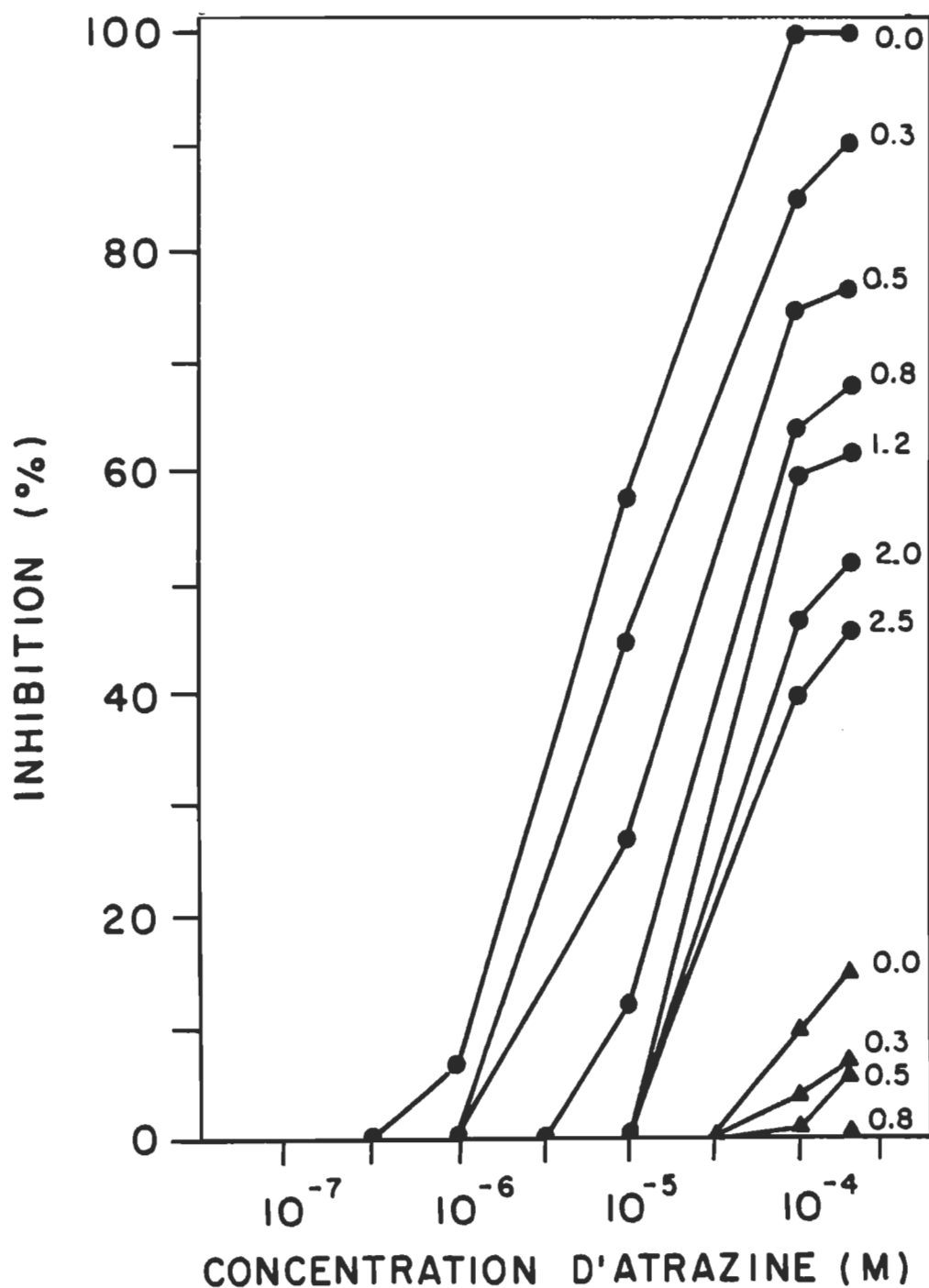


Figure 8. Inhibition de la photoréduction du DCPIP par l'atrazine en présence de DPC chez des PSII de *Brassica rapa* L. sensibles (●) et résistants (▲). Les chiffres adjacents aux tracés indiquent la concentration de DPC (mM).

Ce qui est pourtant constant chez les trois espèces, c'est la proportionnalité qui existe entre la levée de l'inhibition et la quantité d'atrazine dans le milieu et ce en fonction de l'augmentation de DPC présent.

Chez les membranes thylacoïdiennes entières, la stratégie sous-jacente diffère significativement du point de vue accessibilité pour un site. Tel que mentionné plus haut, les thylacoïdes se présentent sous forme de saccules fermés offrant ainsi une portion luménale difficile d'accès pour l'atrazine. La figure 9 nous présente l'inhibition de thylacoïdes de chénopode en fonction de la concentration d'atrazine, en faisant varier les concentrations de DPC. On remarque qu'à forte concentration d'inhibiteur (10^{-4} M), la levée d'inhibition est généralement plus prononcée qu'avec de faibles quantités. On remarque la même tendance chez Brassica (Fig. 11), même si l'inhibition est plus forte. Quoique plus difficile à vérifier chez le biotype résistant à l'atrazine, l'inhibition à des concentrations élevées, soit de 3×10^{-4} et 1×10^{-4} M, semble plus facile à lever. Cette observation tend à confirmer l'hypothèse de départ voulant que l'accessibilité des deux sites pour l'inhibiteur diffère.

Ainsi, à faible concentration, l'atrazine ne peut qu'accéder à la portion Q_B de la protéine D1, d'où la difficulté pour le donneur d'électrons artificiel de lever cette inhibition. Tandis qu'avec une concentration élevée, l'atrazine peut pénétrer le côté luménal plus facilement. Ce

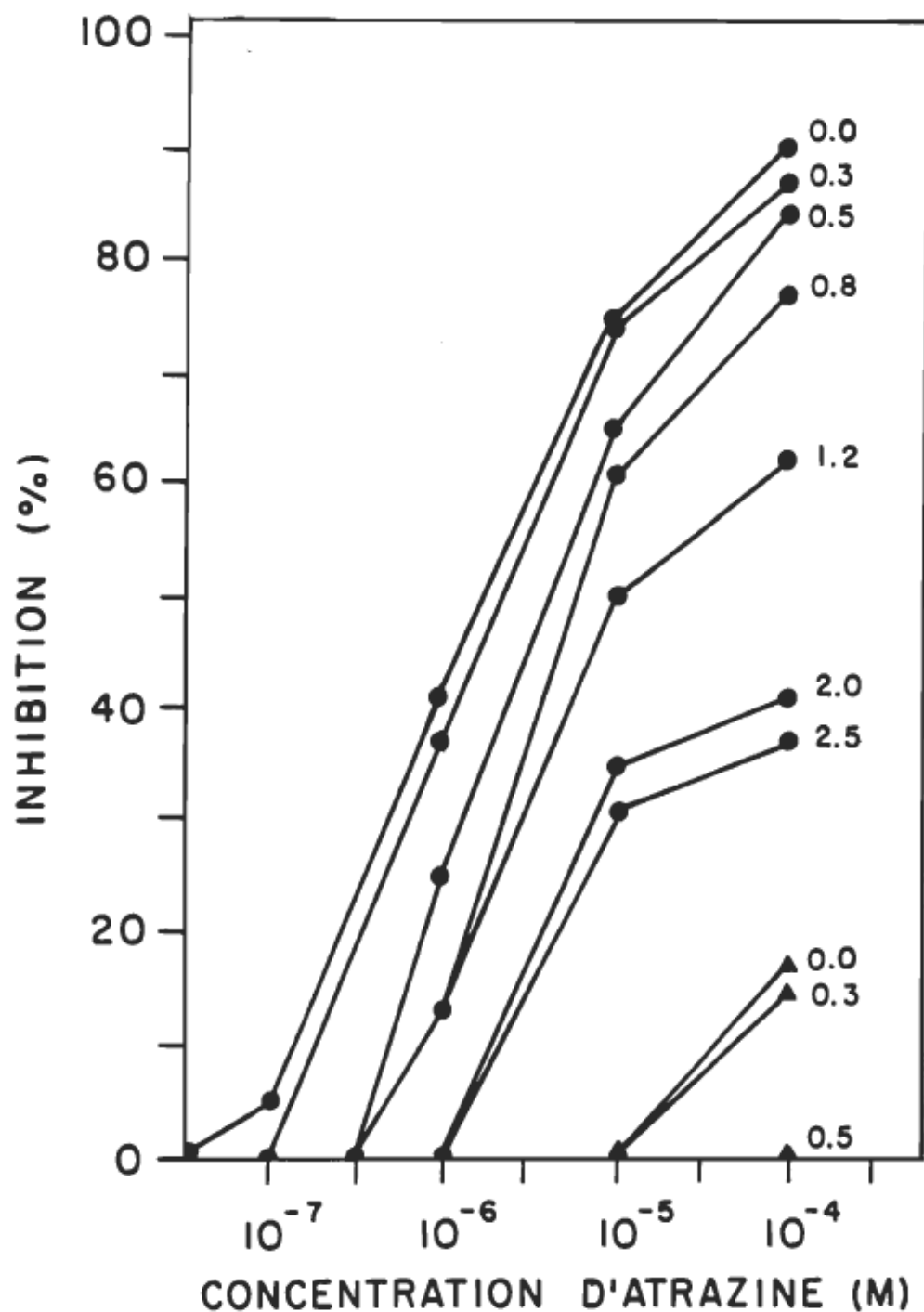


Figure 9. Inhibition de la photoréduction du DCPIP par l'atrazine en présence de DPC chez des thylacoïdes de *Chenopodium album* L. sensibles (●) et résistants (▲). Les chiffres adjacents aux tracés indiquent la concentration de DPC (mM).

qui nous permet d'émettre l'hypothèse d'un deuxième site d'action de l'atrazine du côté donneur du PSII. Par contre cette éventualité semble être ternie par l'existence d'une levée d'inhibition significative en plusieurs points et ce à de faibles concentrations d'atrazine. D'autant plus que chez Amaranthus, la levée de l'inhibition est aussi importante à faibles qu'à fortes concentrations d'atrazine (Fig. 10). Si on prend comme exemple une concentration faible, soit de 1×10^{-6} M, avec une quantité aussi minime que 0.3 mM de DPC, la levée de l'inhibition atteint les 37%, contre 11% à forte concentration (10^{-4} M; Fig. 10). Même avec une concentration de 0.5 mM de DPC, estimée moyenne de par la littérature (Vernon, 1969; Lach, 1977; Rawyler, 1980; Rawyler, 1981; Inoué, 1987), ce pourcentage demeure plus élevé avec une faible quantité d'atrazine. Ces derniers résultats pourraient s'expliquer si nous assumons que le DPC peut déplacer une quinone inhibitrice analogue de son site, comme démontré avec le silicomolybdate au site Q_B (Böger, 1982; Graan, 1986); cette dernière hypothèse sera vérifiée ultérieurement (section 3.2).

Vu les possibles effets non-spécifiques du DPC, l'utilisation d'un deuxième donneur d'électrons caractérisera de façon plus formelle le second site d'action de l'atrazine du côté luménal du PSII. Le $MnCl_2$ semble être tout désigné, étant donné qu'il agit dans la même région que le diphenylcarbazine (Ben-Hayyim, 1970; Izawa, 1980); son

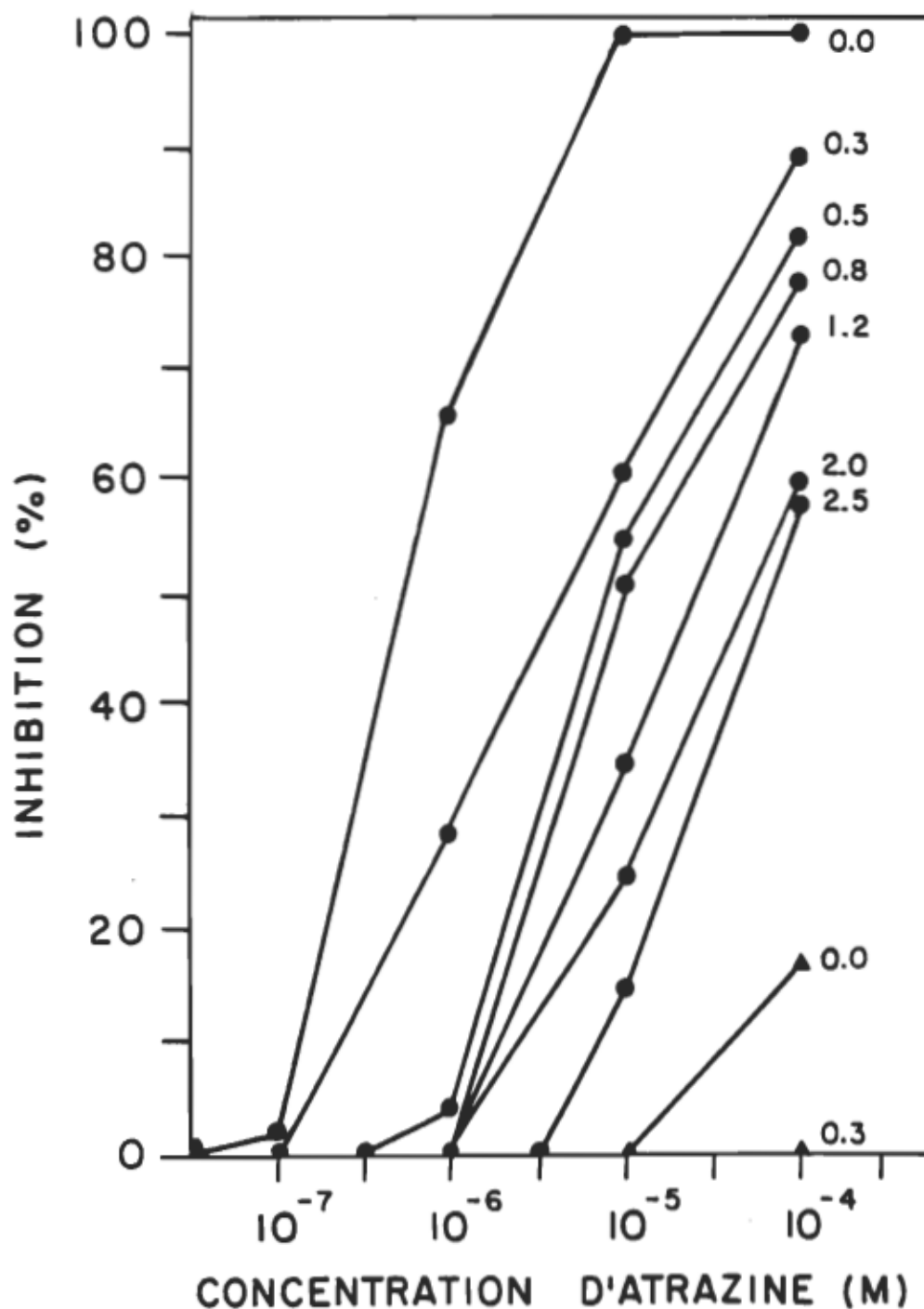


Figure 10. Inhibition de la photoréduction du DCPIP par l'atrazine en présence de DPC chez des thylacoïdes d'*Amaranthus Powellii* S Wats sensibles (●) et résistants (▲). Les chiffres adjacents aux tracés indiquent la concentration de DPC (mM).

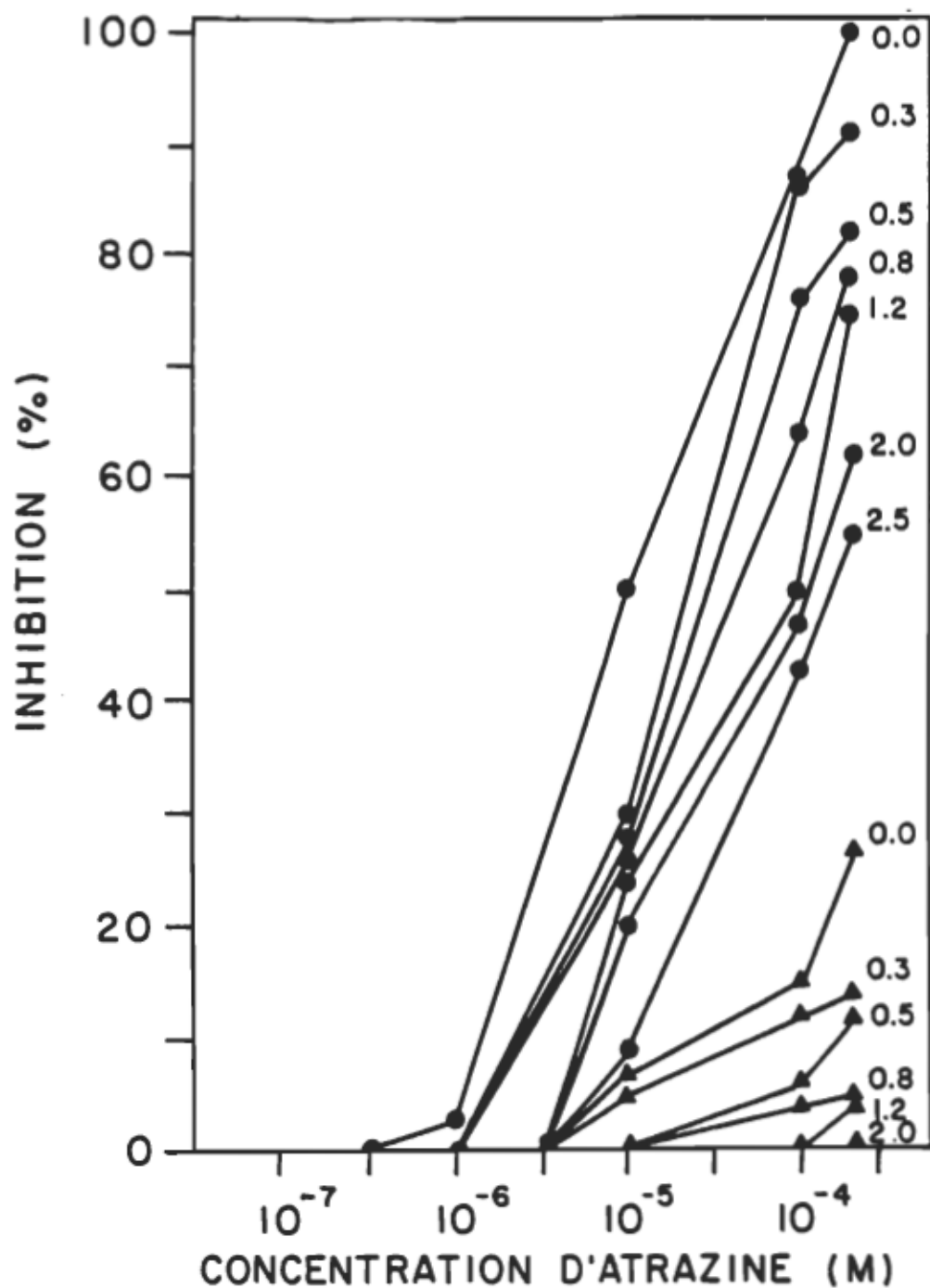


Figure 11. Inhibition de la photoréduction du DCPIP par l'atrazine en présence de DPC chez des thylacoïdes de *Brassica rapa* L. sensibles (●) et résistants (▲). Les chiffres adjacents aux tracés indiquent la concentration de DPC (mM).

site de liaison serait même attribué à un résidu d'histidine du côté luménal du PSII (Preston, 1989; Seibert, 1989; Tamura, 1989). Chez les trois mêmes espèces, le $MnCl_2$ a été employé avec les deux particules membranaires utilisées précédemment. Les résultats sont présentés de la même manière qu'avec le DPC mais en présentant les résultats obtenus pour les PSII et les thylacoïdes conjointement. Une seule concentration de donneur a été utilisée, soit 0.1 mM, étant donné que la levée d'inhibition était inchangée avec des quantités allant jusqu'à 2.0 mM de $MnCl_2$. La figure 12 montre clairement que le $MnCl_2$ donne des électrons dans la région de Z pour ainsi lever l'inhibition pour les particules de PSII. Tout au long de l'échelle de concentration d'inhibiteur, le $MnCl_2$ agit avec la même force, levant ainsi environ de 5-10% de l'inhibition nette. Sur une moins grande échelle, le biotype résistant présente le même schème caractéristique. Vu la difficulté d'accéder au côté luménal, la levée de l'inhibition chez les thylacoïdes est inexistante (biotype résistant) ou très faible dans le cas du biotype sensible à l'atrazine.

Ces derniers résultats soutiennent fortement l'hypothèse de départ voulant qu'il y ait un second site d'action de l'atrazine du côté luménal du PSII. Ces résultats sont parfaitement reproductibles chez les autres plantes étudiées. *Amaranthus* et *Brassica* (Fig. 13 et 14) présentent respectivement une levée d'inhibition significative seulement

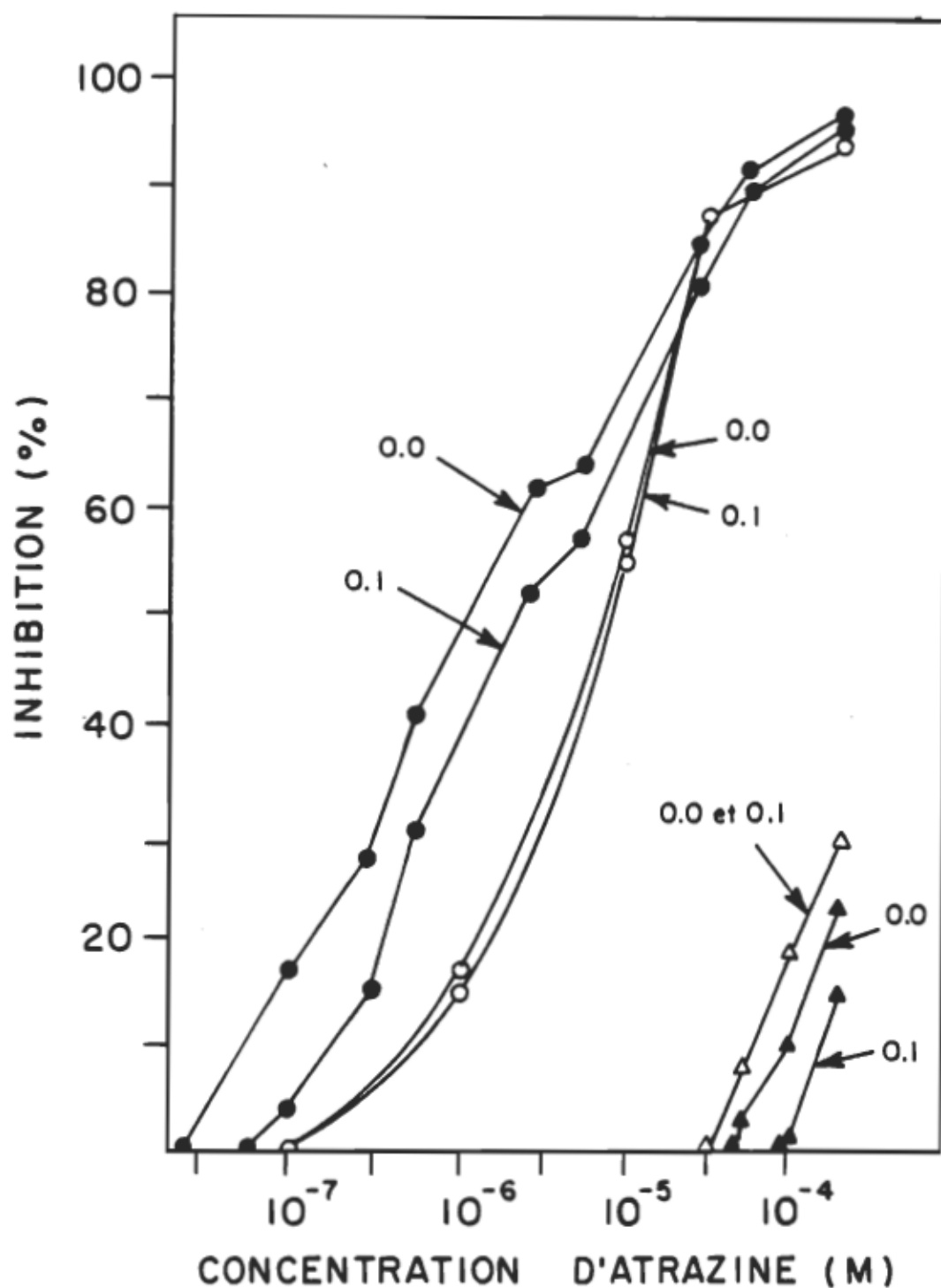


Figure 12. Inhibition de la photoréduction du DCPIP par l'atrazine en présence de $MnCl_2$ (0.1 mM) chez des PSII (symboles noirs) et thylacoïdes (symboles blancs) de *Chenopodium album* L. sensibles (cercles) et résistants (triangles).

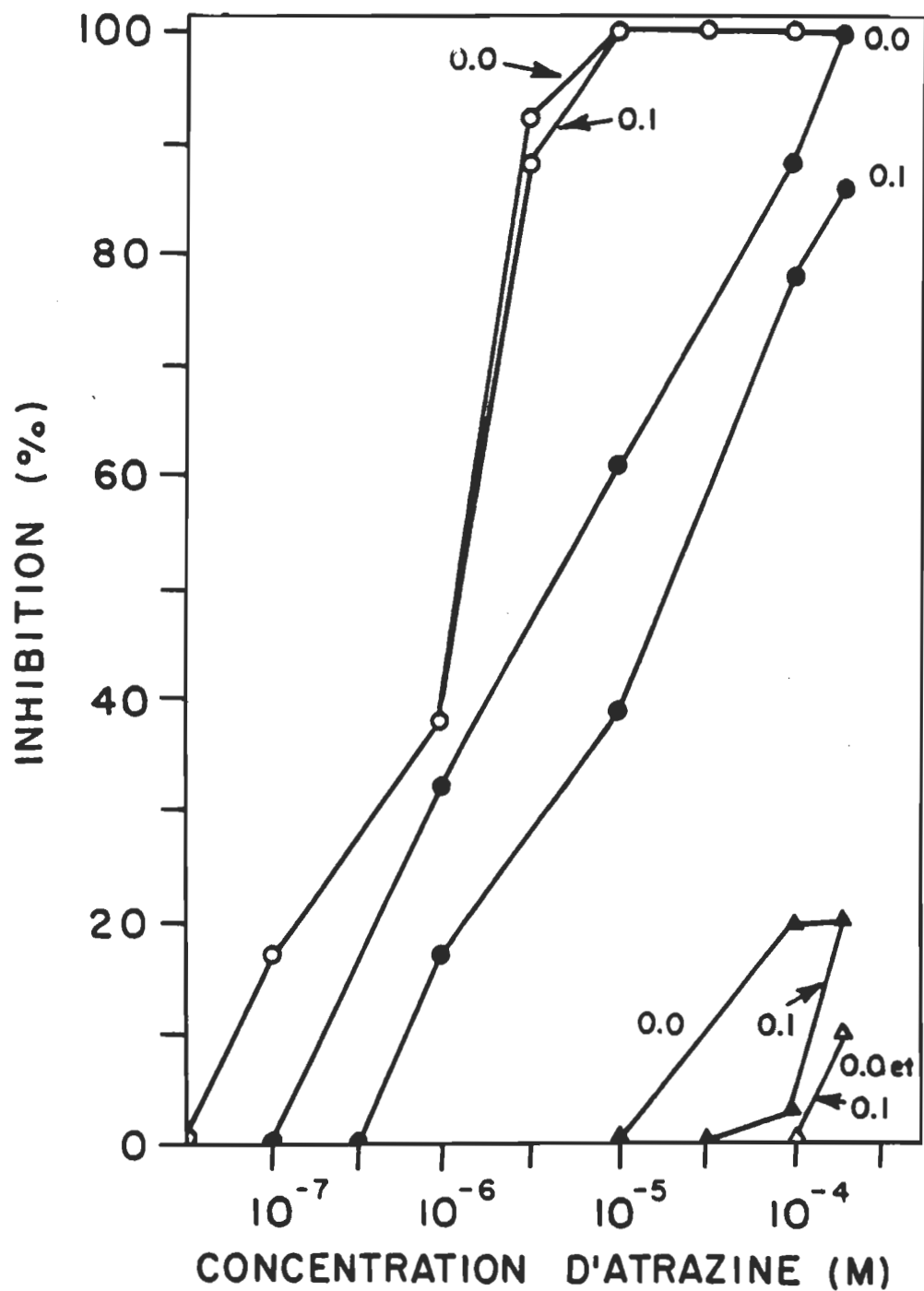


Figure 13. Inhibition de la photoréduction du DCPIP par l'atrazine en présence de MnCl_2 (0.1 mM) chez des PSII (symboles noirs) et thylacoïdes (symboles blancs) d'*Amaranthus Powellii* S Wats sensibles (cercles) et résistants (triangles).

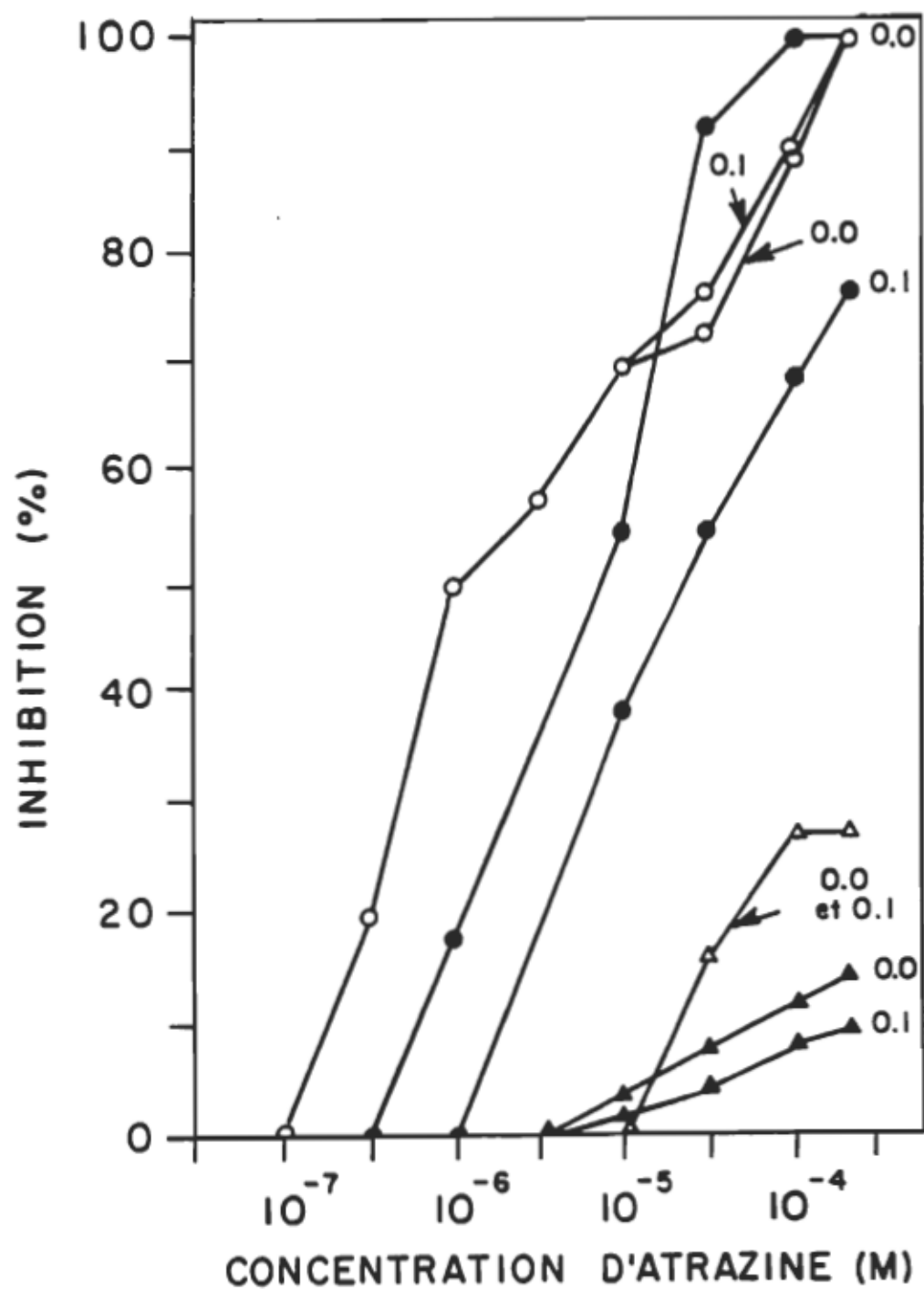


Figure 14. Inhibition de la photoréduction du DCPIP par l'atrazine en présence de $MnCl_2$ (0.1 mM) chez des PSII (symboles noirs) et thylacoïdes (symboles blancs) de *Brassica rapa* L. sensibles (cercles) et résistants (triangles).

avec les membranes enrichies en PSII; et cela autant pour le biotype résistant que sensible à l'atrazine.

La différence de sensibilité (à l'atrazine) des membranes n'a toutefois pas été évaluée de façon à être certain du résultat du pronostic. L'atténuation de l'inhibition du transport d'électron en fonction de l'inhibition en présence d'une valeur moyenne de DPC, soit 0.5 mM, s'avère un outil de premier ordre pour caractériser plus clairement la présence d'un deuxième site d'action (pour la signification mathématique voir la légende des figures). La figure 15 propose une relation, atténuation de l'inhibition: inhibition qui est presque linéaire dans le cas des thylacoïdes. Cette observation s'explique aisément considérant qu'en présence d'un faible pourcentage d'inhibition (en abscisse, de 0 à 50%) il est plus aisé de lever cette inhibition, d'où le fort taux d'atténuation. Ce taux diminue en fonction de l'augmentation de l'atrazine du milieu.

L'importance de ce graphique réside dans la comparaison thylacoïde-PSII; ce qui fournit une information importante sur la sensibilité respective des membranes. Au premier coup d'oeil on remarque une sensibilité à l'inhibiteur plus élevée dans le cas des PSII; cette réceptivité accrue s'observe facilement lors d'une inhibition élevée. Chez les deux particules membranaires on peut atteindre 100% d'inhibition à forte concentration d'atrazine, donc dans ce cas tous les sites sont comblés en inhibiteur; et pourtant l'atténuation

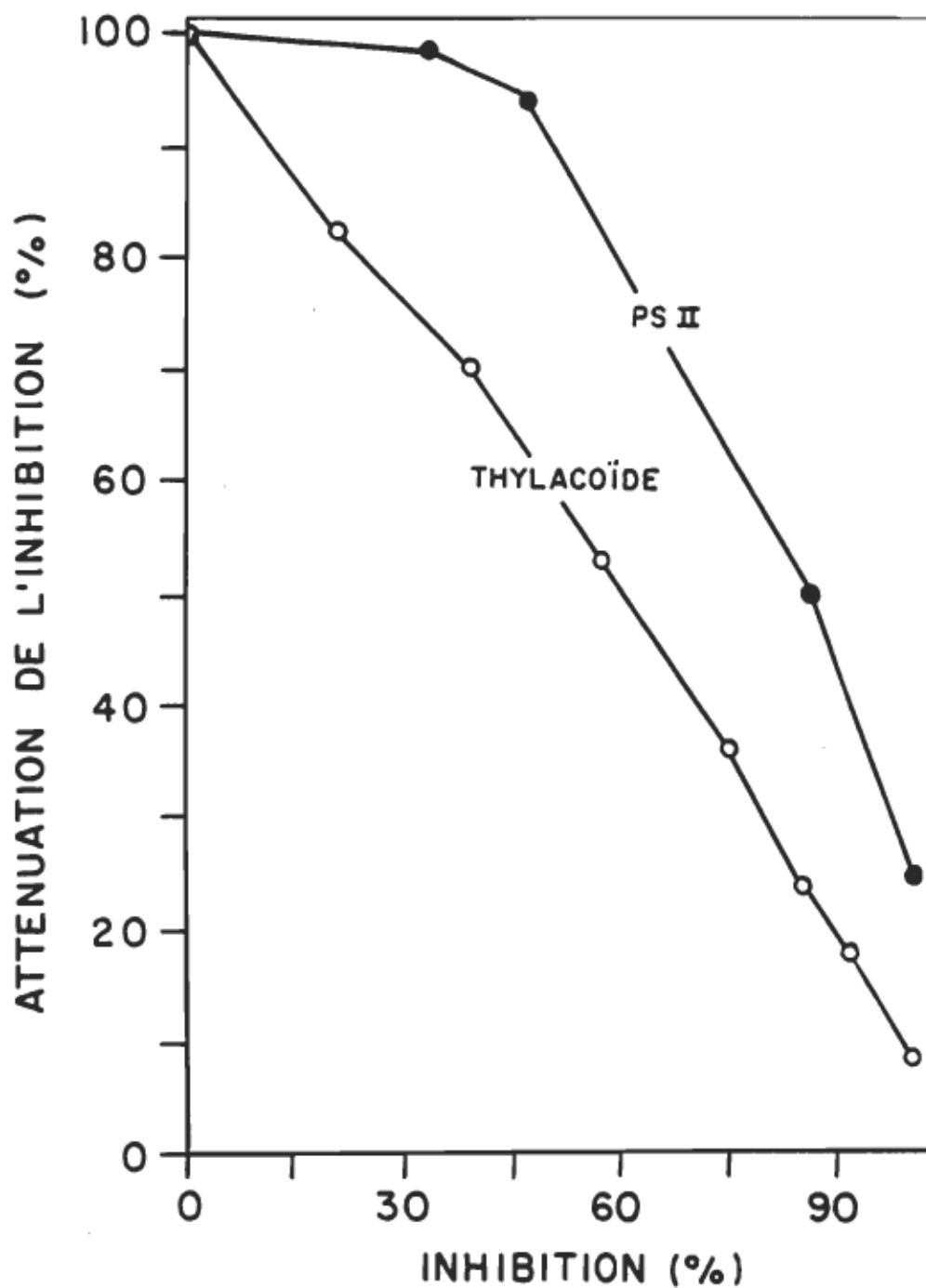


Figure 15. Atténuation de l'inhibition par l'atrazine en présence de DPC (0.5 mM) chez des PSII (●) et thylacôïdes (○) de *Chenopodium album* L. sensibles. Le pourcentage d'atténuation (P) est calculé à partir du pourcentage d'inhibition de l'échantillon sans (W) et avec (Y) le donneur artificiel d'électrons: $P = (W - Y) / W \times 100$.

pour le PSII demeure très élevé, soit de 25% contre seulement 9% pour les thylacoïdes.

La deuxième observation et la plus importante, est "l'épaulement" ou l'atténuation élevée qui se prolonge à faible pourcentage d'inhibition dans le cas du PSII. Si on se rappelle que le DPC agit du côté luménal du PSII, à faible concentration d'atrazine (par exemple à 15% d'inhibition) le taux d'atténuation de l'inhibition atteint 99%. La grande efficacité du donneur artificiel d'électrons pour lever l'inhibition implique un site d'action de l'atrazine du côté luménal du PSII. Ainsi, même si on augmente la quantité d'inhibiteur (pour ainsi atteindre 50% d'inhibition) le pourcentage d'atténuation de l'inhibition reste toujours au dessus de 90%. A plus forte concentration d'inhibiteur, la difficulté d'atténuer l'inhibition s'accroît progressivement. Il est évident qu'à ce stade les deux sites sont comblés en atrazine, ce qui nous permet d'affirmer que l'atrazine s'attaquerait préférentiellement du côté donneur d'électrons (région de Z) que du côté du stroma (Q_p) dans les membranes enrichies en PSII.

On peut donc maintenant, avec peu de risque d'erreur, soutenir l'hypothèse dualiste du mécanisme d'inhibition de l'atrazine. Cette hypothèse tient également chez le biotype résistant à l'atrazine (Fig. 16). Dans ce cas cependant, la différence entre PSII et membranes thylacoïdiennes est plus difficile à évaluer compte tenu des faibles valeurs

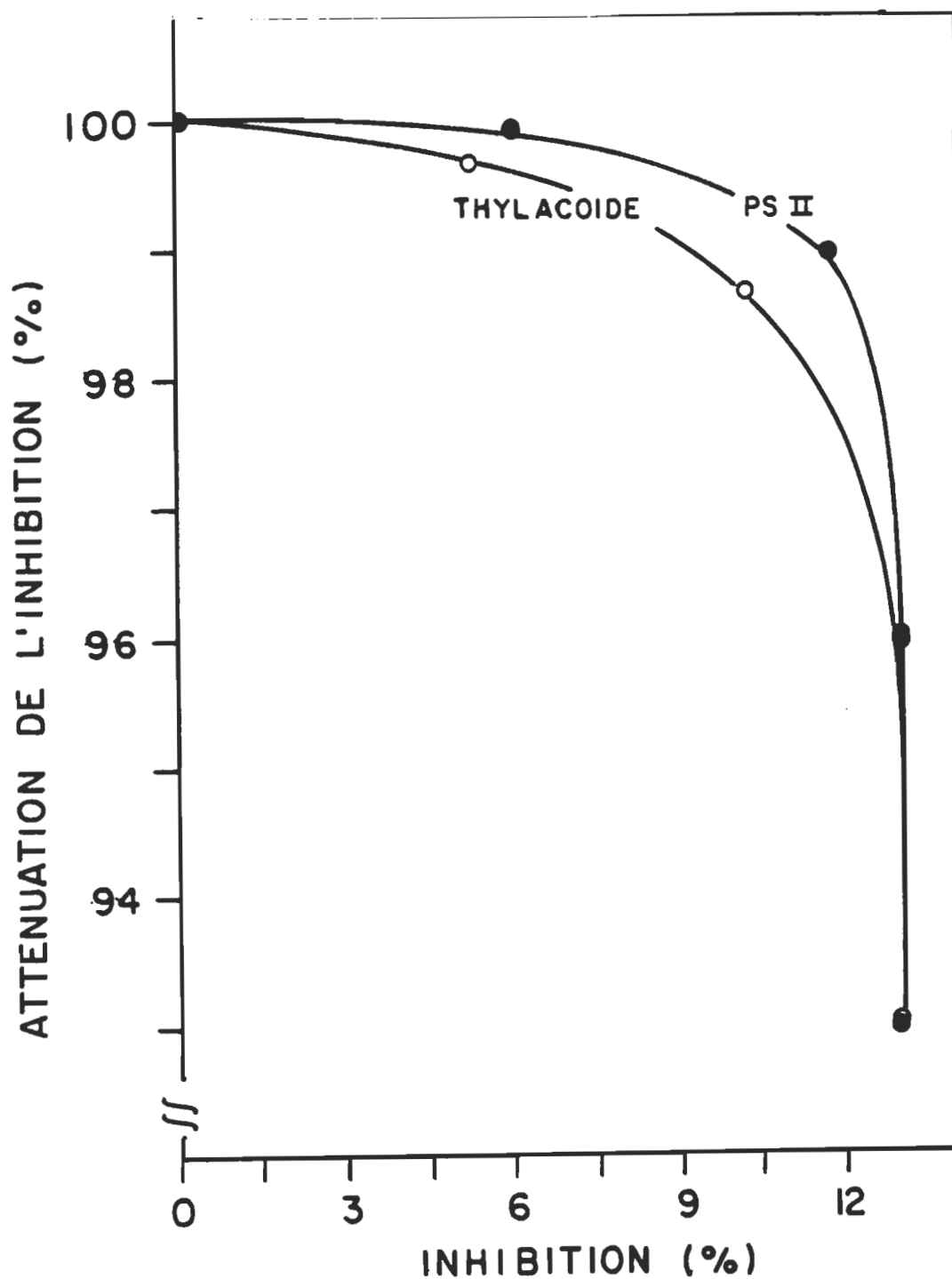


Figure 16. Atténuation de l'inhibition par l'atrazine en présence de DPC (0.5 mM) chez des PSII (●) et thylacoïdes (○) de Chenopodium album L. résistants. Le pourcentage d'atténuation (P) est calculé à partir du pourcentage d'inhibition de l'échantillon sans (W) et avec (Y) le donneur artificiel d'électrons: $P = (W - Y) / W \times 100$.

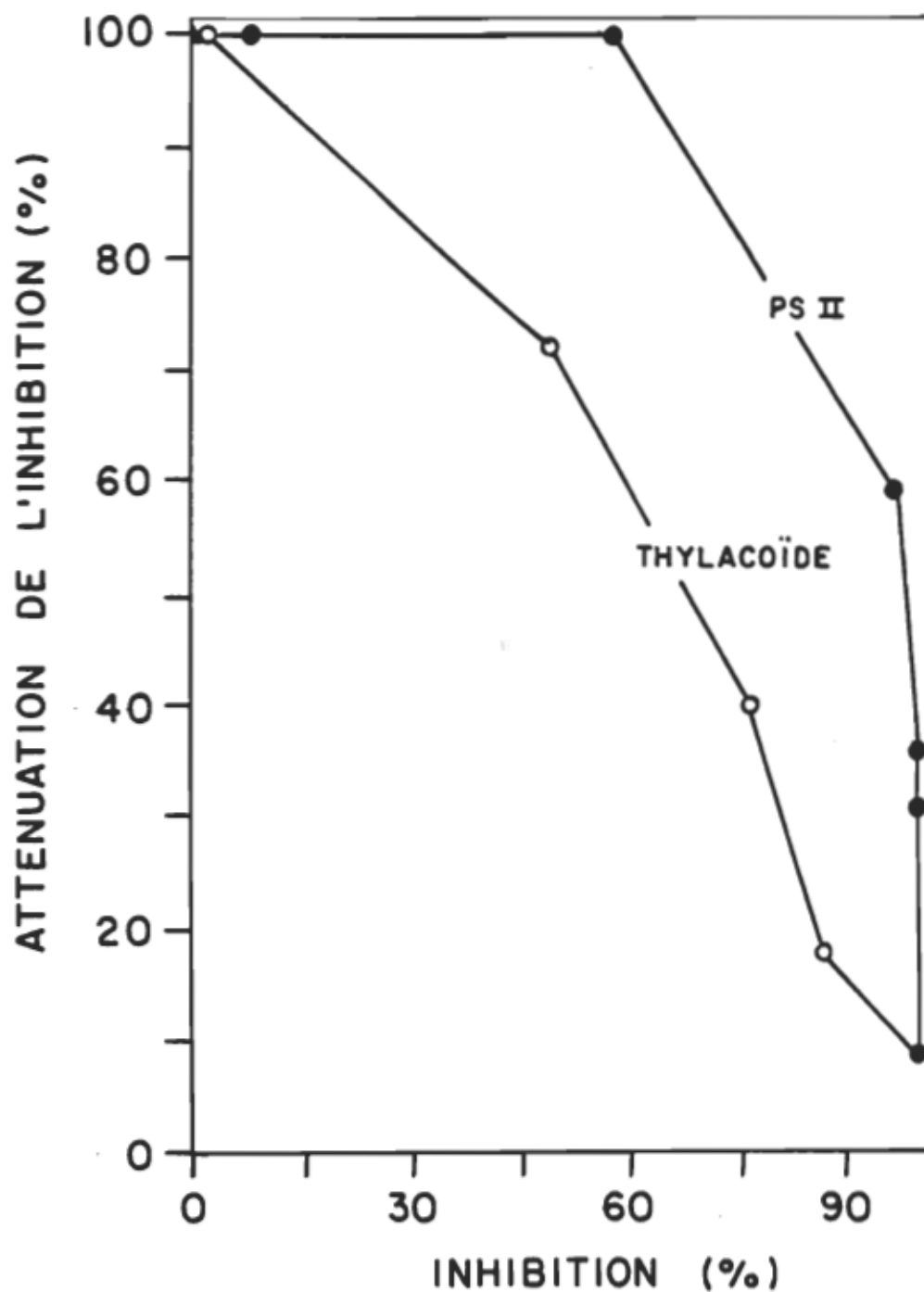


Figure 17. Atténuation de l'inhibition par l'atrazine en présence de DPC (0.5 mM) chez des PSII (●) et thylacôïdes (○) de *Brassica rapa* L. sensibles. Le pourcentage d'atténuation (P) est calculé à partir du pourcentage d'inhibition de l'échantillon sans (W) et avec (Y) le donneur artificiel d'électrons: $P = (W - Y) / W \times 100$.

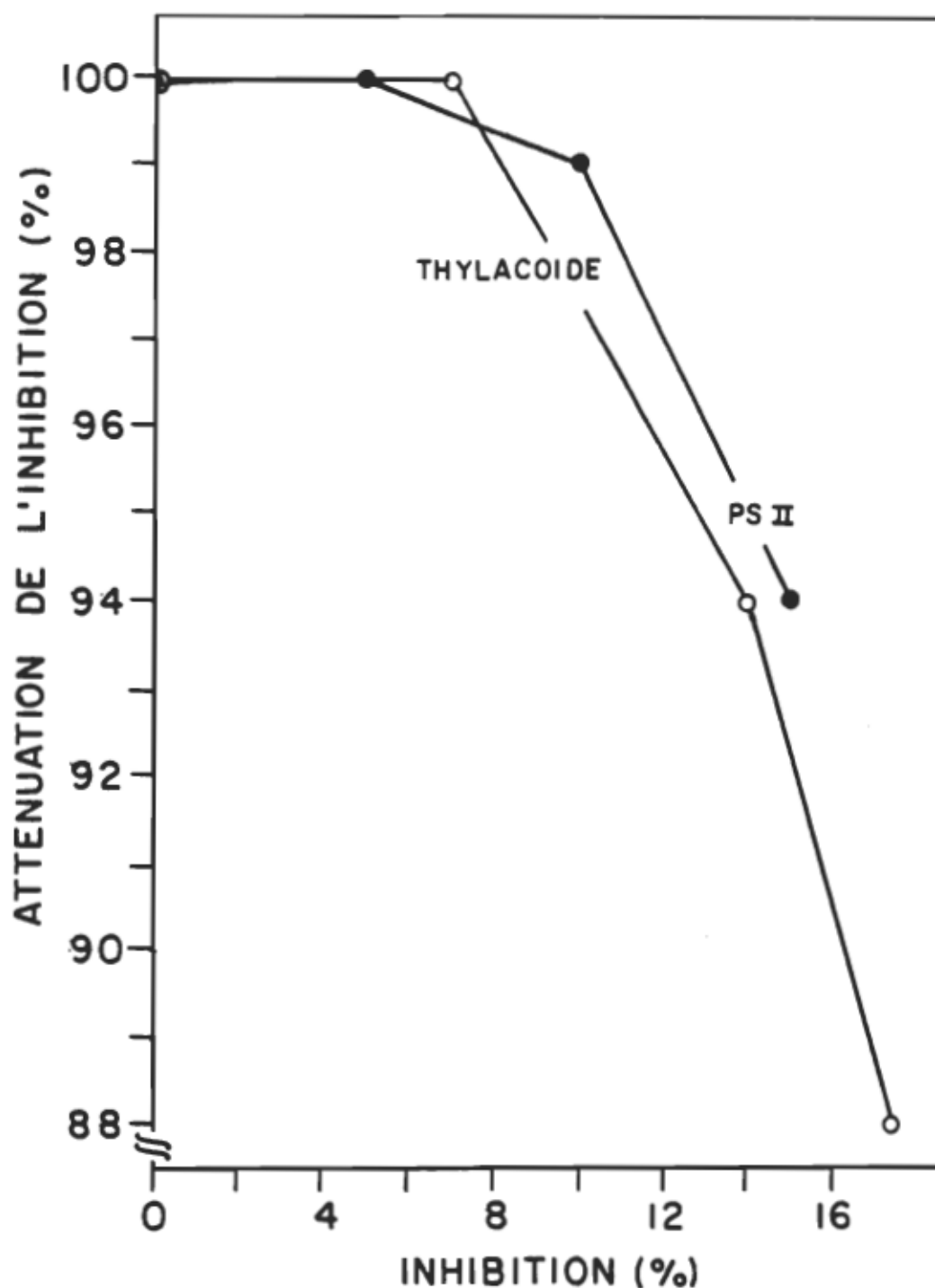


Figure 18. Atténuation de l'inhibition par l'atrazine en présence de DPC (0.5 mM) chez des PSII (●) et thylacoïdes (○) de *Brassica rapa* L. résistants. Le pourcentage d'atténuation (P) est calculé à partir du pourcentage d'inhibition de l'échantillon sans (W) et avec (Y) le donneur artificiel d'électrons: $P = (W - Y) / W \times 100$.

d'inhibition. Brassica rapa L. se comporte de la même façon. En présence d'une inhibition inférieure à 55% on obtient une atténuation très élevée (100% dans le cas du biotype sensible), caractérisant ainsi l'efficacité du donneur d'électrons au niveau de Z (Fig. 17 et 18). Dans le cas d'Amaranthus Powellii S Wats sensible à l'atrazine, il ne semble pas y avoir de différence fondamentale entre la sensibilité du PSII et les thylacoïdes, même si on remarque qu'à faible concentration d'atrazine, l'atténuation chez les membranes de PSII reste légèrement plus élevée (Fig. 19). Par contre il ne fait aucun doute que dans le cas du biotype résistant, le PSII est beaucoup plus sensible que les thylacoïdes étant donné que l'atténuation de l'inhibition reste maximale jusqu'aux plus fortes concentrations d'atrazine (Fig. 20).

Dans un même ordre d'idées, pour vraiment soutenir cette hypothèse, des mesures d'atténuation de l'inhibition en fonction de l'inhibition de l'activité en présence de 0.1 mM de $MnCl_2$ sont présentées à la figure 21. Pour chacune des trois plantes, ne sont présentés que les résultats des membranes de PSII car aucune levée d'inhibition n'a été décelée chez les membranes thylacoïdiennes entières. On constate donc qu'à faibles concentrations d'inhibiteur, l'atténuation de l'inhibition est très élevée, pour ensuite diminuer proportionnellement avec l'augmentation d'atrazine dans le milieu.

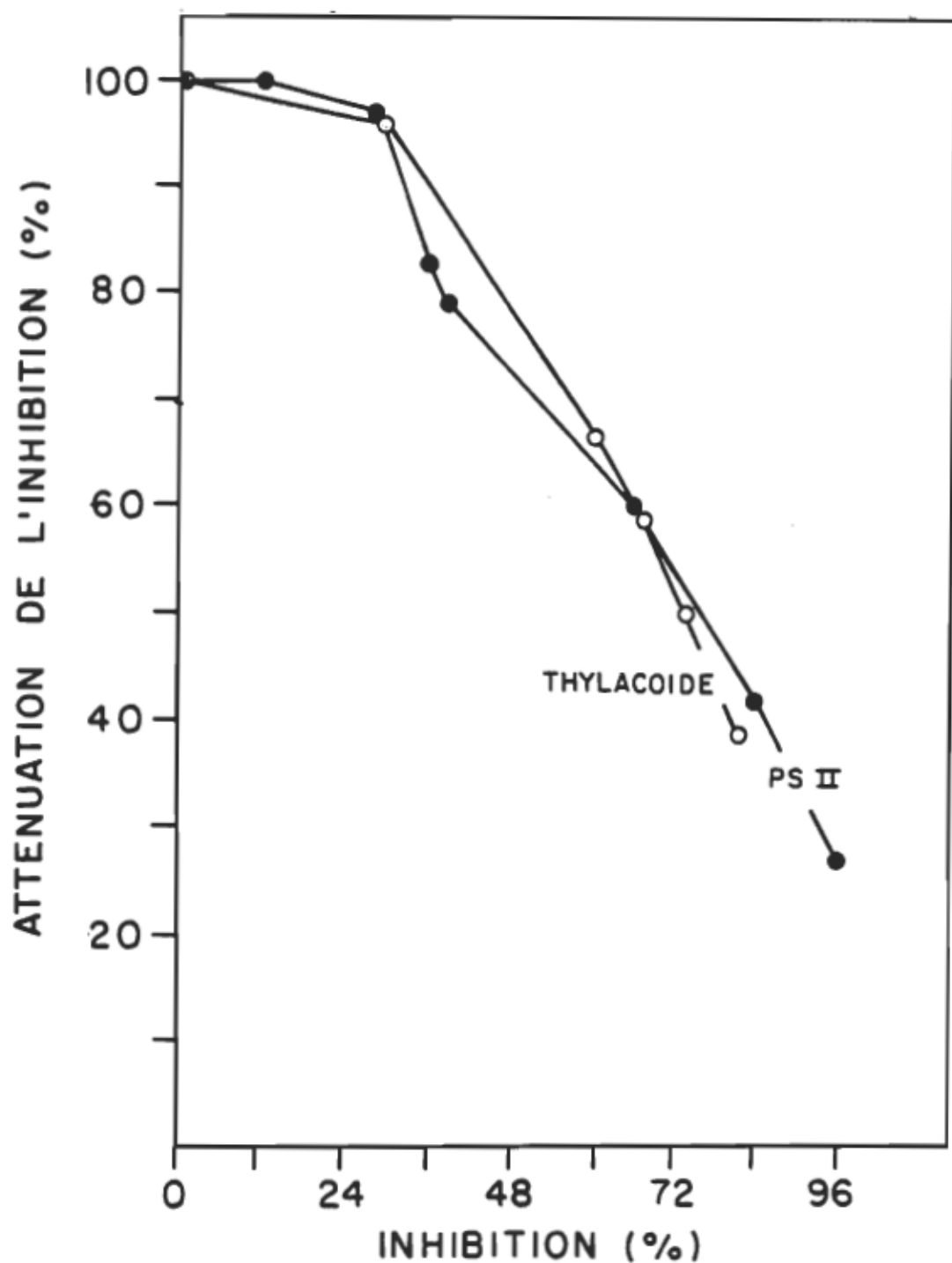


Figure 19. Atténuation de l'inhibition par l'atrazine en présence de DPC (0.5 mM) chez des PSII (●) et thylacoïdes (○) de *Amaranthus Powellii* S Wats sensibles. Le pourcentage d'atténuation (P) est calculé à partir du pourcentage d'inhibition de l'échantillon sans (W) et avec (Y) le donneur artificiel d'électrons: $P = (W - Y) / W \times 100$.

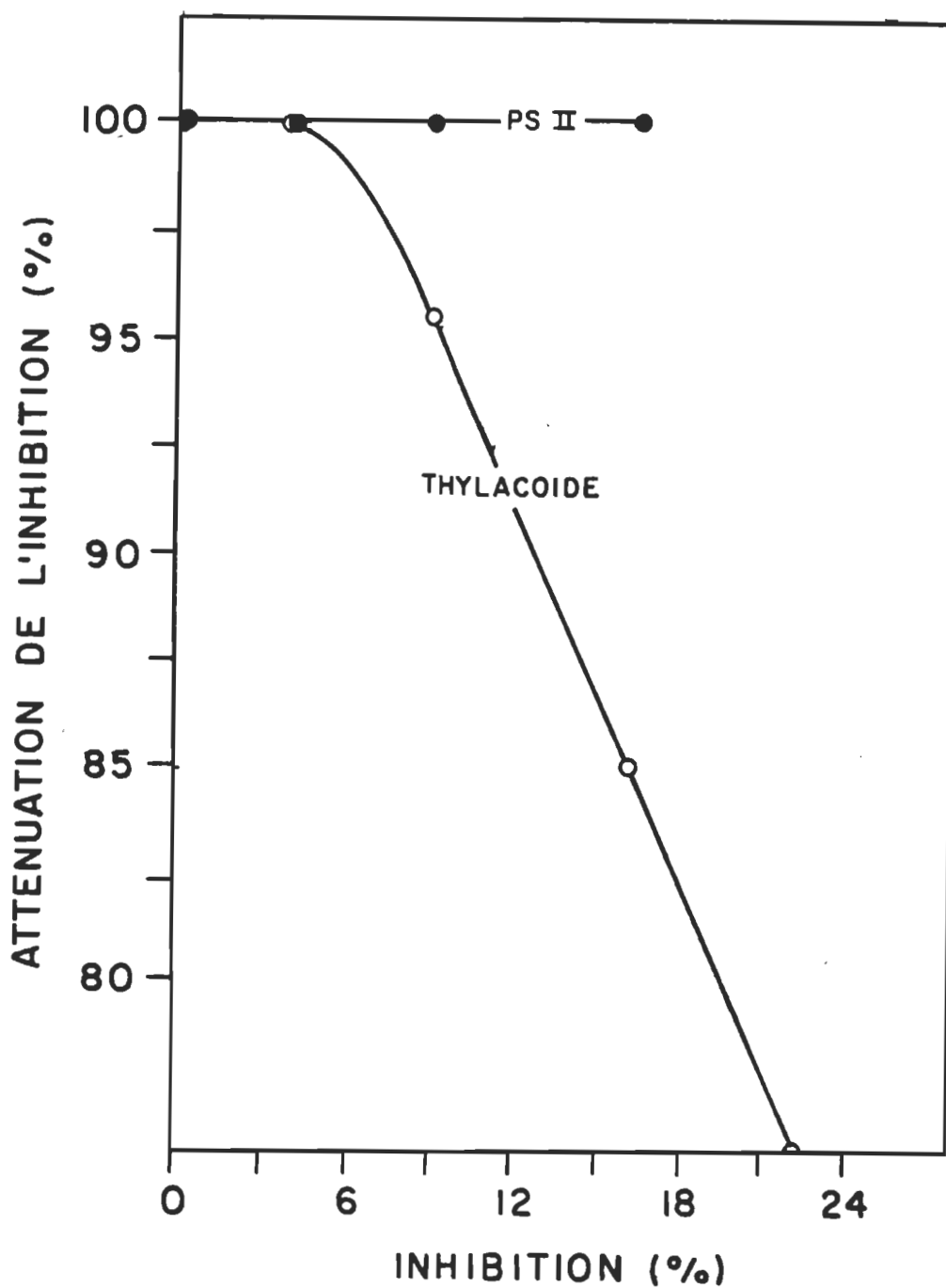


Figure 20. Atténuation de l'inhibition par l'atrazine en présence de DPC (0.5 mM) chez des PSII (●) et thylacoïdes (○) de Amaranthus Powelii S Wats. résistants. Le pourcentage d'atténuation (P) est calculé à partir du pourcentage d'inhibition de l'échantillon sans (W) et avec (Y) le donneur artificiel d'électrons: $P = (W - Y) / W \times 100$.

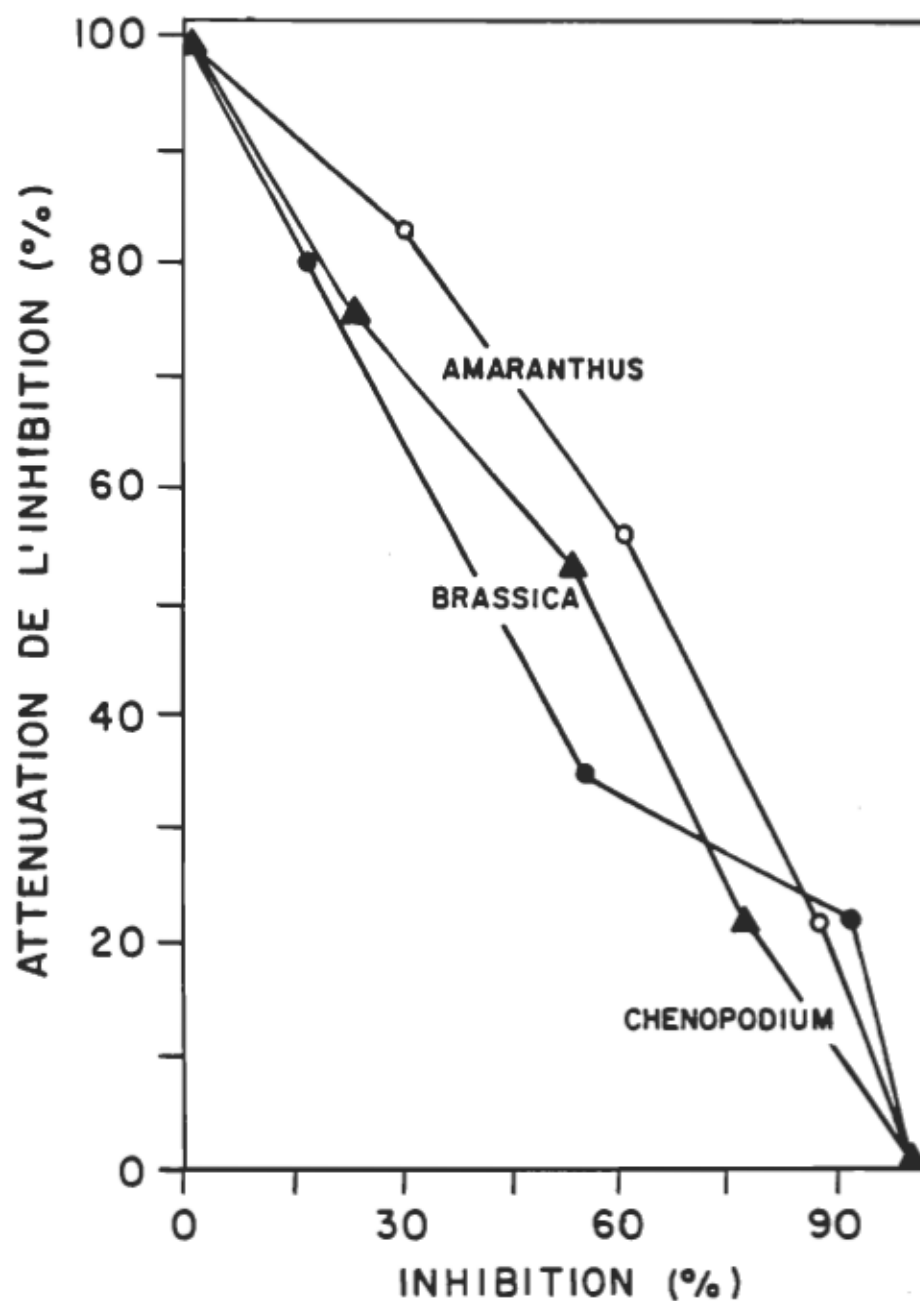


Figure 21. Atténuation de l'inhibition par l'atrazine en présence de MnCl_2 (0.1 mM) chez des PSII sensibles de *Chenopodium* (●), d'*Amaranthus* (○) et de *Brassica* (▲). Le pourcentage d'atténuation (P) est calculé à partir du pourcentage d'inhibition de l'échantillon sans (W) et avec (Y) le donneur artificiel d'électrons: $P = (W - Y) / W \times 100$.

A titre informatif, les trois figures suivantes (Fig. 22, 23 et 24) nous renseignent sur la sensibilité des PSII comparativement aux thylacoïdes et cela avec une concentration moyenne de 0.5 mM de DPC. Autant dans le cas du biotype sensible que résistant, le PSII semble être inhibé plus rapidement. Fait à noter que chaque mesure de tous les graphiques sont obtenue par la moyenne de triplicatas.

Plusieurs traitements sur les membranes thylacoïdiennes sont connus pour affecter le côté accepteur autant que le côté donneur du PSII (Jursinic, 1983; Renger, 1983; Ikeuchi, 1985; Metz, 1986, Renger, 1986, Völker, 1986, Yamada, 1987). Par exemple les modifications structurales de D1 et aussi du polypeptide D2 sont démontrées comme se produisant après la liaison avec l'atrazine ou après l'oxydation de l'atome de fer ("high spin iron atom") logé entre Q_A et Q_B de Fe^{2+} à Fe^{3+} (Renger, 1988). Donc, l'action de l'atrazine du côté donneur pourrait être interprétée comme un second effet de la liaison de l'inhibiteur au site Q_B . Cependant la présence d'un vrai site d'action du côté donneur a été démontré (pour une synthèse des résultats sur le sujet voir Purcell, 1990a). La forte accessibilité de l'atrazine du côté donneur dans les fractions membranaires enrichies en PSII pourrait être due à la plus grande exposition de la face luménale au milieu dans ces préparations. Par contre la baisse d'affinité de l'atrazine pour le site Q_B est attribuée aux modifications

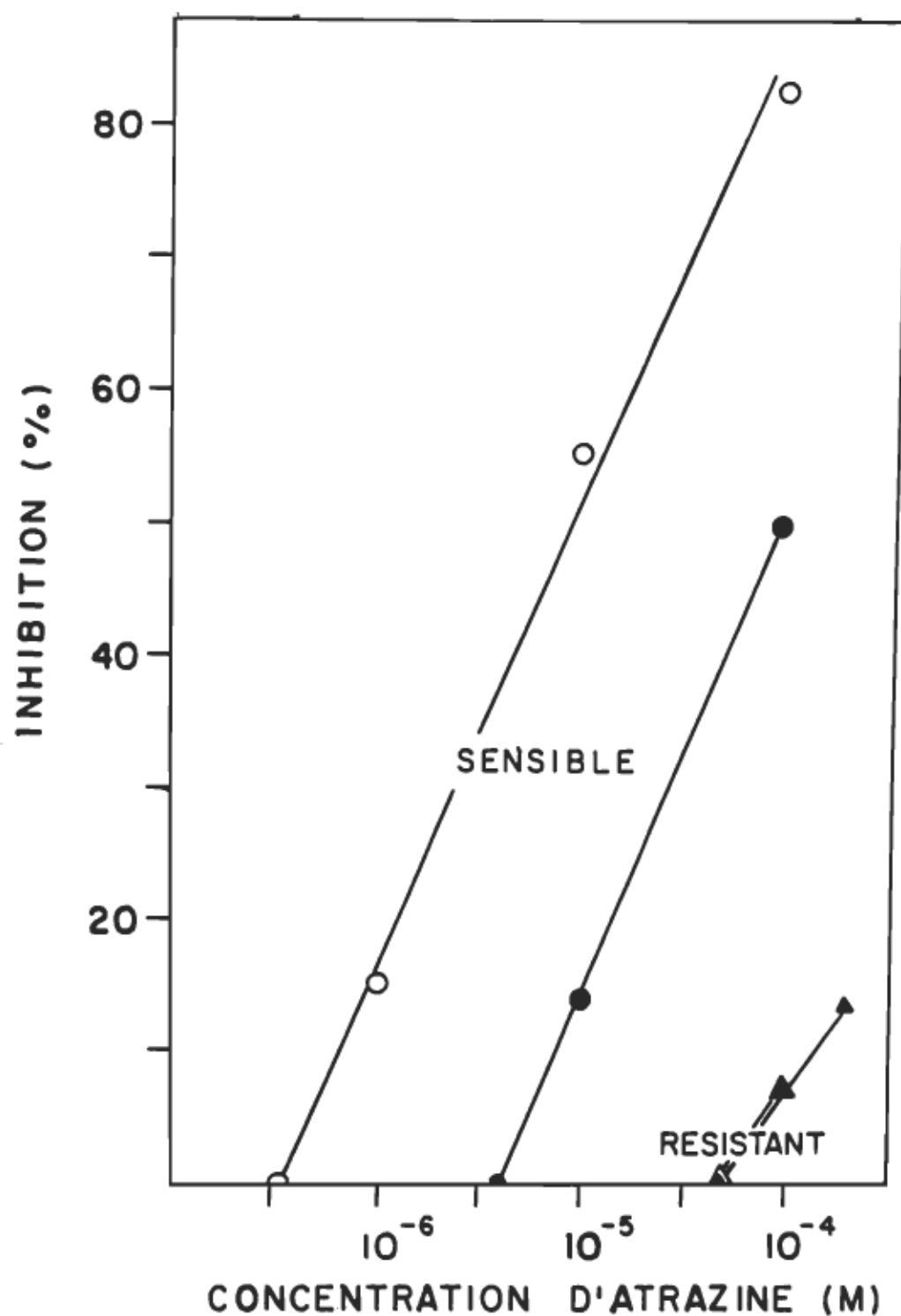


Figure 22. Inhibition de la photoréduction du DCPIP par l'atrazine en présence de 0.5 mM DPC chez des PSII (symboles noirs) et thylacoïdes (symboles blancs) de *Chenopodium album* L sensibles (cercles) et résistants (triangles).

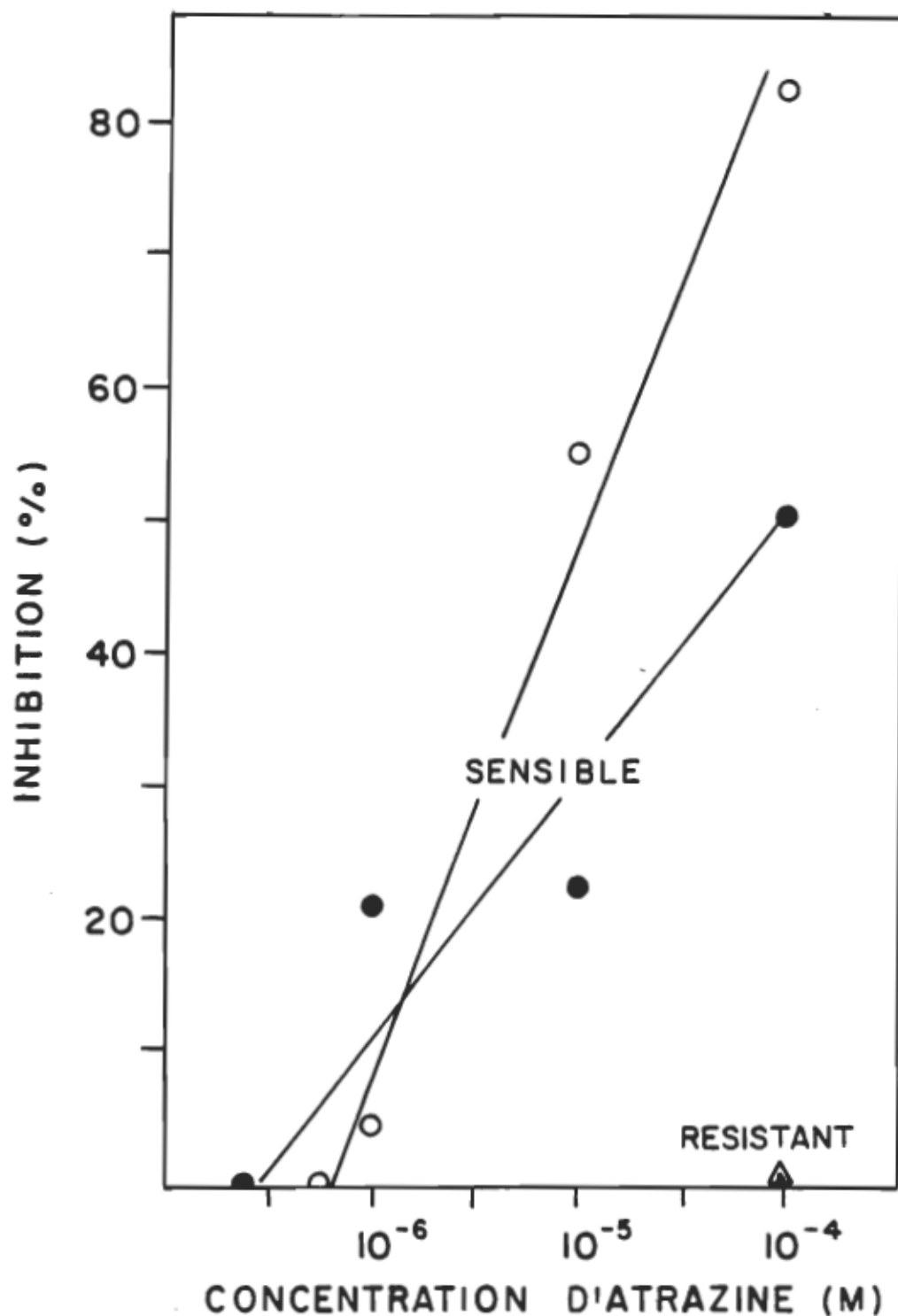


Figure 23. Inhibition de la photoréduction du DCPIP par l'atrazine en présence de 0.5 mM DPC chez des PSII (symboles noirs) et thylacoides (symboles blancs) d'*Amaranthus Powellii* S. Wats sensibles (cercles) et résistants (triangles).

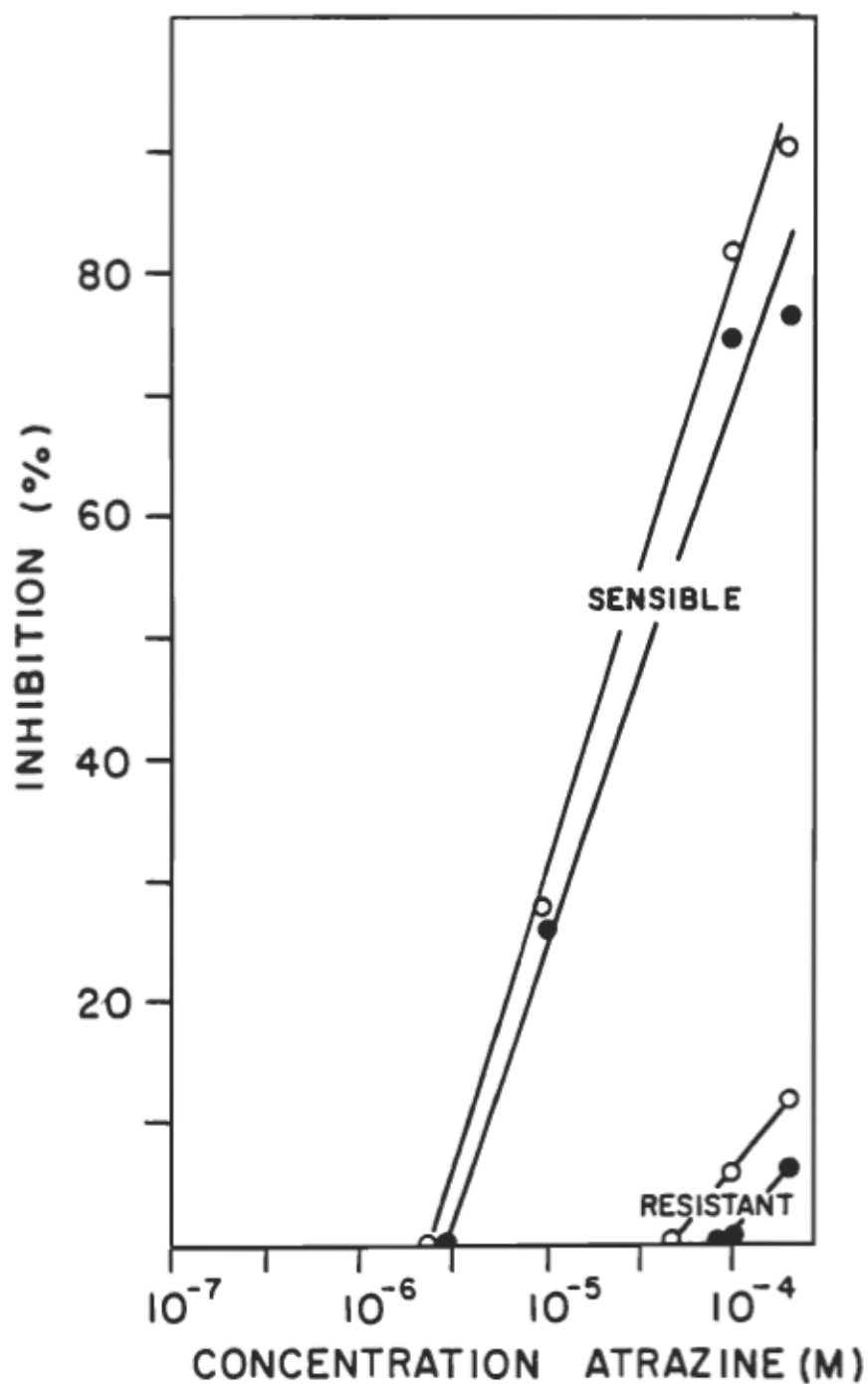


Figure 24. Inhibition de la photoréduction du DCPIP par l'atrazine en présence de 0.5 mM DPC chez des PSII (symboles noirs) et thylacoïdes (symboles blancs) de *Brassica rapa* L. sensibles (cercles) et résistants (triangles).

structurales de la protéine D1 induite par l'effet du Triton. Il a été postulé très récemment que Z serait la tyrosine 161 du polypeptide D1 (Barry, 1987; Debus, 1988; Gerken, 1988; Ikeuchi, 1988b). Ce résidu est logé du côté luménal du PSII. Ainsi il y a plusieurs évidences attribuant un rôle fonctionnel et cinétique de Z, en relation avec le P680 (Gerken, 1987; Mathis, 1989; Metz, 1989).

Finalement, d'après les résultats présentés antérieurement, il semble notoire que chez les biotypes résistants le site d'action des herbicides du côté donneur est résistant à l'atrazine approximativement au même taux que sur Q_B. En fait, l'inhibition est observée seulement à fortes concentrations d'atrazine chez les PSII et les thylacoïdes isolés de biotypes résistants. Ceci confirme les résultats obtenus par Rashid (1987) avec C. album L. Il est bien connu que le site de mutation impliqué dans la résistance aux triazines des espèces étudiées ici, est localisé sur la sérine 264 sur le polypeptide D1 (Hirschberg, 1983). Ce changement d'un acide aminé affecte grandement la liaison d'une molécule d'atrazine au site Q_B. D'autre part, le site de liaison à l'atrazine regroupe plusieurs acides aminés, lesquels sont relativement loin du site de mutation: sur la méthionine 214 et entre l'histidine 215 et l'arginine 225 (Wolber, 1984; Wolber, 1986; Barros, 1988); voir la figure 25.

La figure 26 permet de bien visualiser le site de liaison de l'atrazine (hélice D) et celui de la mutation (hélice E) du côté du stroma, de même que le site d'action du DPC (région de la tyrosine 161) du côté luménal du PSII (hélice C). La modification de la protéine, laquelle altère la liaison de l'atrazine au site Q_B chez les biotypes résistants, pourrait très bien induire des changements conformationnels qui affecteraient aussi le côté luménal de la membrane; l'action du Triton X-100 comme détergent, affecterait également l'organisation des membranes thylacoïdiennes (Apostolova, 1988a; Apostolova, 1988b; Hermann, 1988).

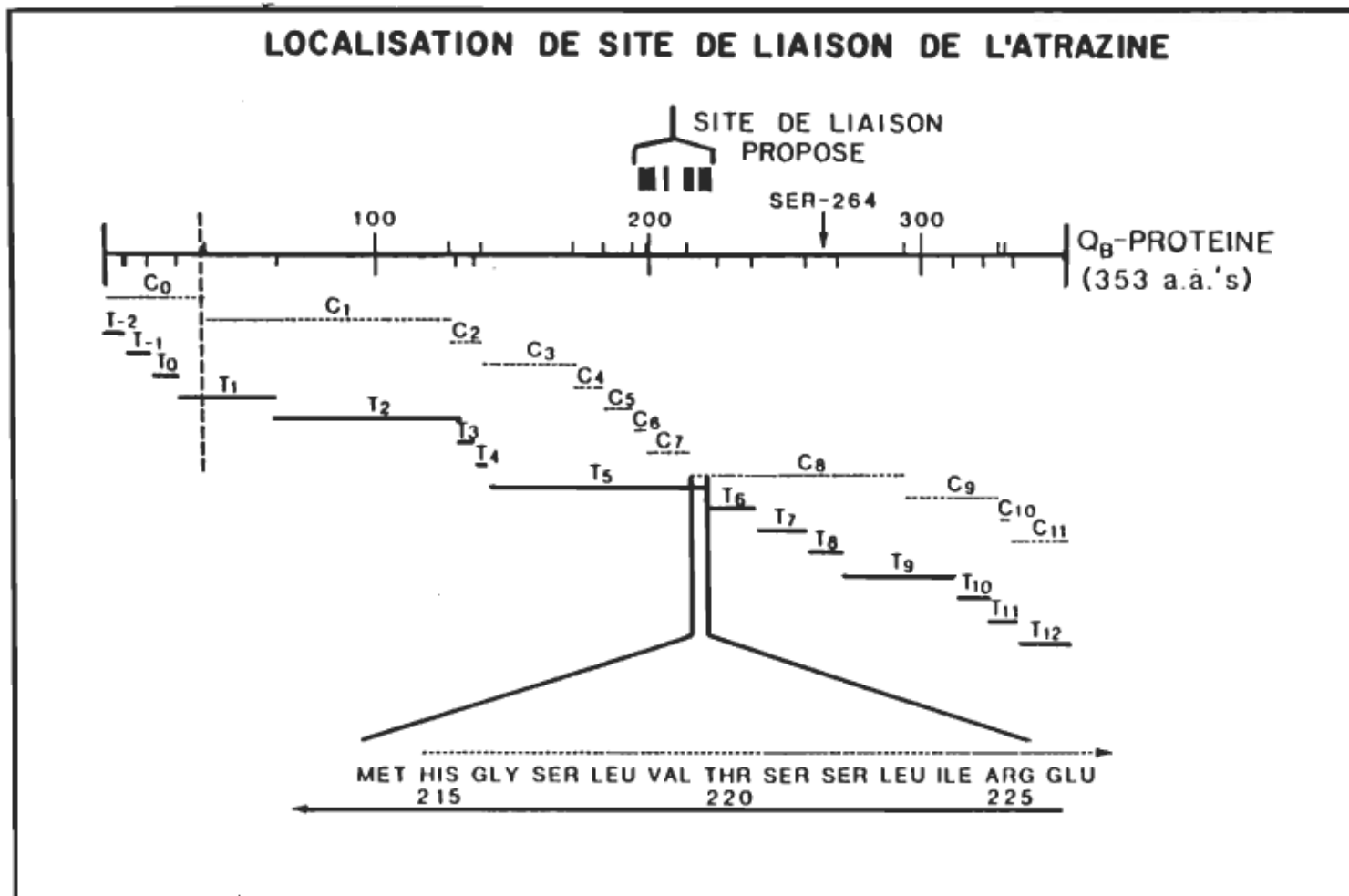


Figure 25. Carte de digestion d'un fragment de la protéine D1 par la trypsine et le CNBr. (D'après Wolber, 1986).

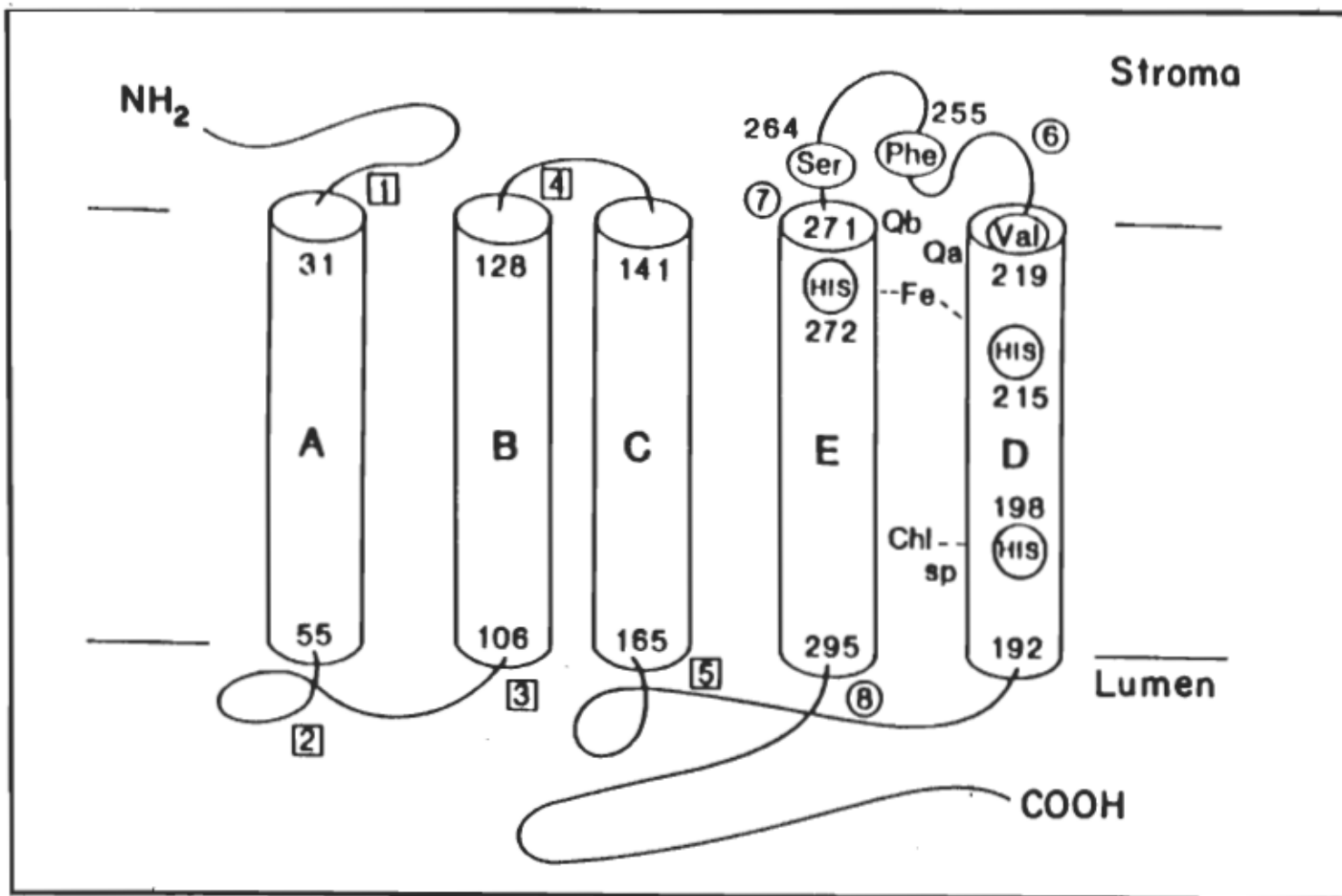


Figure 26. Modèle des cinq hélices transmembranaires de la protéine D1. (D'après Sayer, 1986).

3.2 Etude des relations existant entre molécules de type quinone

Comme mentionné dans la précédente section, le doute plane sur l'utilisation du DPC en présence de molécules de type quinone. Ces molécules étant chimiquement similaires (voir fig. 4), il est donc possible que le DPC déplace ou compétitionne avec l'atrazine pour ainsi lever l'inhibition de façon marquée.

3.2.1 Compétition inhibiteurs/donneur d'électrons La figure 27 nous montre l'inhibition de la photoréduction du DCPIP dans un extrait de thylacoïde d'épinard en fonction de la concentration d'atrazine, avec et sans DPC. Dans le cas du contrôle, l'inhibition croît graduellement avec l'augmentation de la concentration d'inhibiteur. La photoréduction du DCPIP est complètement freinée avec une concentration légèrement supérieure à 10^{-7} M. En présence de 1.6 mM de donneur artificiel d'électrons, on réussit à lever l'inhibition (nette) dans une proportion d'environ 10% et ce à faible concentration d'atrazine ($<10^{-6}$ M). Par contre à plus forte concentration le DPC tend, en moyenne, à lever plus de 15% de l'inhibition. Etant donné que la quantité de DPC est suffisamment élevée et constante, la levée d'inhibition ne devrait pas varier considérablement ou même diminuer en fonction de l'augmentation de la concentration de l'inhibiteur. On observe l'effet contraire probablement dû au fait que le DPC compétitionne pour un même

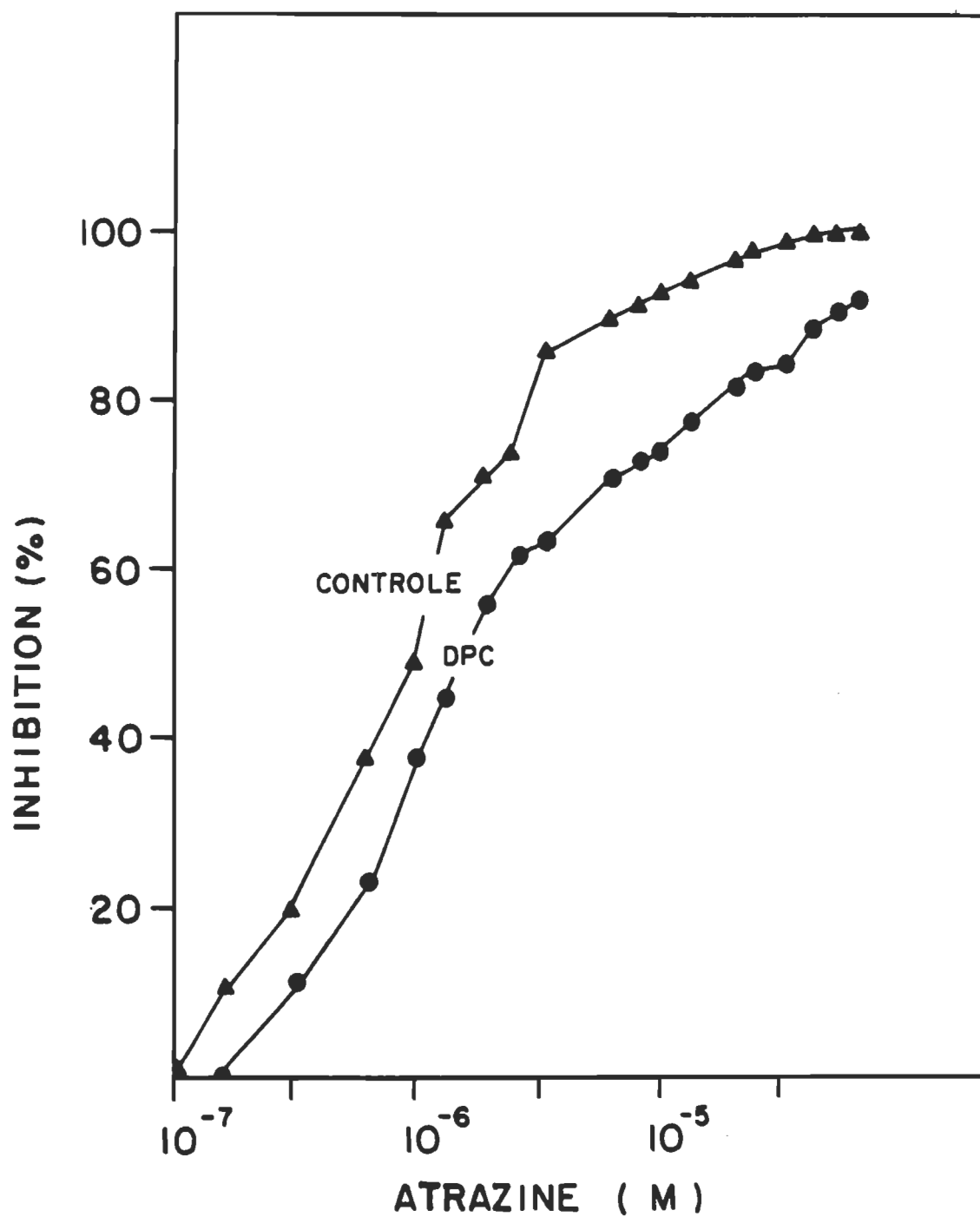


Figure 27. Inhibition de la photoréduction du DCPIP par l'atrazine en présence d'une forte concentration de DPC (1.6 mM) chez des thylacoïdes d'épinard.

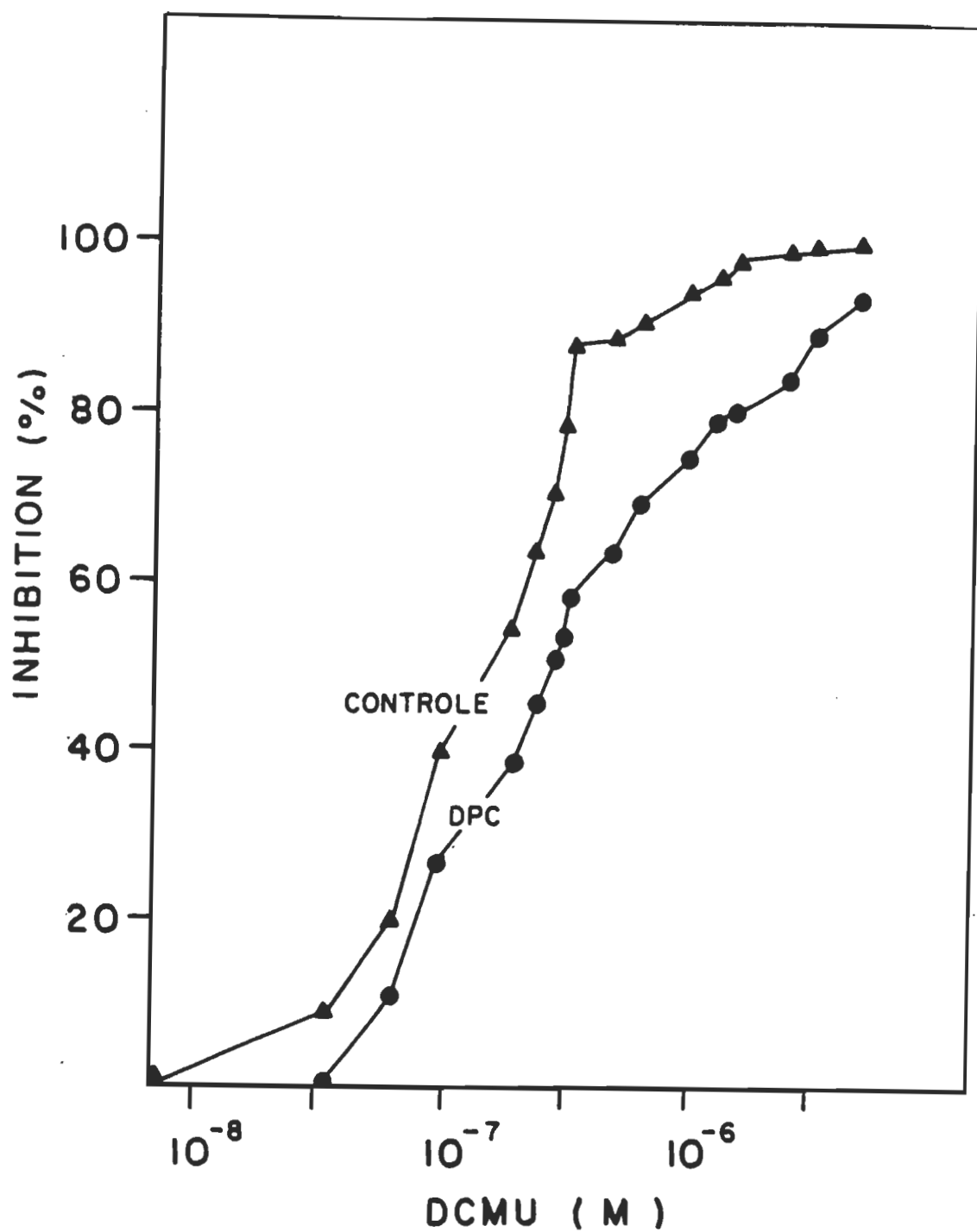


Figure 28. Inhibition de la photoréduction du DCPIP par le DCMU en présence d'une forte concentration de DPC (1.6 mM) chez des thylacoïdes d'épinard.

site. D'autant plus qu'à forte concentration, l'atrazine réussit à occuper le côté luménal du PSII et ainsi favoriser l'action du DPC. La figure 28 démontre le même schéma caractéristique d'inhibition avec et sans donneur d'électrons en utilisant le DCMU pour ainsi appuyer l'hypothèse de départ. Ces deux inhibiteurs, l'atrazine et le DCMU, ont le même site d'action, quoiqu'ils agissent à des concentrations différentes. La levée d'inhibition semble assez régulière à des concentrations inférieures à 5×10^{-7} M de DCMU ($\approx 10\%$) pour ensuite augmenter à plus de 15% avec des concentrations supérieures. Comme avec l'atrazine, le DCMU à très fortes concentrations semble tirer profit du fait que le DPC à 1.6 mM ne suffit plus à lever l'inhibition, en proportion égale, aux deux sites d'action du PSII.

En faisant maintenant varier la concentration de donneur artificiel, nous pourrions mieux cerner l'interaction qui existe entre l'atrazine et le DPC. La photoréduction du DCPIP par les thylacoïdes d'épinard avec et sans inhibiteurs (montrée à la figure 29) semble faire la lumière sur plusieurs points. Dans un premier temps, si on observe le tracé du contrôle, l'activité photosynthétique augmente sensiblement sous l'effet du DPC aux concentrations inférieures à 1.0 mM. A des concentrations supérieures à 1.0 mM, le transport d'électrons atteint un maximum. En présence d'inhibiteurs (atrazine et DCMU) l'activité photosynthétique des membranes thylacoïdiennes est grandement affectée; mais

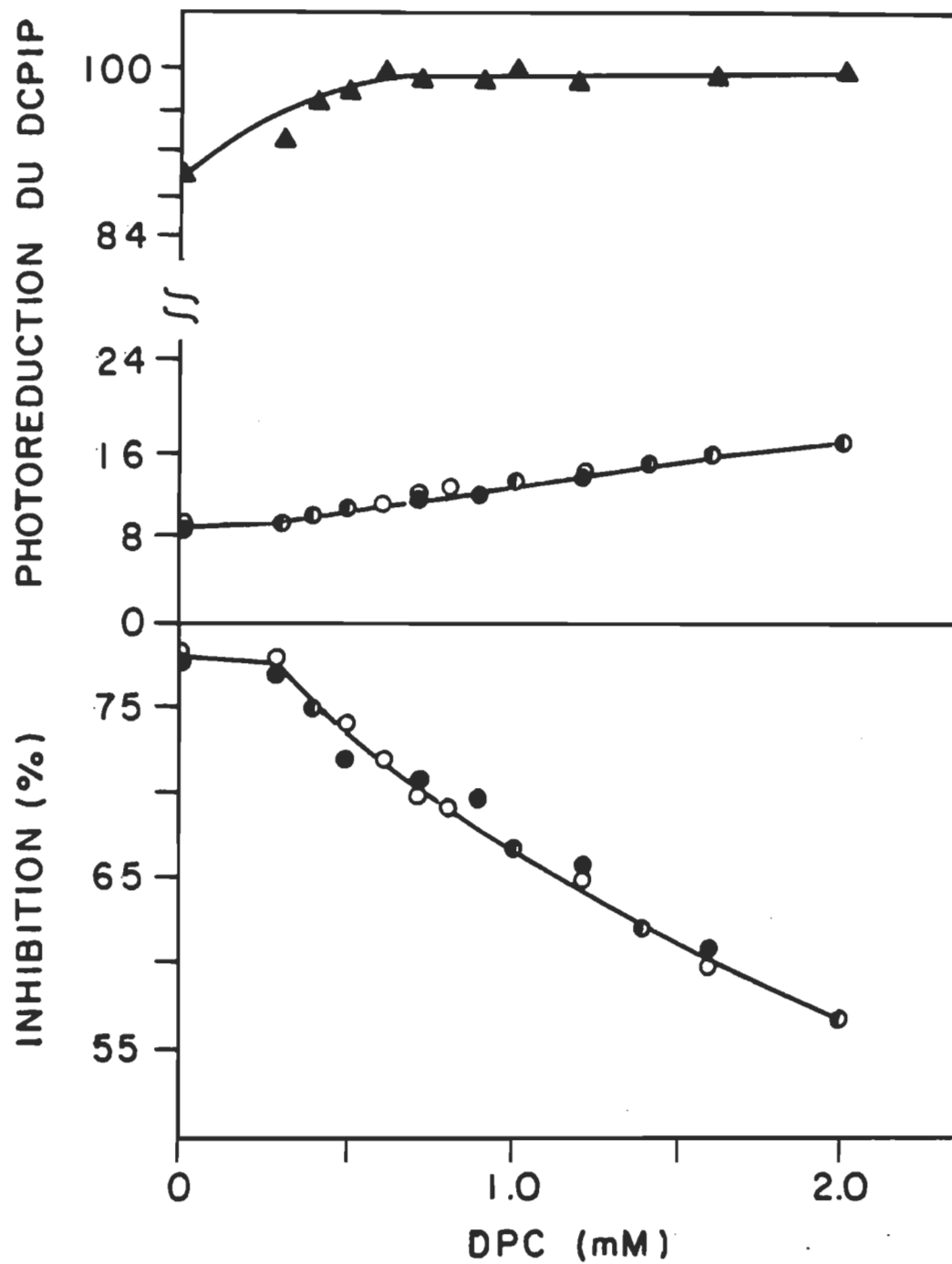


Figure 29. Valeurs de photoréduction et d'inhibition du DCPIP en fonction du DPC et en présence de 6.7×10^{-6} M d'atrazine (●) et 3.3×10^{-7} M de DCMU (○) comparativement au contrôle (Δ), chez les thylacoïdes d'épinard.

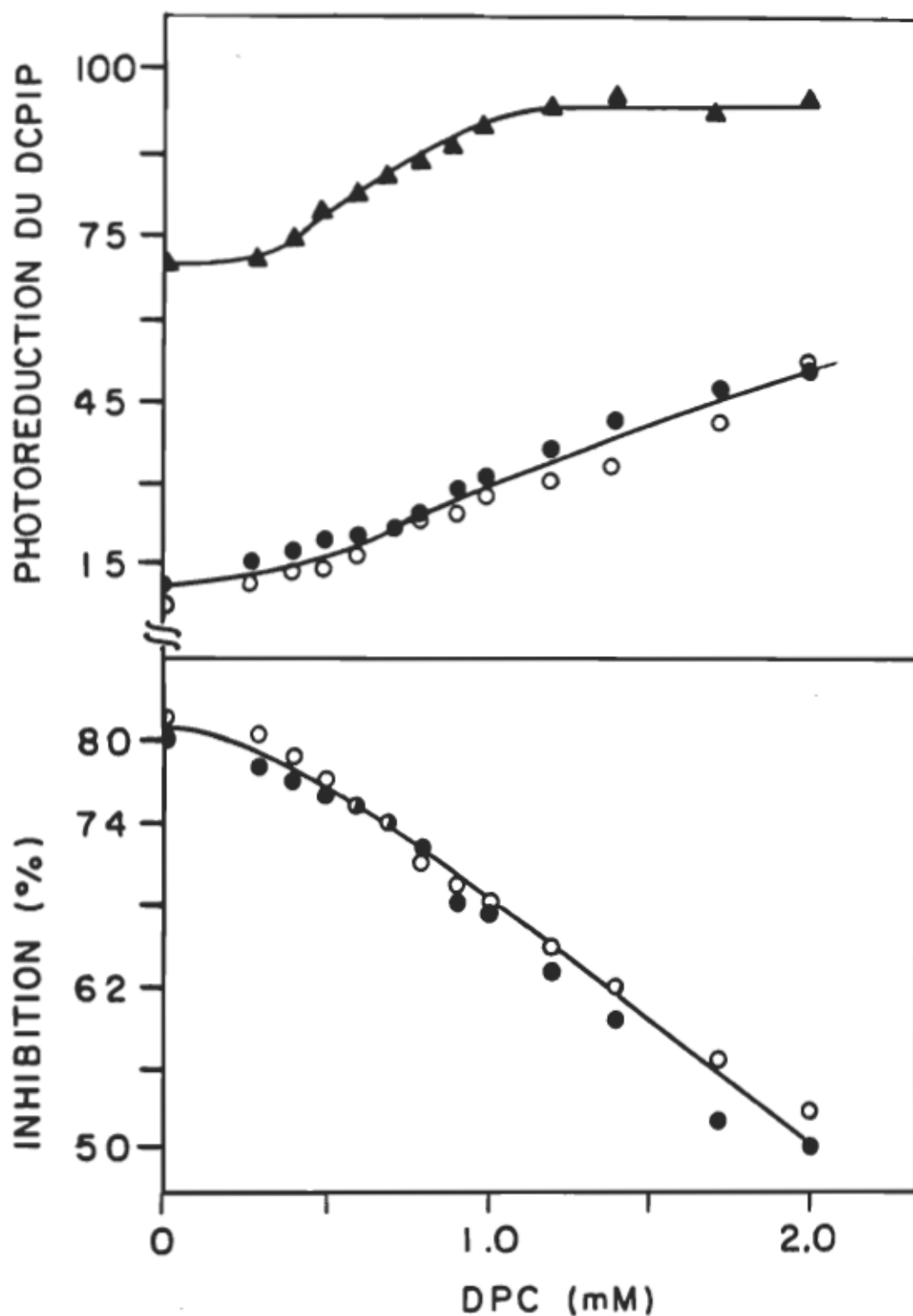


Figure 30. Valeurs de photoréduction et d'inhibition du DCPIP en fonction du DPC et en présence de 2.3×10^{-6} M d'atrazine (●) et 2.0×10^{-7} M de DCMU (○) comparativement au contrôle (○), chez les thylacoïdes d'orge.

l'action du DPC lève cette inhibition sans atteindre l'effet maximum. Ce qui prouve que même en présence de fortes concentrations d'inhibiteurs le DPC déplace ces molécules pour ainsi abaisser l'inhibition. Le tracé du bas (Fig. 29) nous montre que les inhibiteurs sont en quantité suffisante pour inhiber environ 90% de l'activité, qui pourtant est levée, sans la présence d'un plateau à grande concentration de donneur d'électrons. Ce qui rejetterait l'hypothèse d'une quantité insuffisante d'inhibiteurs pour qu'il y ait atteinte trop facilement d'un plateau.

Pour s'assurer de la validité des dernières hypothèses, une autre espèce fut analysée. La figure 30 montre de façon éloquente, la compétition qui existe entre le DPC et les inhibiteurs du transport d'électrons (entre Q_A et Q_B) chez des thylacoïdes d'orge. Vu la plus grande sensibilité de l'orge au DPC, l'effet de ce donneur d'électrons se fait sentir de façon prononcée, comparativement à l'épinard. Par contre le plateau survient approximativement au même endroit, dans le cas du contrôle. En présence d'inhibiteurs on réussit à lever une grande proportion de l'inhibition sans toutefois atteindre un maximum. Egalement dans cet exemple l'inhibition en absence de donneur artificiel d'électrons est élevée, soit d'environ 80% (tracé du bas).

Pour s'assurer de cette réalité, la figure 31 démontre la relation qui existe entre les inhibiteurs et le DPC. On remarque que la même quantité de DPC est nécessaire pour

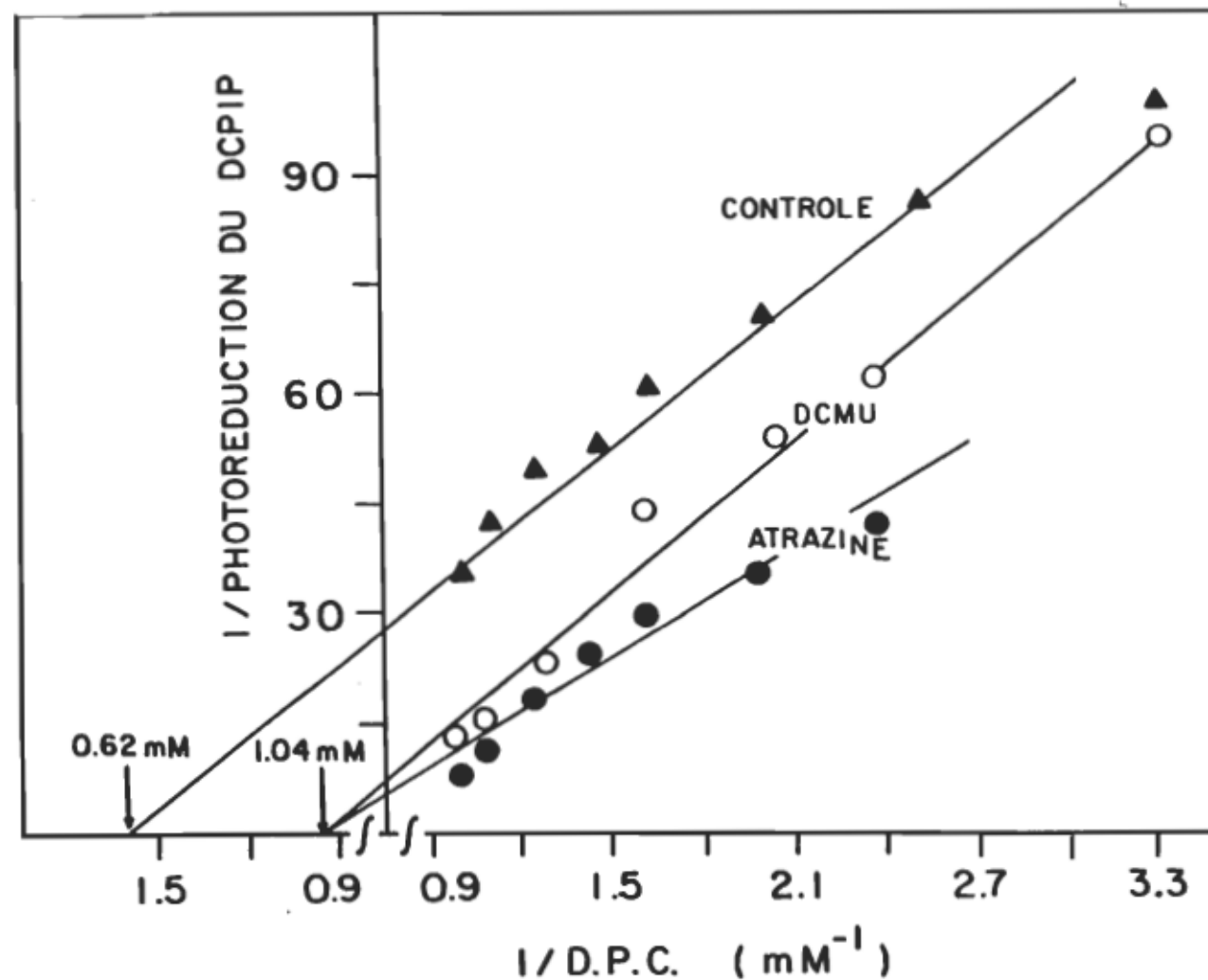


Figure 31. Double réciproque de la photoréduction du DCPIP en fonction du DPC et en présence d'inhibiteurs (voir Fig. 30), chez les thylacoïdes d'orge.

lever l'inhibition (1.04 mM) pour ainsi atteindre 50% de l'activité photosynthétique pour le DCMU et pour l'atrazine; ceci s'explique facilement par le fait qu'ils ont le même site d'action.

3.2.2 Interaction donneur/accepteur d'électrons On

peut se demander, à titre de vérification, si le DPC affecterait l'accepteur d'électrons par le même mécanisme que pour les inhibiteurs étant donné la similitude relative des molécules et que le DCPIP agit au même niveau que l'atrazine et le DCMU (Q_p). A l'aide de thylacoïdes d'épinard on peut démontrer que le DPC n'affecte nullement le mécanisme de capture d'électrons par le DCPIP (Fig. 32). Aux faibles concentrations de DCPIP ($<10 \mu\text{M}$), le flux d'électrons ne peut être capté entièrement et l'action du DPC n'est pas discernable; par contre au-dessus de cette concentration, 1.6 mM de donneur d'électrons produit une augmentation sensible de l'activité photosynthétique. Dans le cas présent on atteint un plateau en présence d'environ $20 \mu\text{M}$ de DCPIP. On peut donc en conclure que lorsque la quantité requise pour accepter le flux d'électrons est atteinte, la réaction est saturée et aucune augmentation de photoréduction n'est perceptible (non causé par le DPC). Pour les expériences de photoréduction, $30 \mu\text{M}$ de DCPIP sont utilisés, ce qui correspond à la zone du plateau.

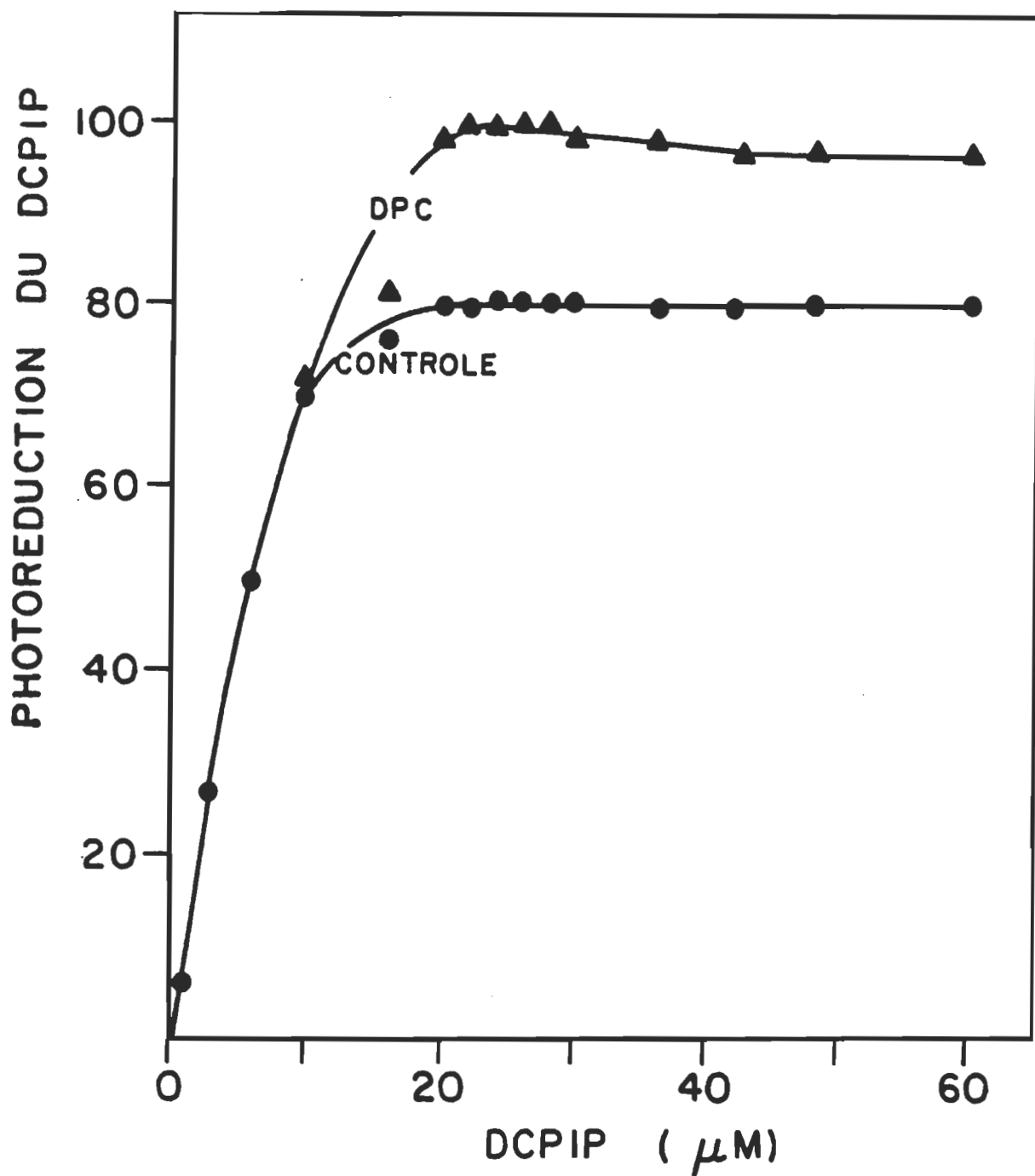


Figure 32. Photoréduction du DCPIP en fonction du DCPIP avec et sans DPC (1.6 mM) chez les thylacoïdes d'épinard.

3.2.3 Mesure de dégagement d'oxygène

Les mesures

de la figure 33 ont été obtenues en présence de 7.5×10^{-5} M d'atrazine, pour ainsi obtenir une inhibition du dégagement d'oxygène de 60 pourcent et l'activité passe de 430 à 180 $\mu\text{M O}_2 \cdot \text{ml}^{-1} \text{h}^{-1}$ (180 étant normalisé à 100 sur la figure). L'oxygène dégagé du côté luménal du PSII est enregistré, en absence et en présence de donneurs artificiels d'électrons. L'ajout de MnCl_2 provoque une baisse sensible de l'activité relative vu la compétition qu'il exerce avec l'eau, donneur naturel d'électrons. Cette diminution n'est pas affectée par l'augmentation de la quantité de donneur; même avec de très fortes concentrations (>1.5 mM), la quantité d'oxygène dégagée n'est pas affectée. Par contre le DPC compétitionne beaucoup plus fortement avec l'eau, ce qui nous donne une activité très faible. Cependant, contrairement au MnCl_2 , une augmentation de la concentration en DPC réussit à mousser le rendement photosynthétique de façon spectaculaire. Ce qui suggère que le DPC déplace l'atrazine de son site d'action et diminue ainsi son effet inhibiteur.

3.2.4 Relation entre la liaison de l'atrazine et la levée de l'inhibition

Les résultats nous

poussent à faire une étude plus approfondie des interrelations existant entre l'atrazine et le donneur d'électrons artificiel. D'après les premiers travaux de Tischer (1977)

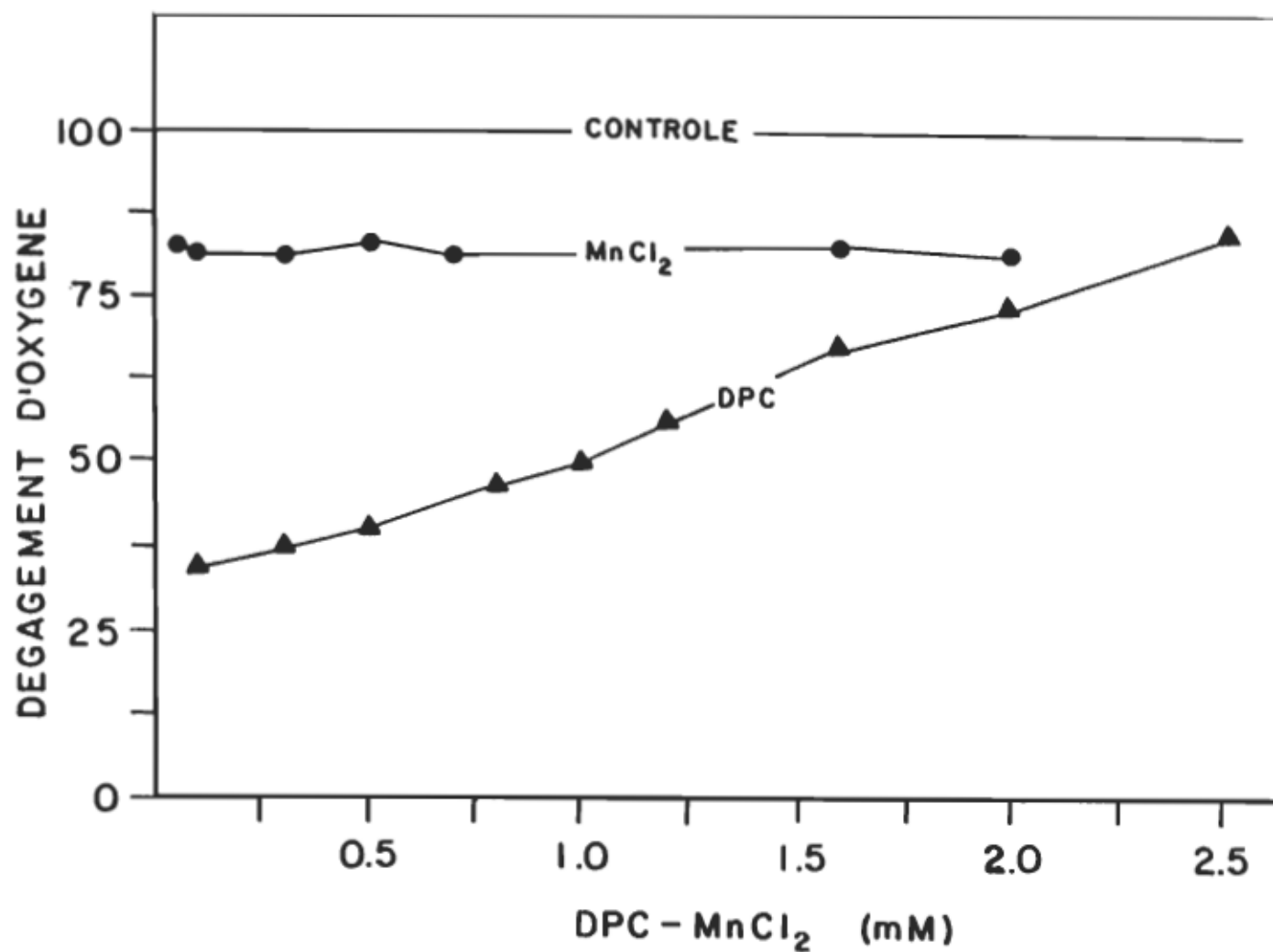


Figure 33. Dégagement d'oxygène en présence d'atrazine (7.5×10^{-5} M \rightarrow 60% d'inhibition) en fonction de donneurs d'électrons chez les thylacoïdes d'épinard.

nous pouvons, à l'aide d'inhibiteur marqué, établir une relation directe avec l'atrazine se liant ou non à la membrane thylacoïdienne. Comme mentionné dans la section 2.5.2 iii, une incubation et une centrifugation suffisent à séparer l'atrazine lié et non-lié et ainsi évaluer la liaison en présence de DPC. La figure 34 démontre la proportion d'atrazine lié par rapport à l'atrazine libre et ce en faisant varier la concentration de DPC. Avec une concentration fixe d'inhibiteur on peut ainsi déterminer la quantité de complexe lié. L'allure générale de la courbe en présence de 0.2 μM d'atrazine démontre qu'il y a de moins en moins d'inhibiteur lié à mesure que la quantité de donneur augmente. Même avec une concentration moyenne de 0.5 mM, le DPC réussit à restreindre la liaison de façon significative. Ainsi on passe de 20 n mol d'atrazine marqué (^{14}C -atrazine lié) à faible concentration de DPC, à environ dix fois moins avec une très forte concentration de donneur (3.0 mM). A faible concentration d'atrazine (0.05 μM) on remarque toujours une réduction marquée d'inhibiteur lié à la membrane du à la présence de DPC; on réussit même à ce que le DPC compétitionne à un point tel, qu'il ne puisse s'y lier.

Ce dernier résultat soutient l'hypothèse de départ voulant qu'il y ait compétition pour un même site entre les molécules inhibitrices de type quinones et le donneur artificiel d'électrons. Un point culmine dans ce mécanisme d'inhibition, c'est que le DPC semble compétitionner à de

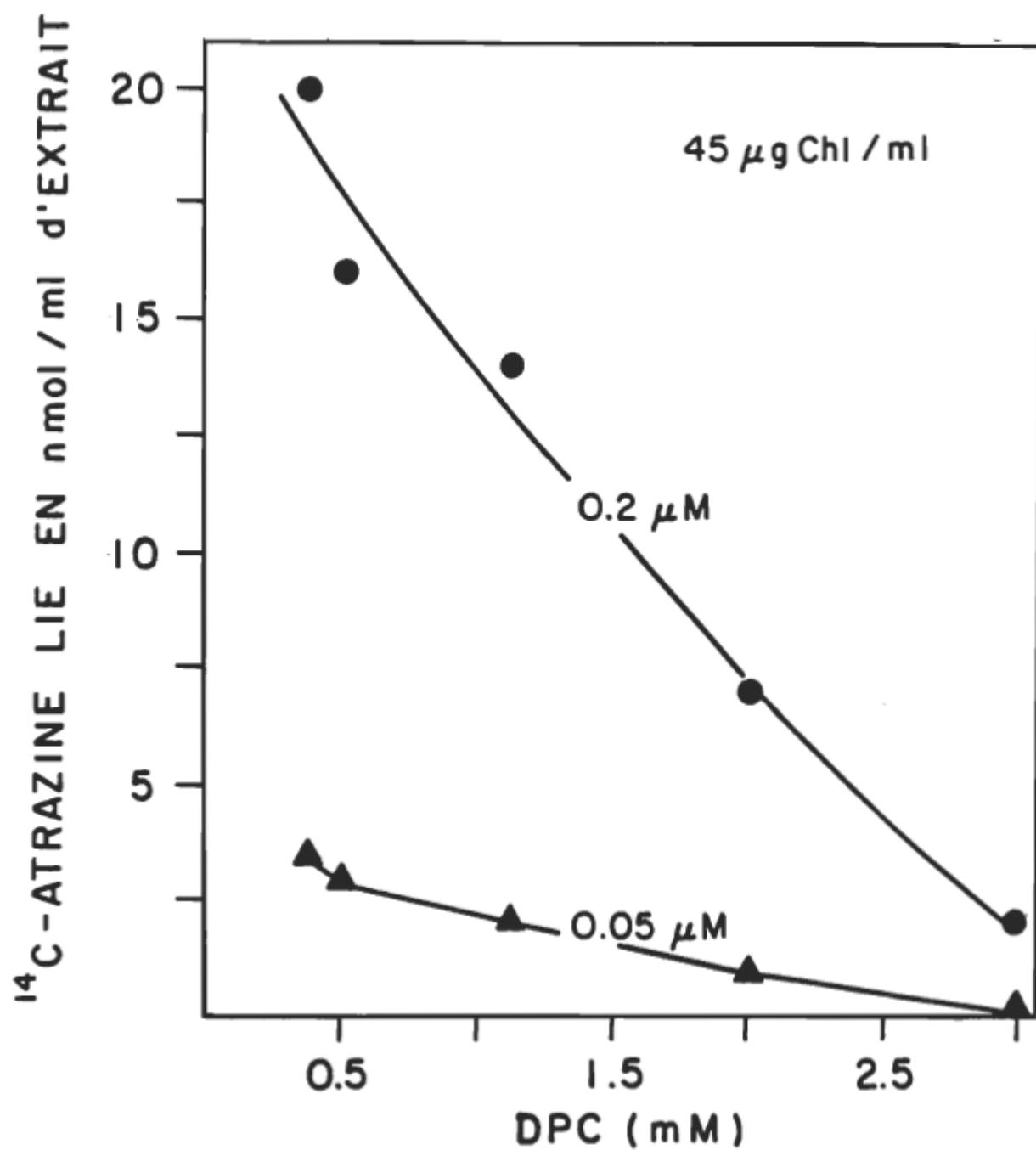


Figure 34. Liaison de l'atrazine marquée en fonction du DPC chez les thylacoïdes d'épinard en présence de deux concentrations d'atrazine (0.2 μM et 0.05 μM).

très fortes concentrations mais également à de très faibles (0.38 mM). Ce qui nous amène à discuter de la validité de l'utilisation de ce donneur en présence de molécules étant chimiquement similaires ou encore avec des inhibiteurs de type quinone. Le DPC est toujours très utilisé pour étudier le transport d'électrons, autant au niveau des études fondamentales qu'appliquées. La difficulté est évidemment relié à la concentration de donneur utilisé et à la nature des molécules externes qui sont utilisées. Plusieurs travaux à ce sujet préconisent une forte concentration de DPC (1.0mM) dans le but d'étudier un système photosynthétique fortement endommagé (Radunz, 1982; Satoh, 1983; Dietz, 1988).

La diversification des travaux en utilisant le DPC s'étend aussi à des stress extérieurs pouvant causer une inhibition du transport d'électrons. L'inactivation des électrons due au stress à la chaleur n'échappe pas à l'utilisation du DPC dans le but d'élucider le mécanisme et le site d'action, vu le propre site d'action connu du donneur (Coleman, 1987; Inoué, 1987). Le vaste champ d'étude impliquant l'inhibition photosynthétique causée par des enzymes (qui ont souvent un site d'action spécifique) nécessite un donneur d'électrons dont le site d'action est connu pour en révéler les effets sur les protéines (Rawyler, 1980; Rawyler, 1981). Tout ces travaux se basent sur des études utilisant le DPC avec des fragments de chloroplastes inhibés par du DCMU (Vernon, 1969; Lach, 1977; Dekker, 1984).

En présence de 0.5 mM de DPC, une forte concentration de DCMU (10 μ M) ne réussit pas à inhiber complètement l'activité photosynthétique. Ceci prouve qu'il faut être très vigilant avec l'utilisation du DPC et cela surtout en présence de molécules inhibitrices du type DCMU ou atrazine.

On peut maintenant essayer de caractériser davantage la liaison de l'atrazine à la membrane thylacoïdienne. Les travaux de Tischer (1977) sont d'un apport considérable pour la compréhension moléculaire des relations existant entre l'inhibiteur et son site de liaison. Pour ce faire, une méthode devenue maintenant classique, consiste à tracer un graphique de double réciproque ou les résultats sont transformés en relation linéaire (Tischer, 1977; Pfister, 1979; Böger, 1982; Oettmeier, 1982; Jursinic, 1983; Mattoo, 1984; Vermaas, 1984; Carpentier, 1985; Graan, 1986; Renger, 1986; Renger, 1988; Renger, 1989; Oettmeier, 1989). L'information fournie par ce tracé, fait ressortir l'aspect quantitatif de l'analyse de la liaison.

La figure 35 nous fournit les proportions d'atrazine lié en fonction de l'atrazine libre. On remarque que la constante de liaison, K (l'inverse du point de jonction avec l'abscisse) diffère de la valeur du contrôle en présence des molécules inhibitrices (DCMU et DPC). Dans le cas de la membrane, en présence d'atrazine seulement, la valeur est plus basse, soit de 0.19 μ M d'atrazine. Par contre avec

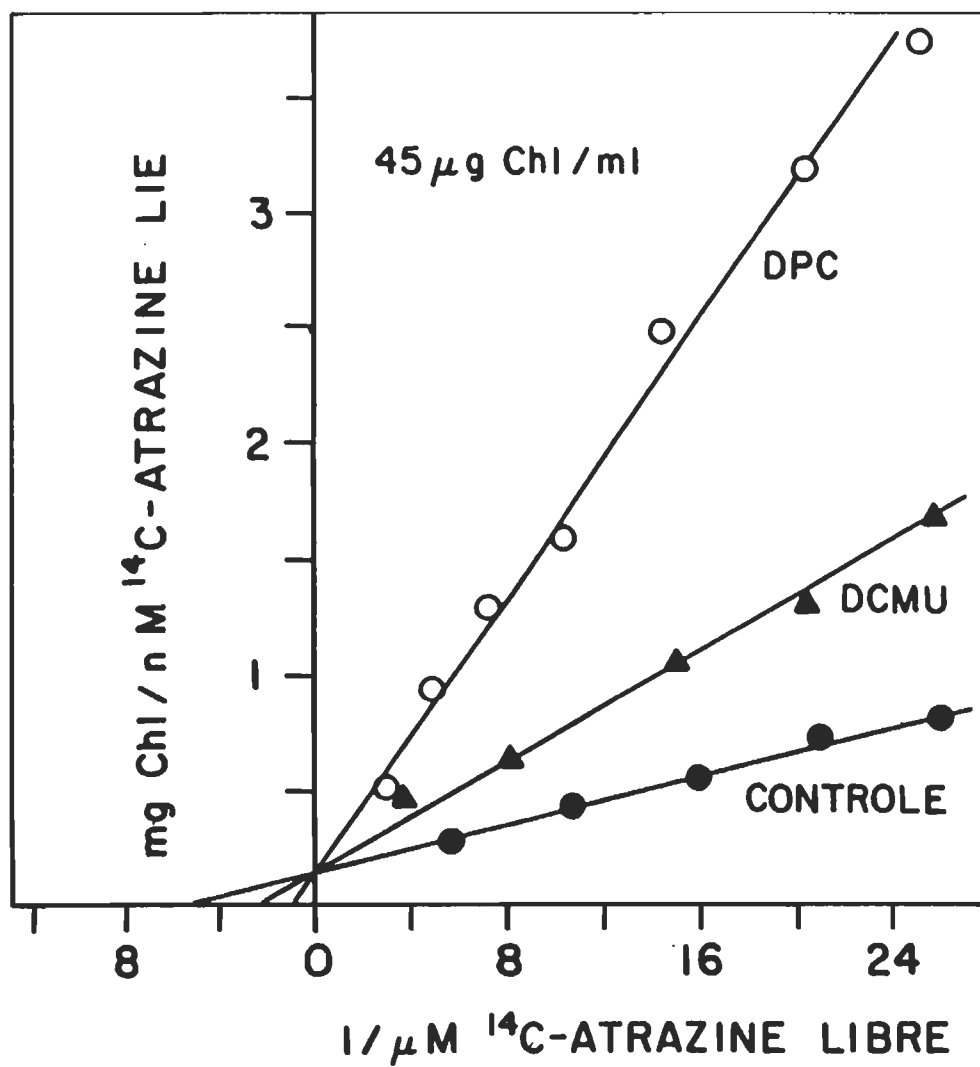


Figure 35. Atrazine- 14 C liée en fonction de l'atrazine- 14 C libre en présence de DPC (0.5 mM) et de DCMU (4×10^{-8} M), chez les thylacoïdes d'épinard.

l'ajout de DCMU, dont la proximité de son site d'action avec celui de l'atrazine est corroborée (Pfister, 1979), K augmente considérablement. Cette constatation s'applique également avec l'addition de DPC; donc plus l'inhibiteur est fort plus K est élevé. Cette dernière affirmation s'explique aisément par le fait que la constante de liaison est proportionnelle à l'atrazine libre, qui nécessairement augmente avec l'augmentation de compétition causée par le DCMU et le DPC. Par contre, même si la constante de liaison diffère avec le type de molécules ajouté, la concentration totale de sites spécifiques de liaison reste identique soit de 165 Chl/atrazine (voir le tableau 2 et l'annexe A). Par le fait même, étant donné que cette valeur est la même avec ou sans inhibiteur (jonction identique à l'ordonnée), on peut affirmer que l'inhibition de la liaison de l'atrazine sur son site d'action (voir section 3.1) est du type compétitif. L'allure générale du graphique nous révèle donc une inhibition compétitive du DPC envers l'atrazine et ce, soit pour l'affinité d'un site commun ou analogue, ou simplement par la similitude conformationnelle des molécules (pour une synthèse des résultats du sujet voir Purcell, 1990c).

TABLEAU 2

EVALUATION DE LA CONSTANCE DE LIAISON (K) ET DU NOMBRE DE
SITE DE LIAISON (X_t ; CHLOROPHYLLES PAR MOLECULE D'ATRAZINE
LIÉE)

Molécules inhibitrices

	K (μ M)	X_t (Chl/atrazine)
Contrôle	0.19	165
DCMU	0.43	165
DPC	1.0	165

3.3 Réactions d'oxydo-réduction du cytochrome b-559

Le cytochrome b-559 reste une composante énigmatique et mal comprise autant du point de vue fonctionnel que structural. On observe des changements importants du cytochrome b-559 caractérisant les biotypes sensibles et résistants. Quoique encore nébuleuses, les modifications cinétiques qu'apportent ces changements structuraux peuvent affecter le transport d'électrons. Les mesures présentées dans cet ouvrage sont basées principalement sur les réactions d'oxydoréduction donc sur la mobilité des électrons. Sachant, par des mesures de fluorescence, que la membrane est plus fluide chez le biotype résistant à l'atrazine (Lehoczki, 1985), et que le complexe chlorophyllien (a/b) associé au PSII est plus important chez ce même biotype (Burke, 1982), il devient donc très important d'en étudier les différentes avenues. Plus proche de nos mesures, Rashid (1987) affirme que le CCCP est plus efficace lors de l'inhibition du flux d'électrons toujours chez le biotype résistant à l'atrazine. Une analyse du cytochrome b-559 se voulant préliminaire, n'est certes pas à négliger dans l'approche d'une meilleure compréhension du PSII envers les inhibiteurs.

Cette section a pour but, en premier lieu, de comparer la réduction quantitative du cytochrome, des biotypes sensibles et résistants chez plusieurs plantes; et dans un

deuxième temps, évaluer la cinétique d'oxydo-réduction du cytochrome en présence d'inhibiteur du PSII.

3.3.1 Etude comparative du cytochrome b-559 Pour les mesures qui suivent, on tente d'étudier séparément le cytochrome à haut et à bas potentiel. Il suffit donc de mesurer le changement d'absorbance en faisant varier la longueur d'onde pour ainsi obtenir une valeur proportionnelle à la quantité de cytochrome oxydé ou réduit. La première étape consiste à oxyder le cytochrome b-559 en utilisant du ferricyanure de potassium. La figure 36 A nous montre l'oxydation du cytochrome, à partir de particules de PSII de Chenopodium sensible. On obtient une valeur de 0.0081 par rapport à la ligne de base, ce qui nous permet en second lieu de réduire le haut potentiel à l'aide d'hydroquinone (Fig. 36 B). Se servant toujours de la même préparation, on peut réduire le cytochrome b-559 à bas potentiel en se servant d'acide ascorbique (Fig. 36 C). La valeur est très élevée (0.0081), mais connaissant la non-spécificité de l'acide ascorbique, il est possible qu'une faible portion du cytochrome b-559_{HP} laissée oxydée par l'hydroquinone, y soit également réduite. La dernière étape consiste à s'assurer que tout le cytochrome à bas potentiel ait été réduit. L'utilisation d'hydrosulfite de sodium (dithionite) nous procure l'assurance d'une plus grande spécificité à l'égard du bas potentiel et également étant un réducteur plus fort,

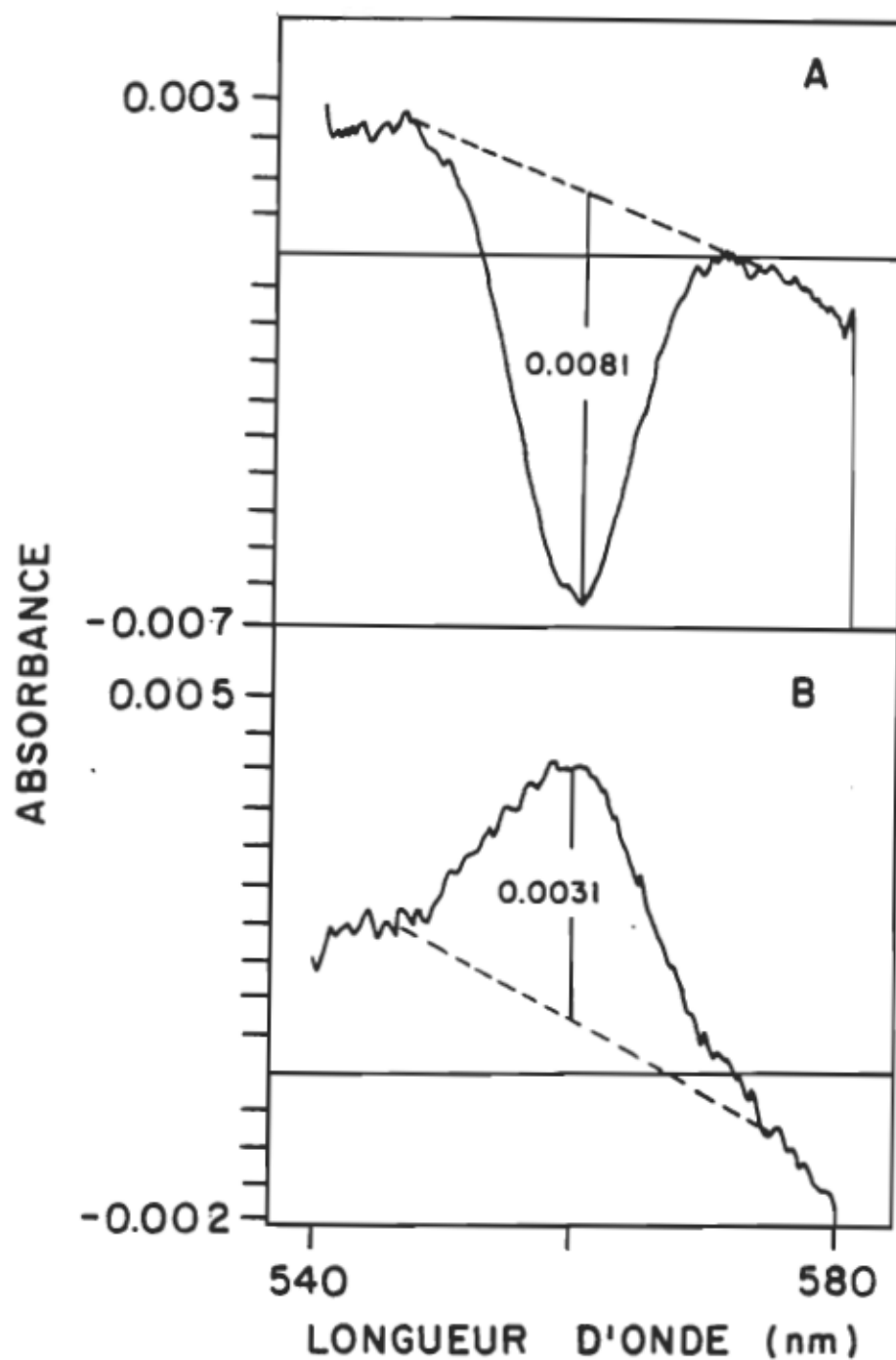


Figure 36. Photooxidation (A) et photoréduction (B,C et D) du cytochrome b-559 à haut (A et B) et à bas potentiel (C et D) chez les PSII de Chenopodium album L. sensible. Voir aussi la section 2.5.2 iv.

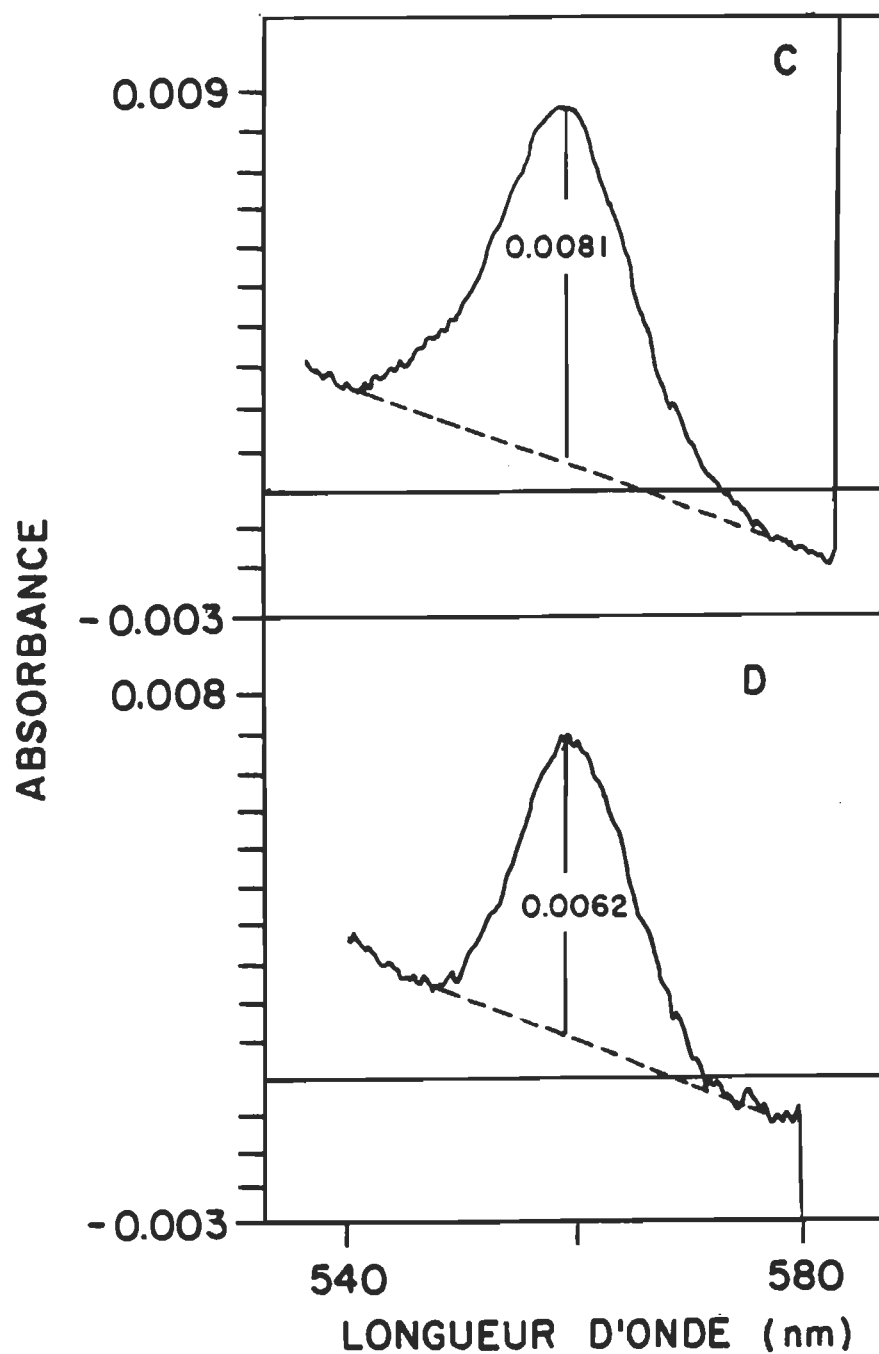


Figure 36. (suite) Photooxydation (A) et photoréduction (B,C et D) du cytochrome b-559 à haut (A et B) et à bas potentiel (C et D) chez les PSII de Chenopodium album L. sensible. Voir aussi la section 2.5.2 iv.

de réduire une très grande partie sinon la totalité du cytochrome b-559_{BP}. On se rend compte que cette dernière étape s'avère très importante; réduisant encore 0.0062 (en valeur d'absorbance), succédant ainsi à l'étape précédente (Fig. 36 D). A titre comparatif, il est intéressant de mesurer ces mêmes valeurs chez le biotype résistant à l'atrazine de la même plante. Il semble, de manière globale que les résultats pour ce dernier biotype soient légèrement inférieurs qu'avec le biotype sensible à l'exception de la réduction du cytochrome b-559_{HP} (Fig. 37 A,B,C et D).

Chacune de ces mesures a été répétée avec Amaranthus et Brassica chez les deux biotypes pour s'assurer de la validité et de la constance des résultats (voir tableau 3). Les mesures du tableau ont été transformées en μM de cytochrome b-559; en utilisant $20 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ comme coefficient d'extinction molaire (Bendall, 1971). Afin d'établir une relation entre le cytochrome b-559 à haut et à bas potentiel, la proportion de HP/BP+HP a été calculée pour chaque biotype (rapport représenté en bout de colonne de chaque biotype respectivement; tableau 3). Ce rapport reste une approximation de la valeur réelle étant donné que la réduction du cytochrome b-559_{BP} par l'acide ascorbique peut contenir une partie du changement d'absorbance de la réduction du cytochrome à haut potentiel (comme mentionné dans le texte précédemment). Dans chacun des cas où les deux biotypes sont représentés, la plante sensible à l'atrazine

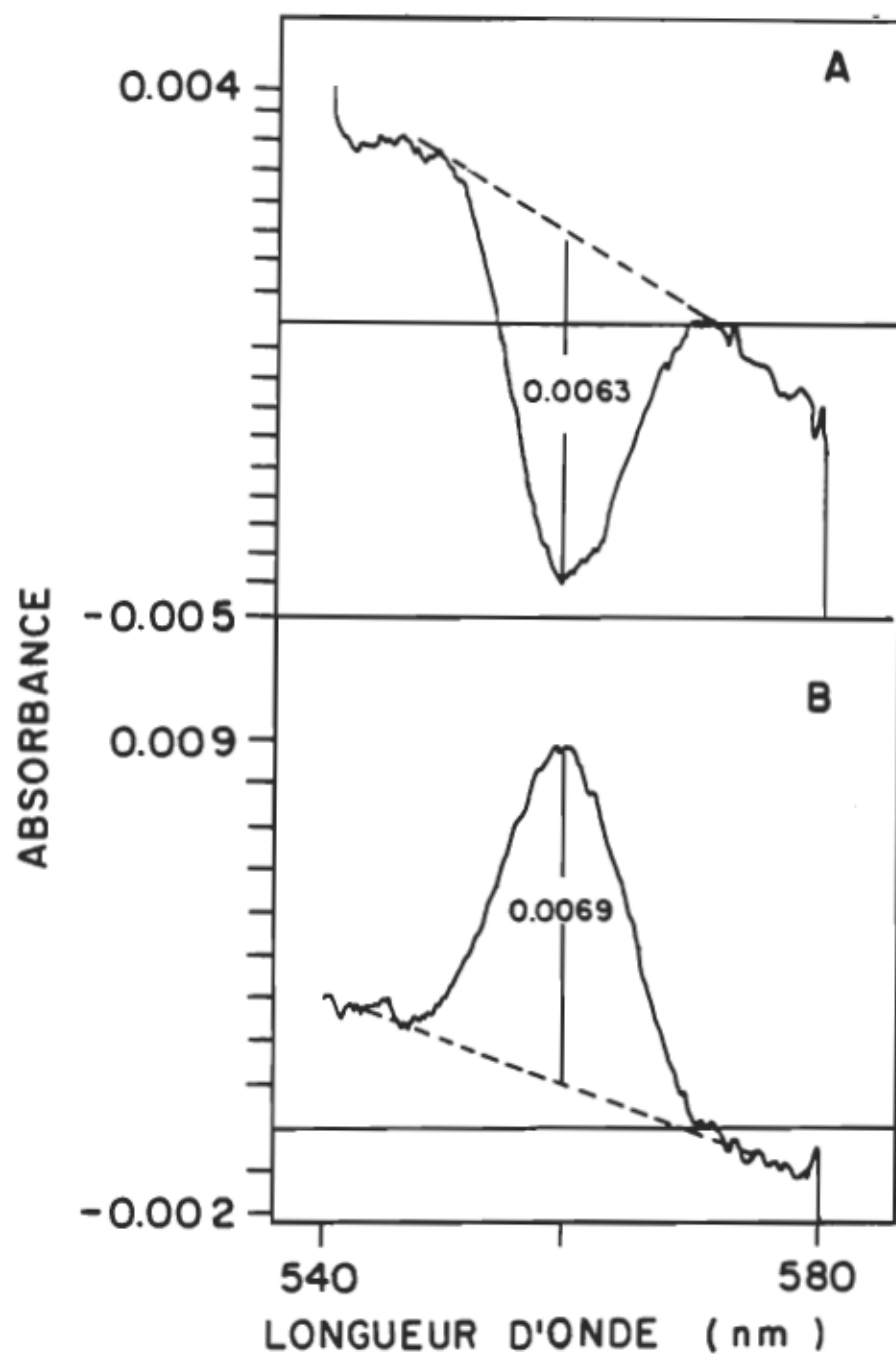


Figure 37. Photooxidation (A) et photoréduction (B,C et D) du cytochrome b-559 à haut (A et B) et à bas potentiel (C et D) chez les PSII de *Chenopodium album* L. résistant. Voir aussi la section 2.5.2 iv.

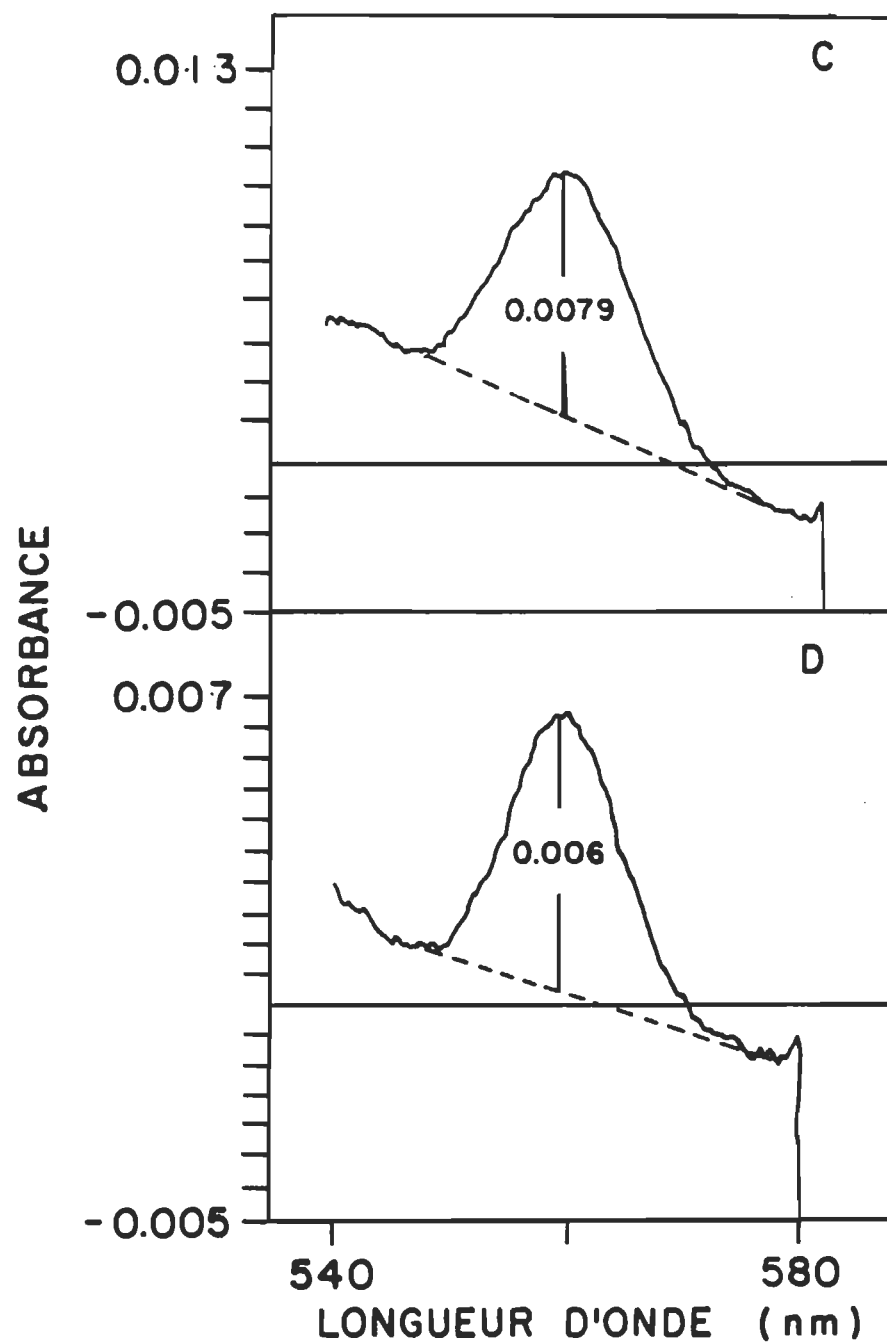


Figure 37. (suite) Photooxidation (A) et photoréduction (B,C et D) du cytochrome b-559 à haut (A et B) et à bas potentiel (C et D) chez les PSII de Chenopodium album L. résistant. Voir aussi la section 2.5.2 iv.

TABLEAU 3

ETUDE COMPARATIVE ET QUANTITATIVE DU CYTOCHROME b-559_{HP} ET b-559_{BP} CHEZ LES
BIOTYPES RÉSISTANTS ET SENSIBLES A L'ATRAZINE

cyt b-559	Chénopodium		Amaranthus		Brassica		Epinard
	sensible-résistant		sensible-résistant		sensible-résistant		
oxydé HP	0.41	0.32	0.32	0.26	0.43	0.20	0.36
réduit HP	0.16	0.35	0.06	0.07	0.12	0.0	0.27
réduit BP	0.41	0.40	0.26	0.40	0.35	0.25	0.43
réduit BP (dithionite)	0.31	0.30	0.41	0.35	0.33	0.30	0.40
HP/HP+BP	0.46	0.31	0.44	0.46	0.54	0.40	0.49

obtient le plus fort taux. Ce qui signifie qu'il y aurait, de façon significative, plus de cytochrome à haut potentiel proportionnellement à celui à bas potentiel (par exemple, 0.46 comparativement à 0.31 pour le biotype résistant). Dans le but de généraliser une proportion de cytochrome à haut potentiel par rapport au bas potentiel, la moyenne des trois proportions des biotypes sensibles a été calculée à 0.48; comparativement à 0.39 chez les biotypes résistants à l'atrazine. De façon générale on peut affirmer qu'il y a un peu moins de cytochromes b-559_{HP} que de cytochromes b-559_{BP}. Sachant que le cytochrome b-559_{BP} est une forme altérée et non physiologique du cytochrome b-559_{HP} (Heber, 1979; Tsujimoto, 1985; Cramer, 1986; Rao, 1986; Barber, 1987), il est normal dans le cas du biotype résistant, qu'il y ait plus de cytochrome à bas potentiel (rapport HP/BP+HP plus petit). Cette idée est basée sur le fait que du point de vue moléculaire, les chances sont plus élevées que le centre réactionnel du PSII d'une plante résistante, dont fait partie le cytochrome b-559, subisse un changement conformationnel pouvant ainsi modifier le potentiel redox du cytochrome.

L'épinard a aussi été étudié dans le but d'établir une comparaison entre ce type de plante et le groupe dont on possède les deux biotypes (Fig. 38 A,B,C,D et tableau 3). Le comportement de cette plante se rapproche de très près des autres plantes et ainsi, son étude ultérieure s'avérera représentative.

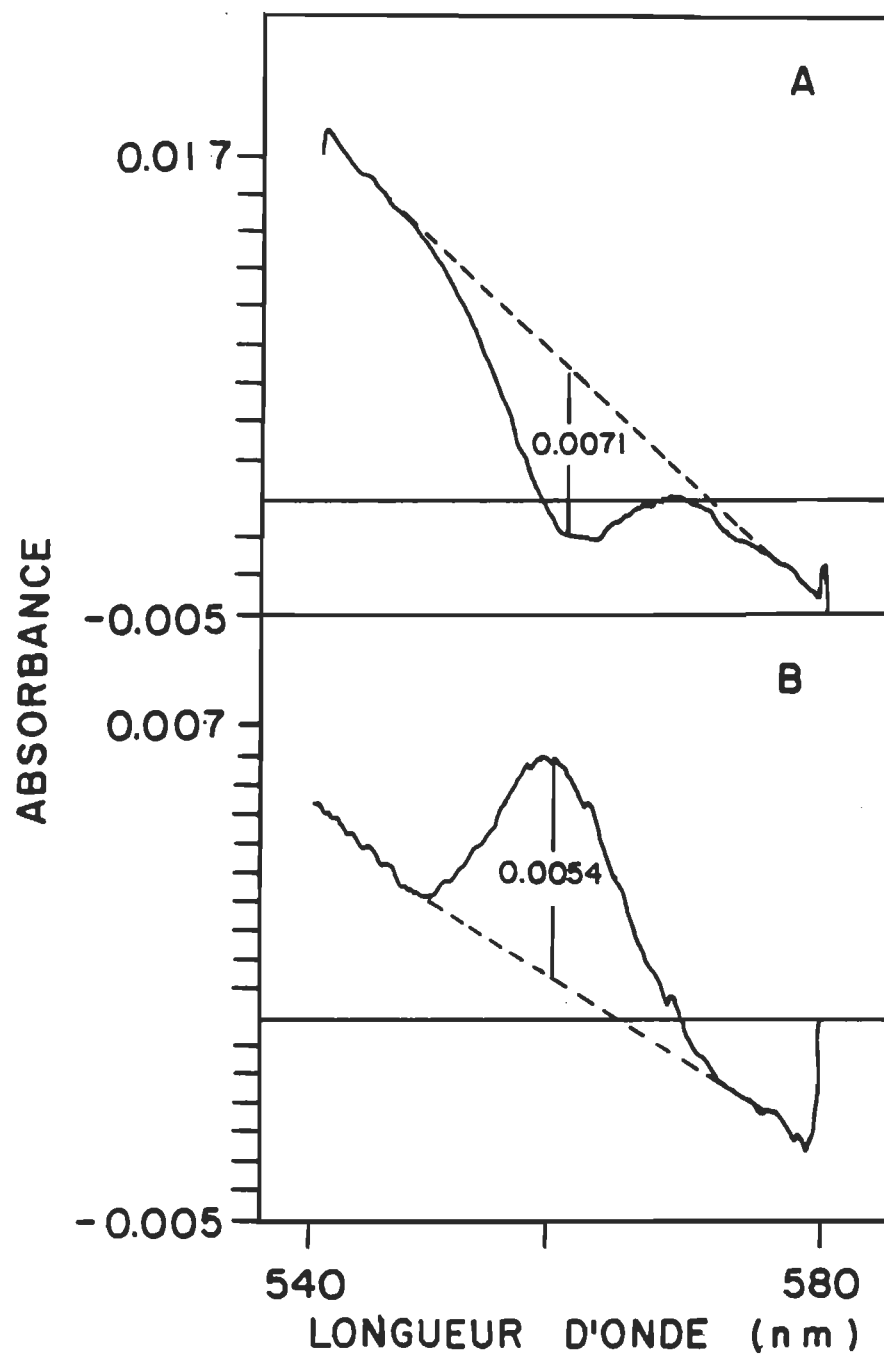


Figure 38. Photooxidation (A) et photoréduction (B,C et D) du cytochrome b-559 à haut (A et B) et à bas potentiel (C et D) chez l'épinard. Voir aussi la section 2.5.2 iv.

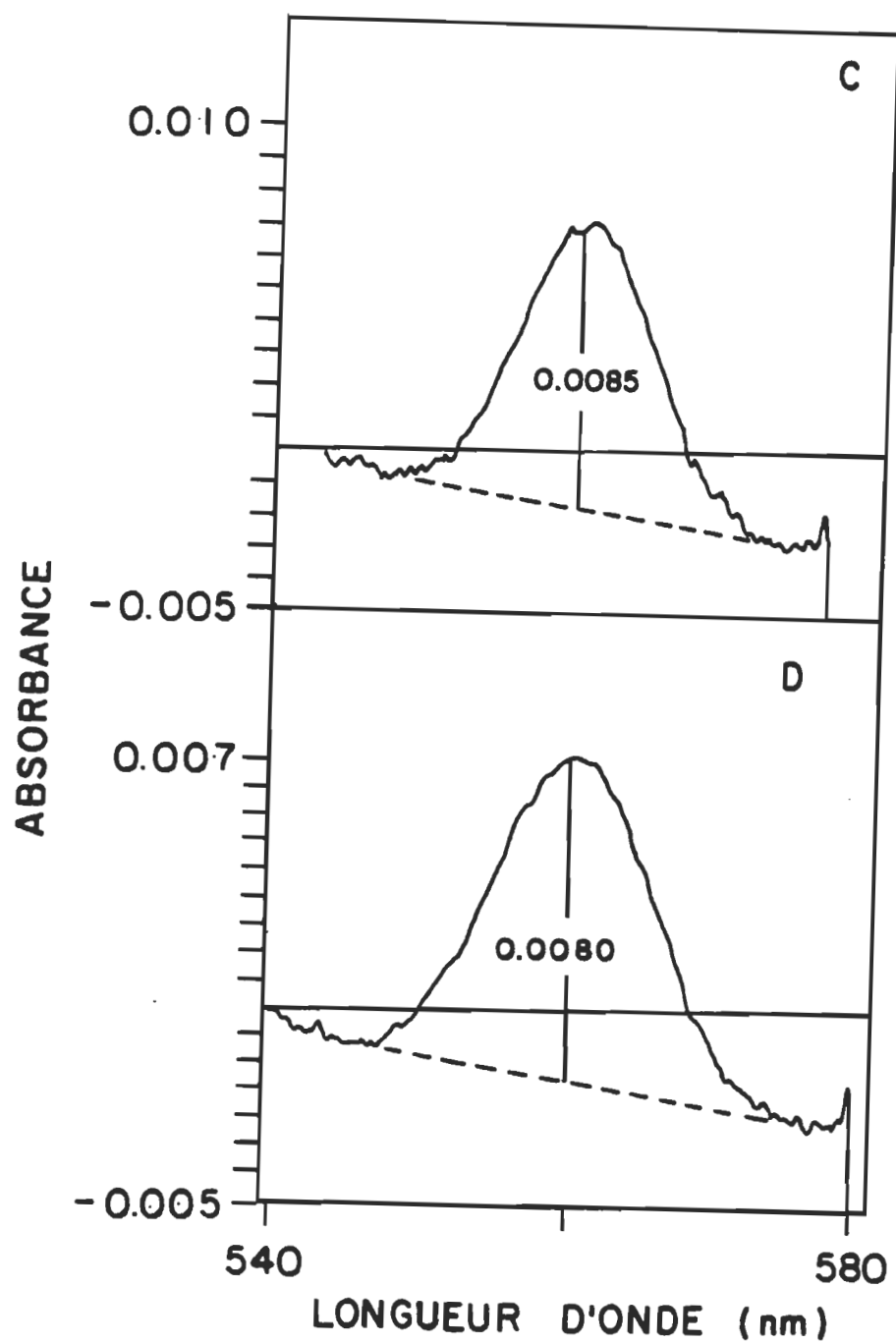


Figure 38. (suite) Photooxidation (A) et photoréduction (B,C et D) du cytochrome b-559 à haut (A et B) et à bas potentiel (C et D) chez les PSII d'épinard. Voir aussi la section 2.5.2 iv.

3.3.2 Photoréduction du cytochrome b-559 Avant même d'évaluer la réduction du cytochrome en présence d'inhibiteurs du PSII, il faut mettre en relief les paramètres expérimentaux et ainsi s'assurer que l'étude est focalisée uniquement sur le cytochrome b-559. Un premier test consiste à vérifier si la différence maximum d'absorbance se produit à 559 nm et ce en faisant varier la longueur d'onde. La figure 39 nous montre un exemple de changement d'absorbance ou la longueur d'onde a été fixée à 561 nm. En laissant progresser la photoréaction pendant sept minutes, pour ainsi atteindre le maximum, on obtient dans ce cas une différence d'absorbance (A) de 0.0030 (le temps requis pour que l'induction soit complète, est relié à la désorganisation du PSII causée par le traitement au Triton). En reliant les points pour chacune des longueurs d'onde utilisées, on obtient un maximum à 559 nm (Fig. 40; voir aussi Whitmarsh, 1977; Ortega, 1988). Ceci nous assure que par cette méthode, on mesure spécifiquement le cytochrome b-559 et non d'autres composantes comme le cytochrome-b qui absorbe vers 563 nm donc très près du b-559 (Nelson, 1972; Wikstrom, 1972).

En plus d'utiliser le maximum de la différence d'absorbance comme unité de mesure, nous pouvons nous servir de la vitesse initiale (pente) de la courbe de changement d'absorbance pendant la première minute. L'intensité lumineuse est un autre paramètre important à considérer dans

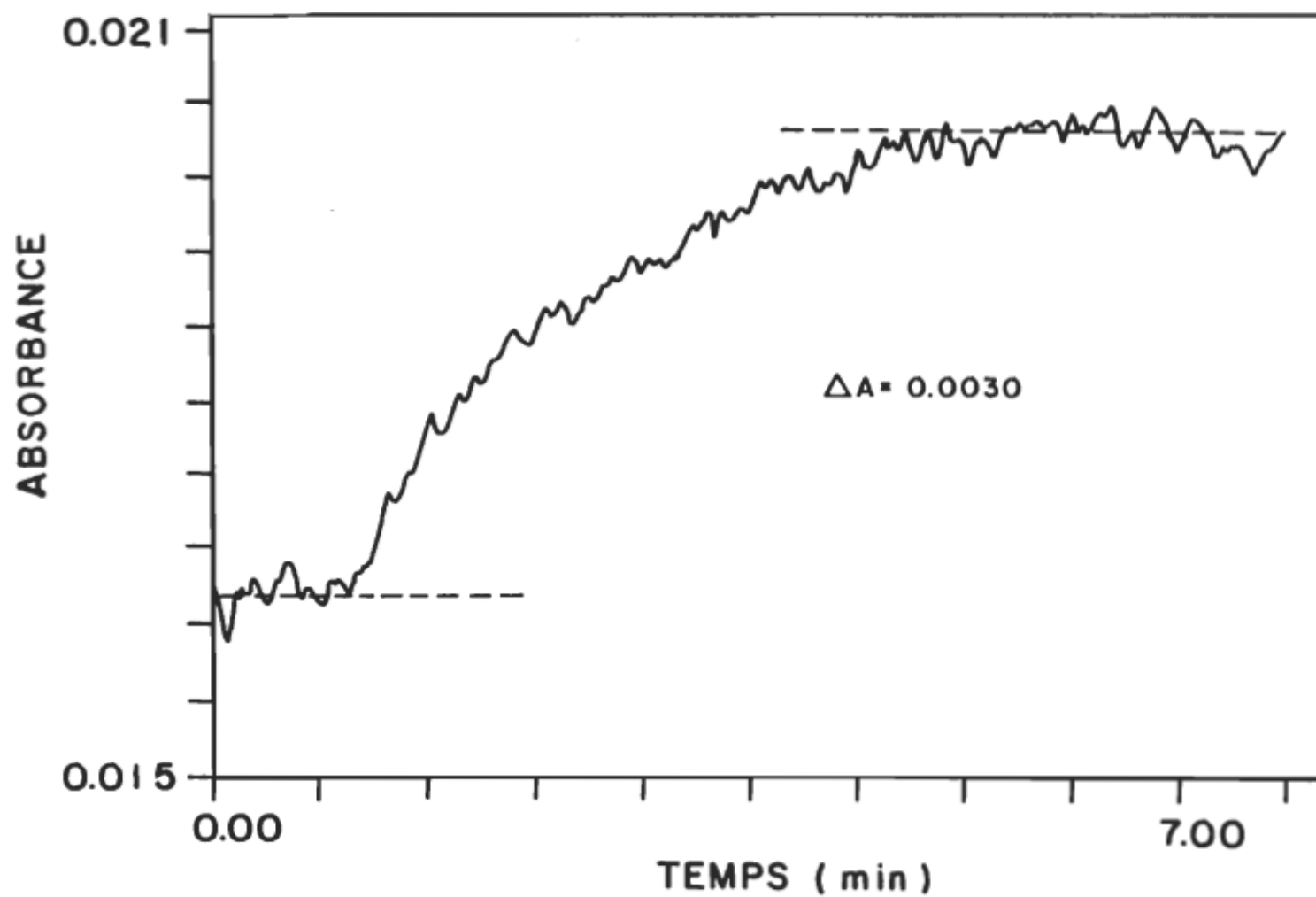


Figure 39. Induction de la photoréduction du cytochrome b-559 à 561 nM. Voir aussi la section 2.5.2 iv.

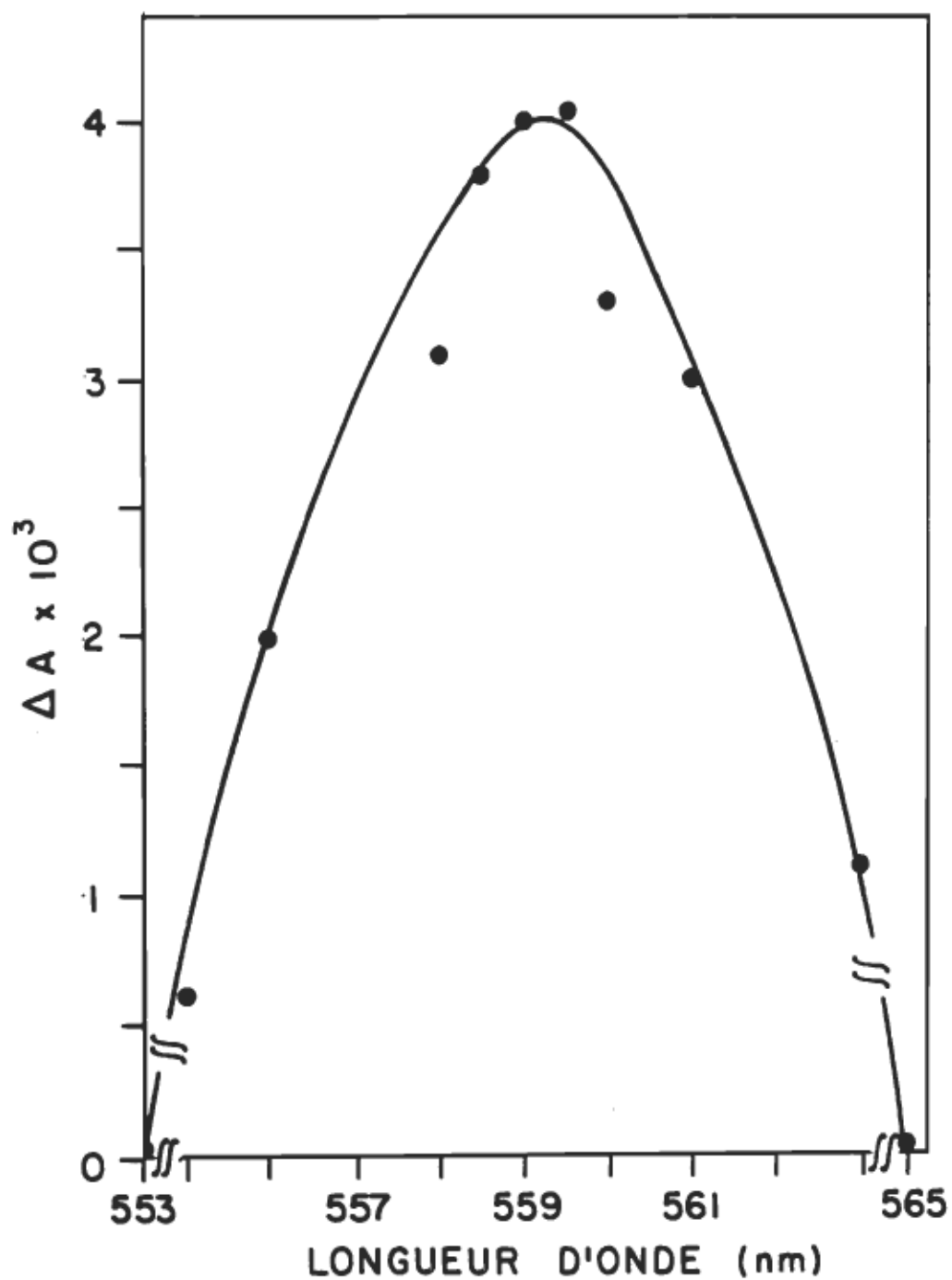


Figure 40. Spectre de différence d'absorption du cytochrome b-559 chez l'épinard. Voir aussi la section 2.5.2 iv, et la Fig. 39.

le but d'évaluer les conditions expérimentales optimales. Toujours en mesurant la cinétique pendant sept minutes, la figure 41 nous montre la photoréduction du cytochrome b-559 avec une intensité lumineuse de 430 mW/cm^2 . En faisant varier l'intensité lumineuse on peut ainsi tracer la courbe de la vitesse initiale en fonction de l'intensité (Fig. 42). Ce graphique démontre que même à très forte intensité (430 mW/cm^2), la réaction de photoréduction n'est pas saturée. Ce qui permet également de choisir une intensité lumineuse appropriée au genre de mesure et de résultats escomptés.

Le rôle du cytochrome b-559 reste nébuleux tant au niveau fonctionnel que structural. Son implication lors du transport d'électrons du PSII n'est pas bien définie; ce qui justifie l'utilisation d'inhibiteur du transfert d'électrons entre Q_A et Q_B . La figure 43 nous montre l'inhibition de la photoréduction du cytochrome b-559 en présence d'atrazine. On peut par cette méthode inhiber plus de 60% de la réduction avec une intensité lumineuse optimale (430 mW/cm^2). Par contre même à très forte concentration d'atrazine, on ne peut inhiber toute la réduction. Avec un extrait de PSII d'épinard différent, le DCMU a réussi à inhiber la photoréduction du cytochrome dans une proportion similaire à l'atrazine, même si l'activité initiale était supérieure, voir figure 44 (voir aussi pour des résultats similaires en présence de DCMU: Lach, 1977; Whitmarsh, 1978; Heber, 1979; Barabas, 1989).

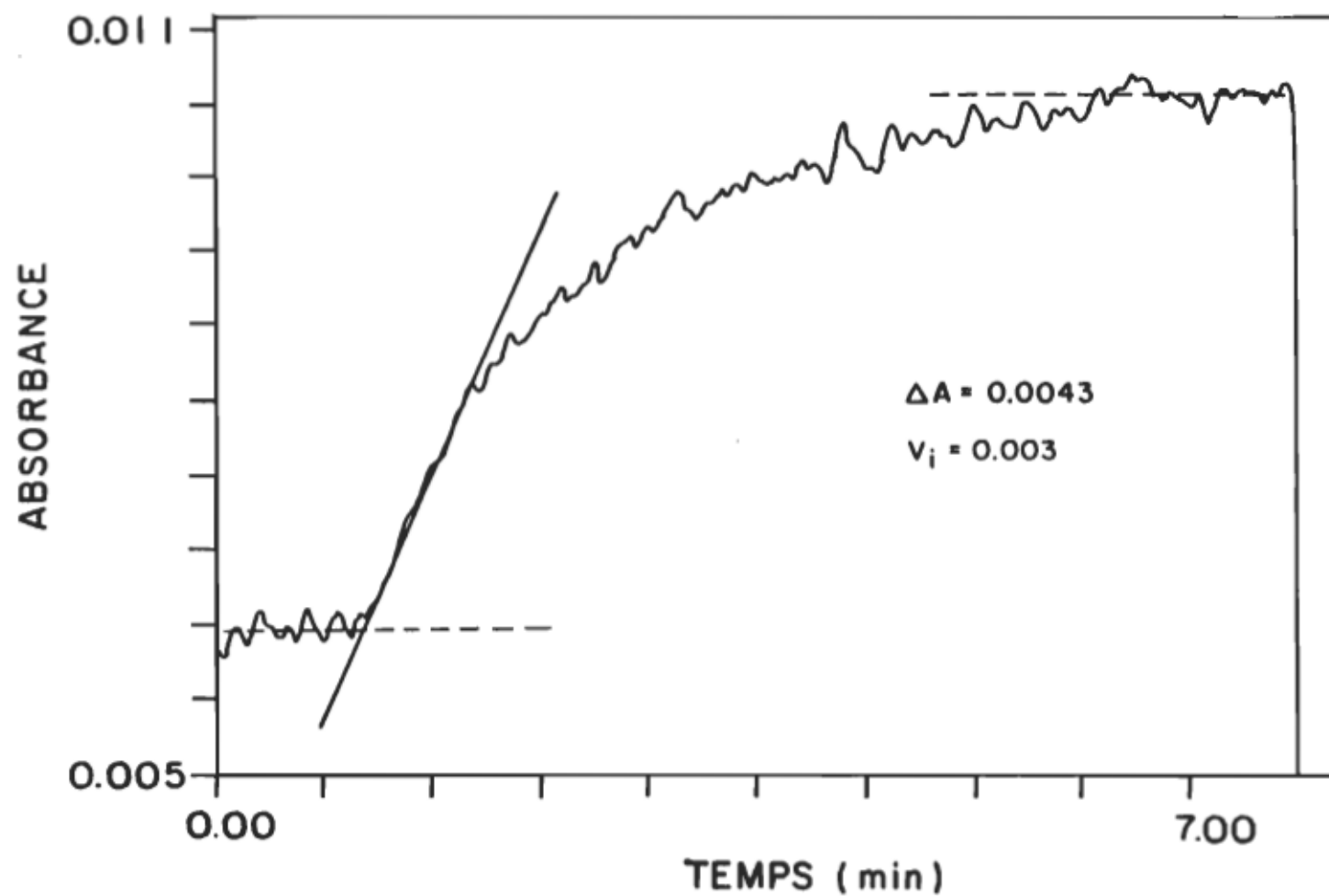


Figure 41. Induction de la photoréduction du cytochrome b-559 à 430 mW/cm². Voir aussi la section 2.5.2 iv.

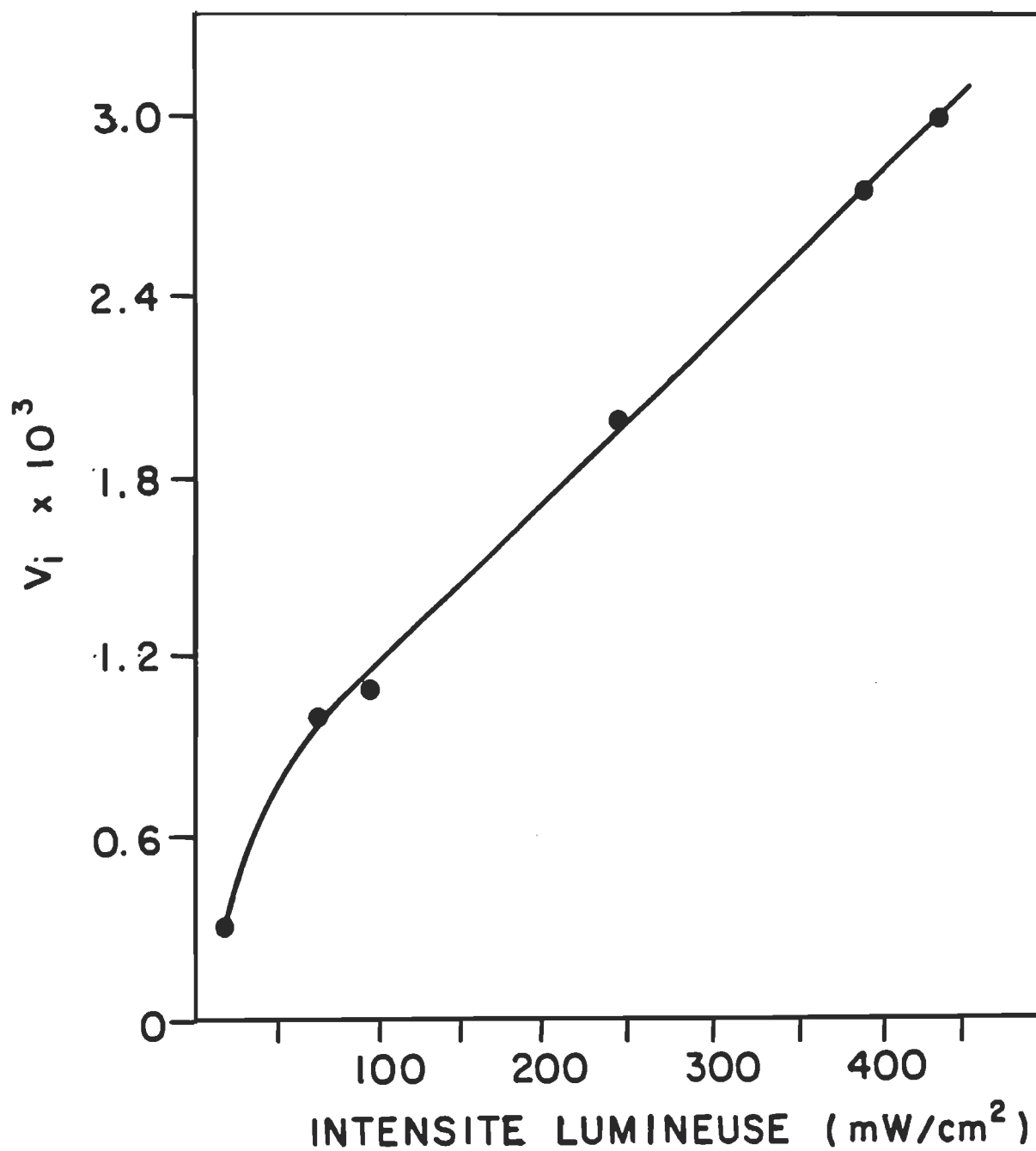


Figure 42. Courbe de saturation de la photoréduction du cytochrome b-559 en fonction de l'intensité lumineuse. Voir aussi la section 2.5.2 iv, et la Fig. 41.

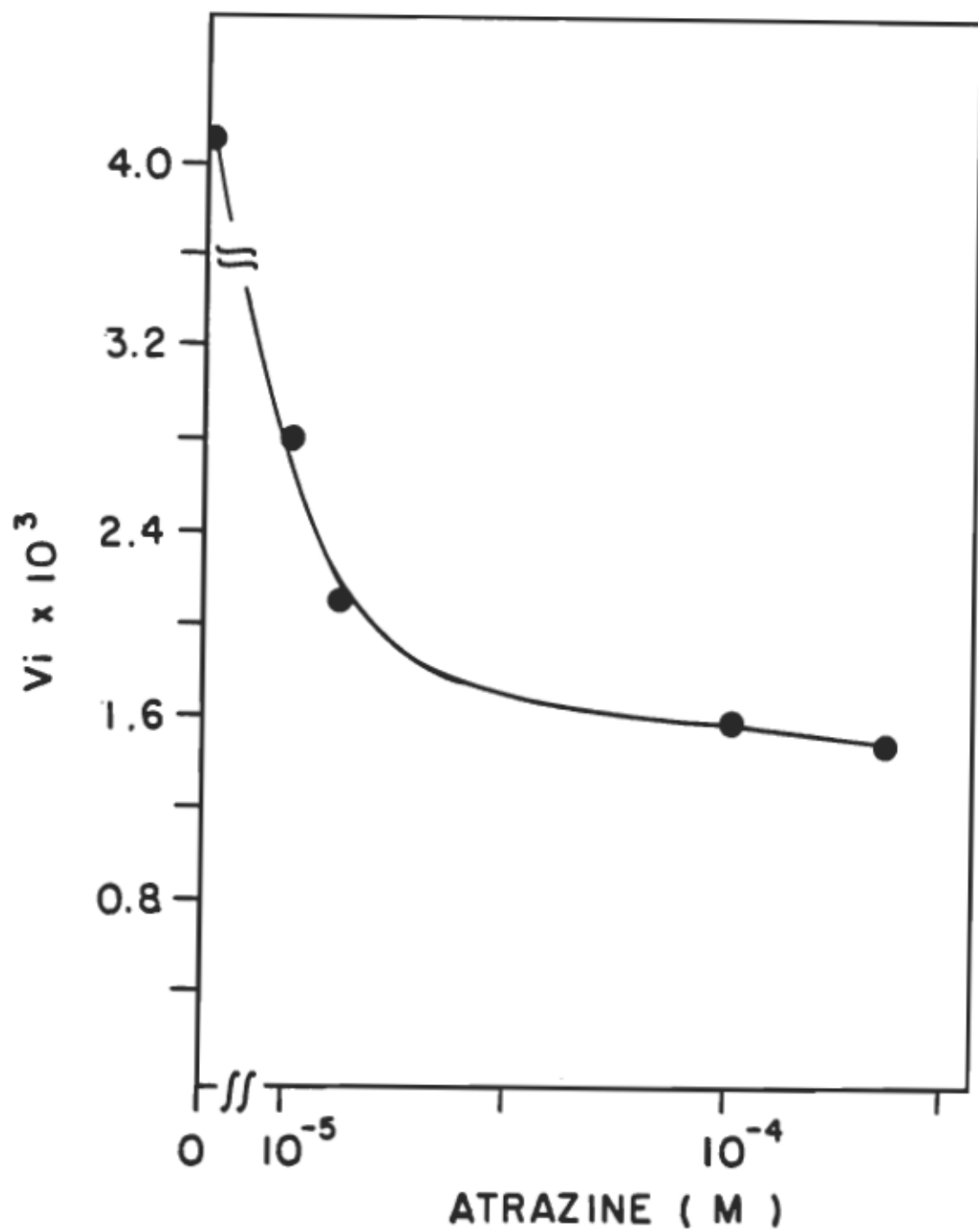


Figure 43. Inhibition de la vitesse initiale (V_i) de la photoréduction du cytochrome b-559 par l'atrazine chez les PSII d'épinard. Voir aussi la section 2.5.2 iv.

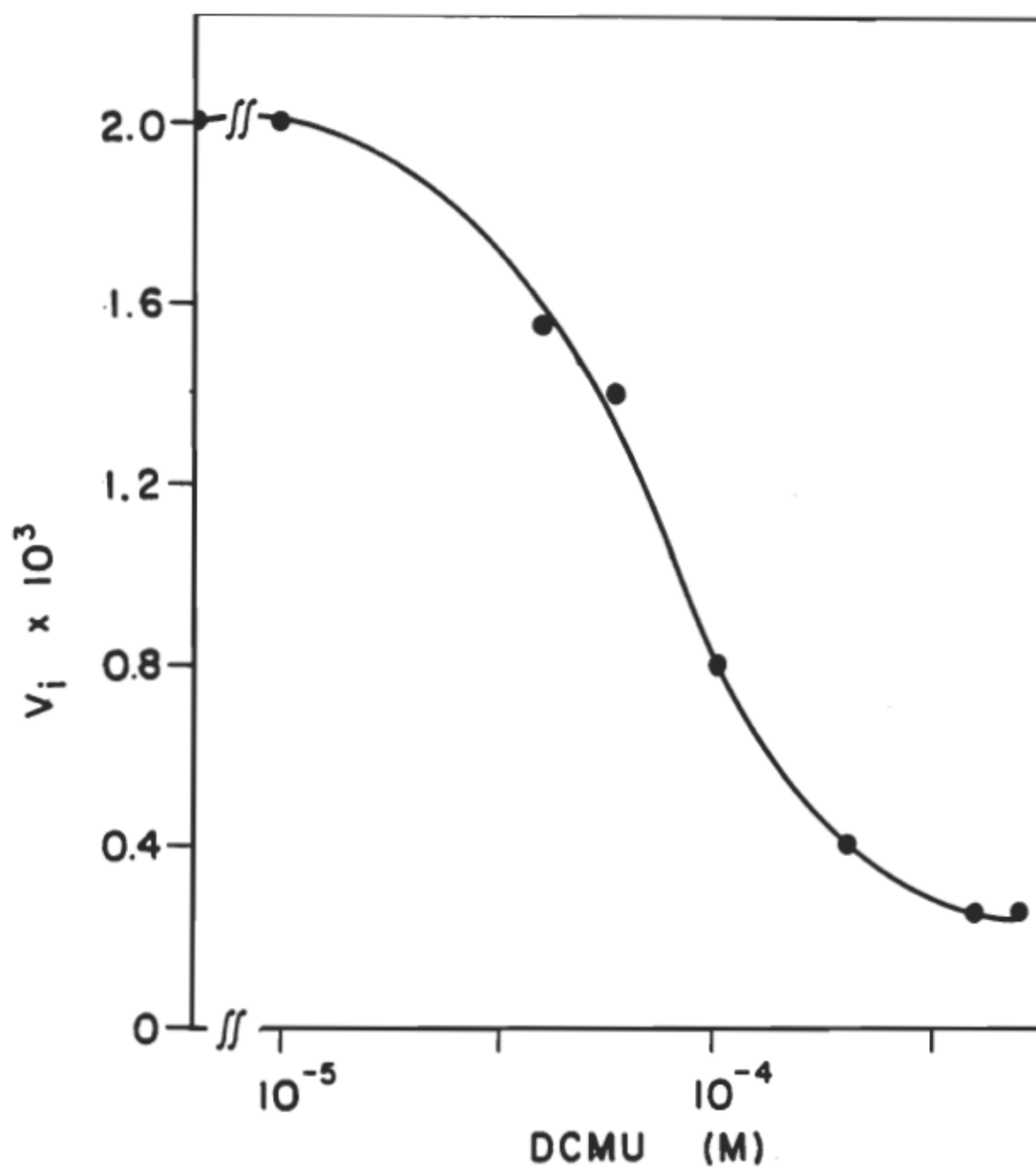


Figure 44. Inhibition de la vitesse initiale (V_i) de la photoréduction du cytochrome b-559 par le DCMU chez les PSII d'épinard. Voir aussi la section 2.5.2 iv.

Même si ce dernier herbicide est un inhibiteur plus puissant que l'atrazine, la présence d'un plateau est inévitable. Ce dernier résultat concorde bien avec le fait que le cytochrome b-559 serait impliqué dans un mécanisme de sécurité, gardant le P680 dans sa forme réduite (Bendall, 1982). On peut donc en conclure que le cytochrome joue un rôle lors de la translocation d'électrons dans la partie cyclique du PSII.

A titre comparatif, on peut évaluer l'inhibition de la photoréduction du cytochrome b-559 d'un même extrait (dont l'activité photosynthétique initiale est identique) qui se situe, même à très fortes concentrations d'inhibiteurs, à environ 50%; (voir Yamagishi, 1987 pour l'analogie avec des cyanobactéries) comparativement à 100% dans le cas de la photoréduction du DCPIP (Fig. 45). Cette figure montre très clairement que les deux réactions (inhibition au site Q_B et inhibition du cytochrome b-559) sont distinctes.

Par ailleurs, la figure 46 nous assure que les cinétiques de photoréduction du cytochrome exprimées en changement d'absorbance en fonction du temps sont représentées par une réaction d'ordre 1 (voir annexe B).

3.3.3 Photooxydation du cytochrome b-559

Une photooxydation partielle du cytochrome b-559_{HP} préréduit s'observe après illumination des membranes de PSII. Comme chez les thylacoïdes, l'addition de FCCP accélère ce processus (Cramer, 1972; Cramer, 1977; Heber, 1979; Galvan,

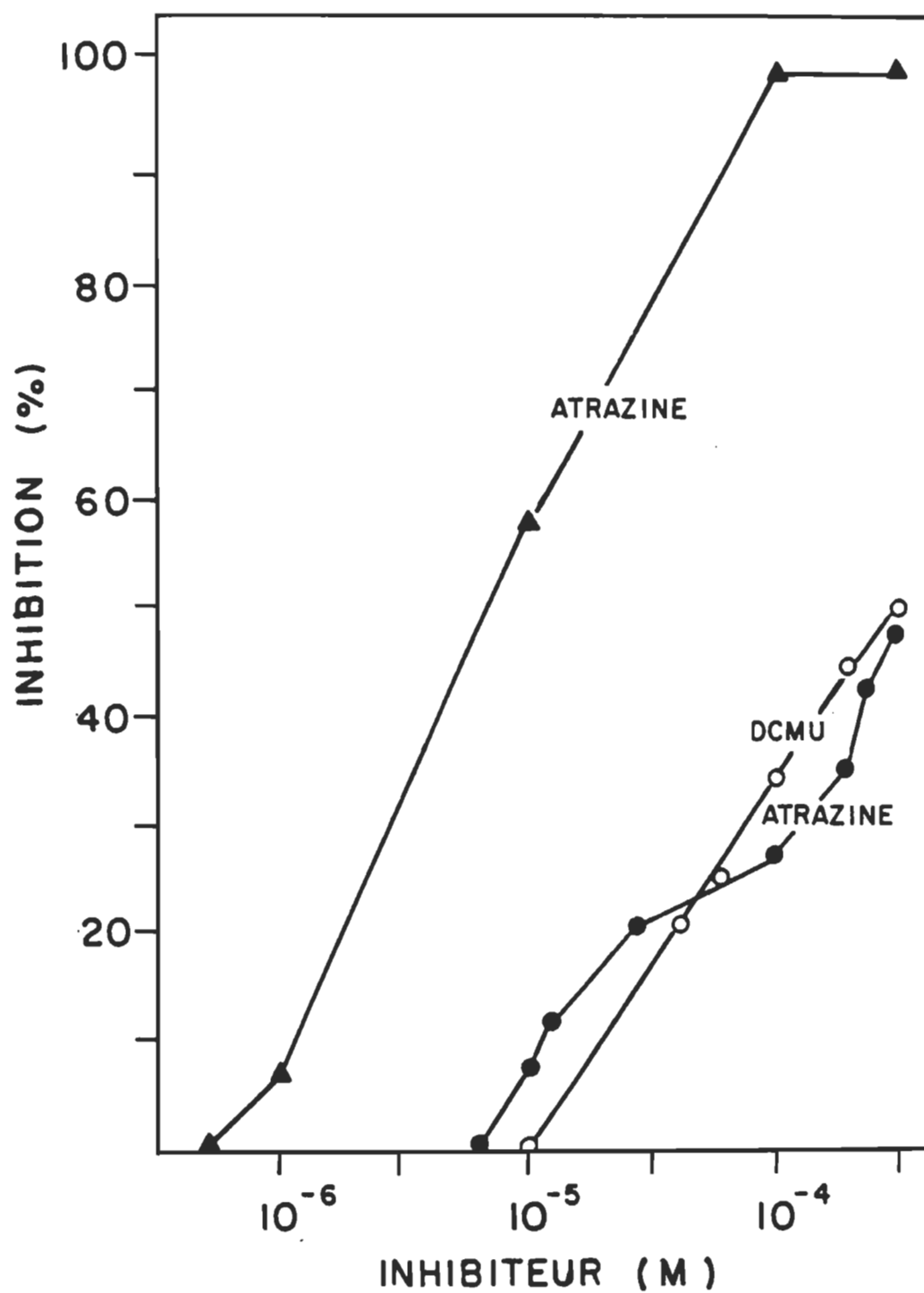


Figure 45. Inhibition comparative de la photoréduction du DCPIP (Δ) et du cytochrome b-559 (cercles) par l'atrazine et le DCMU chez les PSII d'épinard.

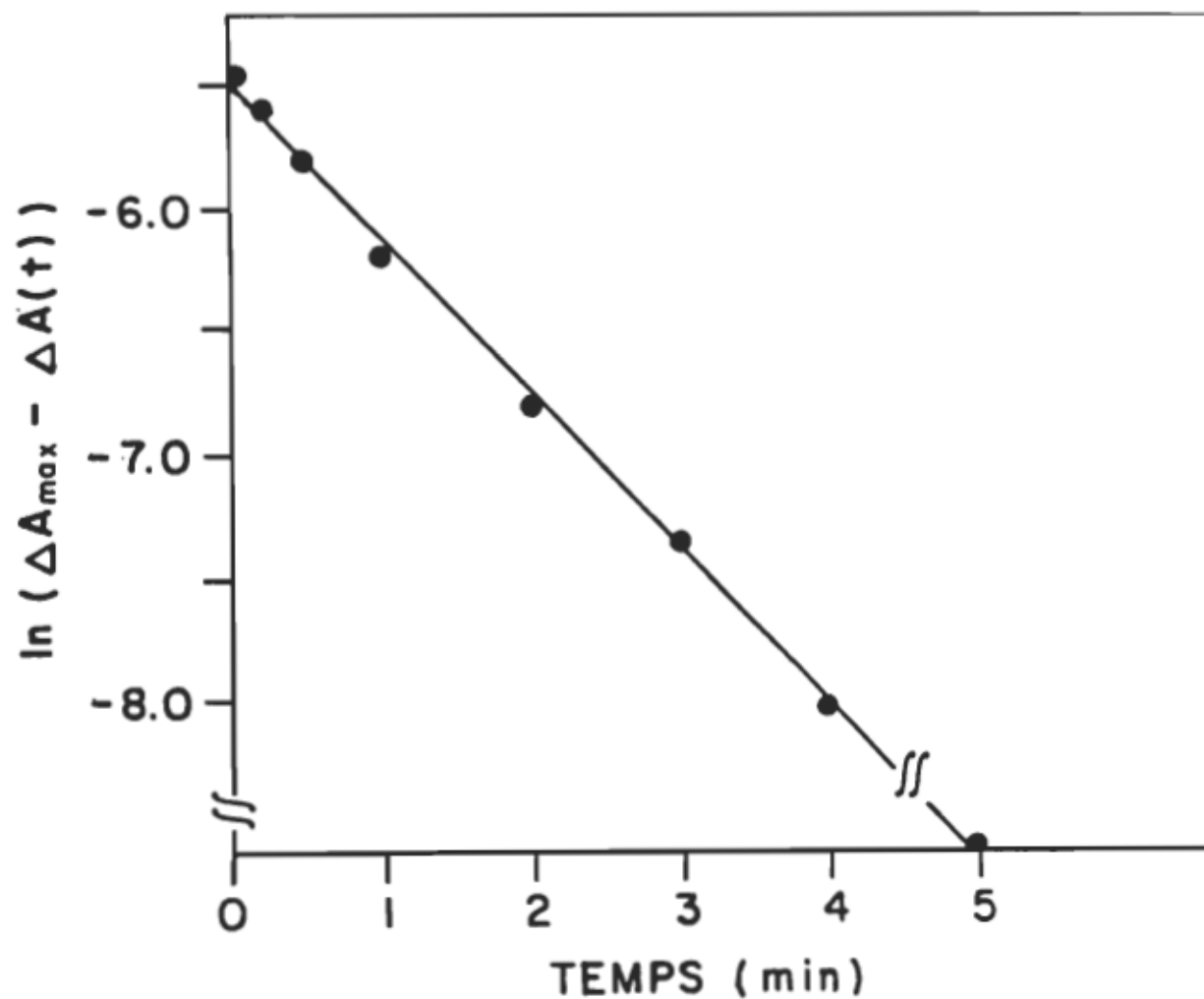


Figure 46. Représentation semi-logarithmique de la photoréduction du cytochrome b-559 en fonction du temps. (Exemple représentatif pour les figures 39 à 45 --> corrélation: 0.9992).

1983), mais inhibe partiellement le dégagement d'oxygène. Donc, après une réduction du cytochrome à forte intensité lumineuse (voir la section précédente), il est possible de le photooxyder et ce, à faible intensité lumineuse seulement.

Cette dernière partie sur l'étude du cytochrome b-559 n'est qu'une prémisse pour déboucher ultérieurement sur une analyse plus en profondeur. Je me contenterai de résumer les quelques résultats sur la photooxydation sous forme de tableau. Dans un premier temps, il faut trouver l'intensité lumineuse optimale autant pour la réduction que pour l'oxydation. Le tableau 4 A nous montre la vitesse initiale relative (en valeur absolue), afin de déterminer l'intensité lumineuse la plus efficace pour photoréduire la plus grande quantité de cytochrome et subséquemment pour sa photooxydation (en présence de FCCP). A très forte intensité lumineuse (430 mW/cm^2), on obtient une forte photoréduction (192 unités), après l'atteinte du plateau de saturation on réduit l'intensité à 70 mW/cm^2 , pour ainsi obtenir une photooxydation de seulement 3 unités. Par contre à 245 mW/cm^2 on obtient une intensité de photoréduction appréciable; ce qui permet de réduire l'intensité, comme précédemment (après l'obtention du plateau), et obtenir une photooxydation optimisée de 10 unités. Dans le cas d'une intensité lumineuse initiale plus faible, il était impossible d'obtenir une photoréduction appréciable (tableau 4 A).

TABLEAU 4

Réactions d'oxydoréduction du cytochrome b-559 en présence
d'atrazine

A

I_{RED} (initiale)	intensité lum. (mW/cm ²)	I_{OXY}
192	430	3
100	245	10
34	100	0

B

I_{RED} (initiale)	atrazine (mM)	I_{OXY}
100	0	10
96	3.3	8
70	10.0	5
63	33.0	3
33	66.0	0

Les résultats de la partie B du tableau sont donc répétés dans ces mêmes conditions optimales. Les résultats de cette partie sur l'inhibition de la photooxydation ne concluent pas de façon définitive qu'une telle inhibition est possible. De façon générale on réussit à diminuer l'oxydation engendrée par une faible luminosité, mais on ne peut s'assurer que cette inhibition est causée simplement par l'intensité de réduction plus faible; étant donné que l'atrazine est ajouté au début de la réaction. Nous serions tout de même portés à croire que l'inhibition est bien causée par l'atrazine, car la diminution de l'intensité relative de la photoréduction n'est pas proportionnelle à la diminution de l'intensité relative de photooxydation (voir Heber, 1979 pour des résultats similaire en présence de DCMU).

Par ces données préliminaires, nous pouvons extrapoler la fonction du cytochrome b-559 comme jouant un rôle de premier plan, voire même d'intermédiaire direct, lors du transfert de charges en présence d'inhibiteurs (empêchant ainsi les électrons de passer du premier accepteur d'électrons du PSII (Q_A) au deuxième (Q_B)). Ces affirmations confirmeraient l'hypothèse de Cramer et Radmer (Cramer, 1972; Radmer, 1975), suggérant le cytochrome b-559 comme étant directement impliqué lors du transport d'électrons cyclique autour du PSII. Ce mécanisme pourrait contribuer à garder le P680 dans sa forme réduite advenant une perte d'activité du

complexe de scindement de l'eau; est observé en présence de DCMU et d'atrazine. Dans le cas où le centre réactionnel serait ultérieurement réduit, le cytochrome b-559_{gp} accepte les électrons pour ensuite les fournir au PSII (Losada, 1983; Hervas, 1985).

3.4 Les membranes thylacoïdiennes (natives et immobilisées) utilisées comme biosenseur d'herbicides et de métaux lourds

La détection de pesticides peut se faire par plusieurs méthodes; une des premières fut la chromatographie gazeuse et en phase solide (Bailey, 1978; Roseboom, 1980; Brooks, 1989; Grob, 1989), qui a été par la suite grandement améliorée par la venue de l'immunochimie (Newsome, 1986; Bushay, 1989; Schlaeppli, 1989). Le dernier cri dans la détermination d'herbicides est sans le moindre doute la chromatographie gazeuse en dilution/spectroscopie de masse, pouvant détecter et séparer simultanément plusieurs molécules (Huang, 1989). Par contre la méthode ici présentée est intéressante de par sa sensibilité mais surtout pour son interaction directe avec le matériel végétal.

3.4.1 Détection de molécules inhibitrices de la photosynthèse

Les membranes thylacoïdiennes des chloroplastes transforment l'énergie photonique en énergie chimique, via les réactions d'oxydoréduction. A ce niveau, la lumière est absorbée par les pigments photosynthétiques lesquels sont complexés dans une matrice protéique, et l'énergie est ainsi cédée aux centres réactionnels du PSII et PSI. Ces processus mènent à la formation de charges négatives. Les thylacoïdes peuvent donc

être utilisés dans une cellule photoélectrochimique, où les espèces préalablement réduites sont oxydées par une électrode de travail (voir schéma de la cellule qui est utilisée pour nos études, fig. 5).

Le photocourant ainsi produit, proportionnel à l'activité photosynthétique des membranes, s'avère d'un intérêt singulier dans l'étude des inhibiteurs du transport d'électrons et des dommages membranaires qui s'en suivent. Les unités de mesure sont sous forme de courant (μA), calculées par l'amplitude maximale que produit le tracé (Fig. 47). L'allure de la courbe peut varier dépendamment de la qualité des membranes (activité), du traitement choisi (membranes immobilisées ou non) ou de l'action d'inhibiteurs du transport d'électrons. L'addition d'atrazine dans le milieu provoque une baisse de photocourant proportionnelle à la concentration ajoutée (Fig. 48). La sensibilité de la cellule à cette concentration de chlorophylle ($250 \mu\text{g/ml}$) est de l'ordre du μM . On ne peut, même à très grande concentration d'atrazine, inhiber complètement le photocourant. Ce résultat s'explique par une réaction de la lumière avec l'électrode de platine indépendante de la membrane.

Une information supplémentaire nous est fournie par le graphique de la simple réciproque; $9 \mu\text{M}$ d'atrazine sont nécessaires pour inhiber 50% (I_{50}) de l'activité

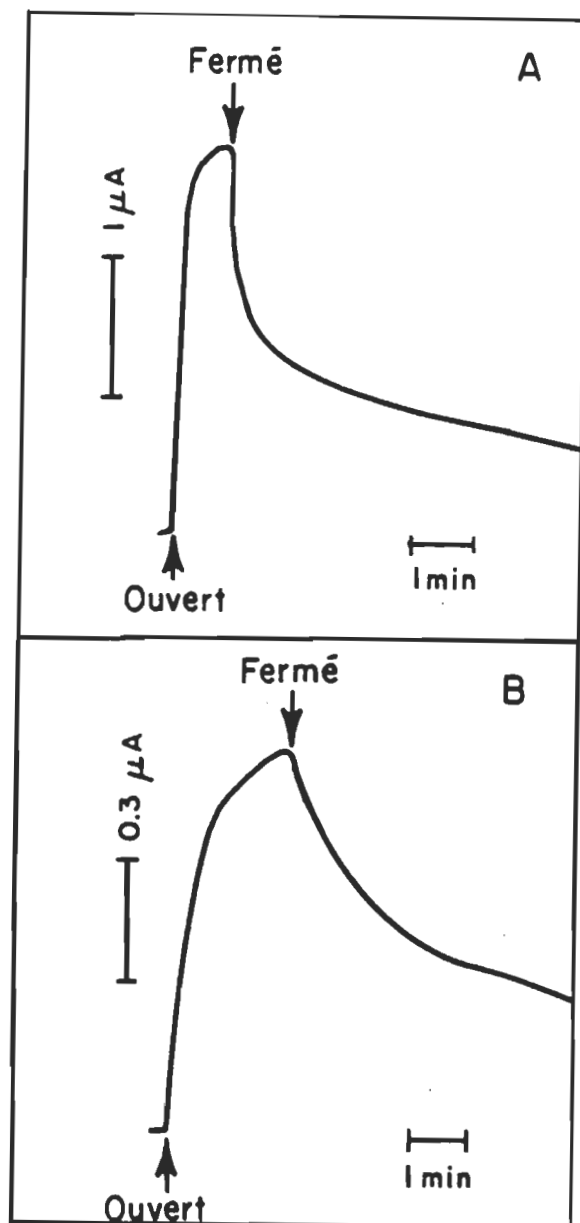


Figure 47. Induction du photocourant des thylacoïdes natifs (A) et immobilisés (B) chez les épinards à 250 μg Chl/ml. Les flèches vers le haut et vers le bas indiquent l'ouverture et la fermeture du faisceau actinique respectivement.

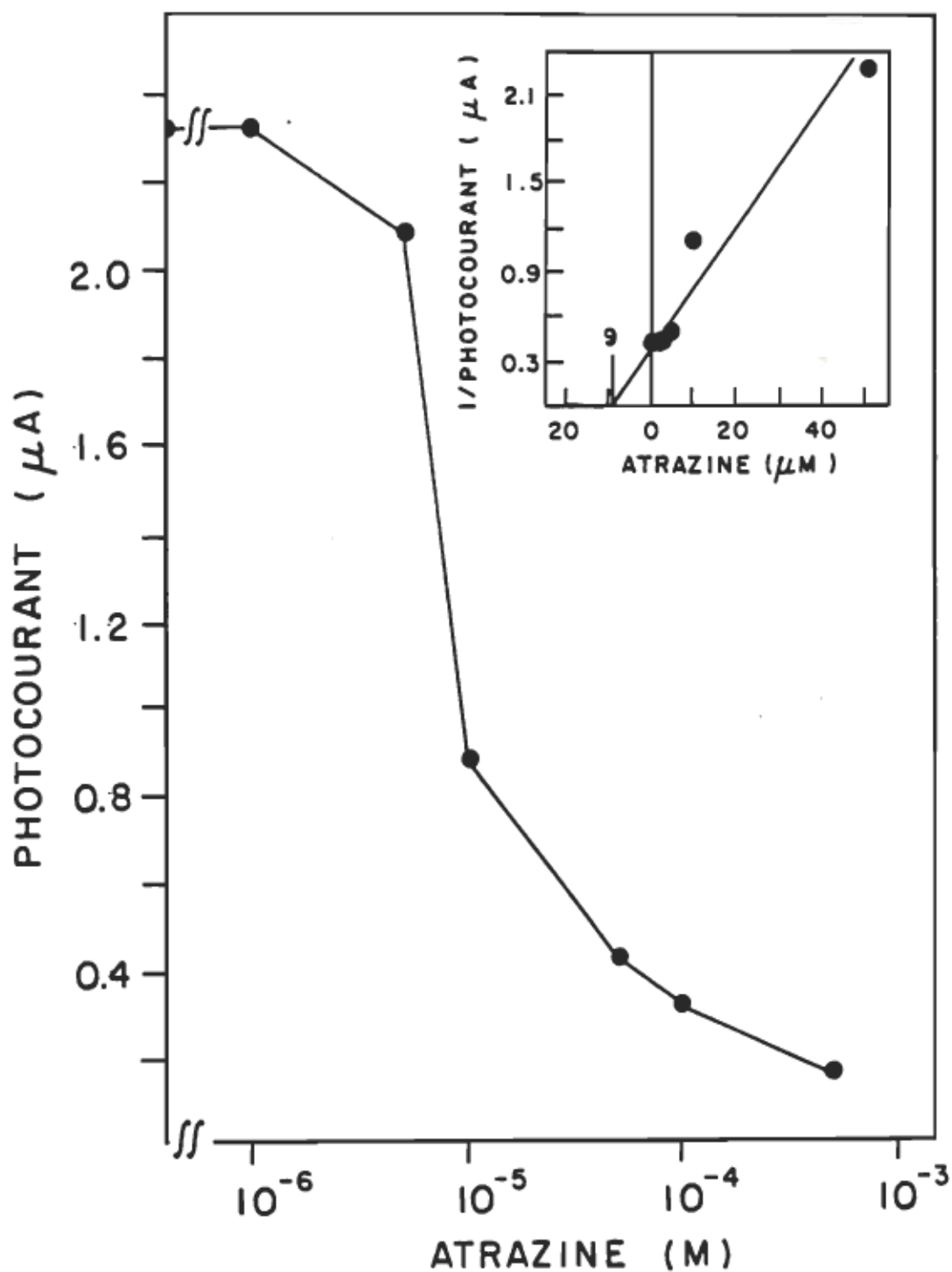


Figure 48. Inhibition du photocourant par l'atrazine. Intégrée; simple réciproque en fonction de l'atrazine. 250 μg Chl/ml.

photosynthétique. Cette valeur se révèle importante dans le but de faire une approximation d'une concentration critique de survie des matériels végétaux sur le terrain. 50% de perte d'activité pourrait être un barème évaluant l'irréversibilité de la survie de la plante. Par cette méthode il est donc possible de détecter les molécules inhibitrices des thylacoïdes.

Les oxydes de soufre comptent parmi les polluants industriels les plus répandus qui inhibent la photosynthèse (Hill, 1933; Black, 1982). Son site d'action est moins spécifique que l'atrazine quoique agissant sur le PSII (Oren, 1979; Shimazaki, 1984). Avec une faible variation de la concentration de Na_2SO_3 , il est possible d'inhiber le photocourant (Fig. 49). Le graphique de l'inverse du photocourant en fonction de la concentration en inhibiteur, nous démontre qu'on peut bloquer le transport d'électrons avec des concentrations de l'ordre du mM (1.7 mM). Nous avons donc vérifié la sensibilité de la cellule avec une série diverse d'inhibiteurs.

Les nitrites sont bien connus pour inhiber la photosynthèse et ce d'une façon non spécifique. Leur site d'action a tout de même été cerné sur le PSII et entre le PSII et le PSI (Spiller, 1977; Sinclair, 1987). On peut inhiber, de façon sensible, le photocourant avec une concentration d'environ 10^{-4} M (Fig. 50). Sur cette même

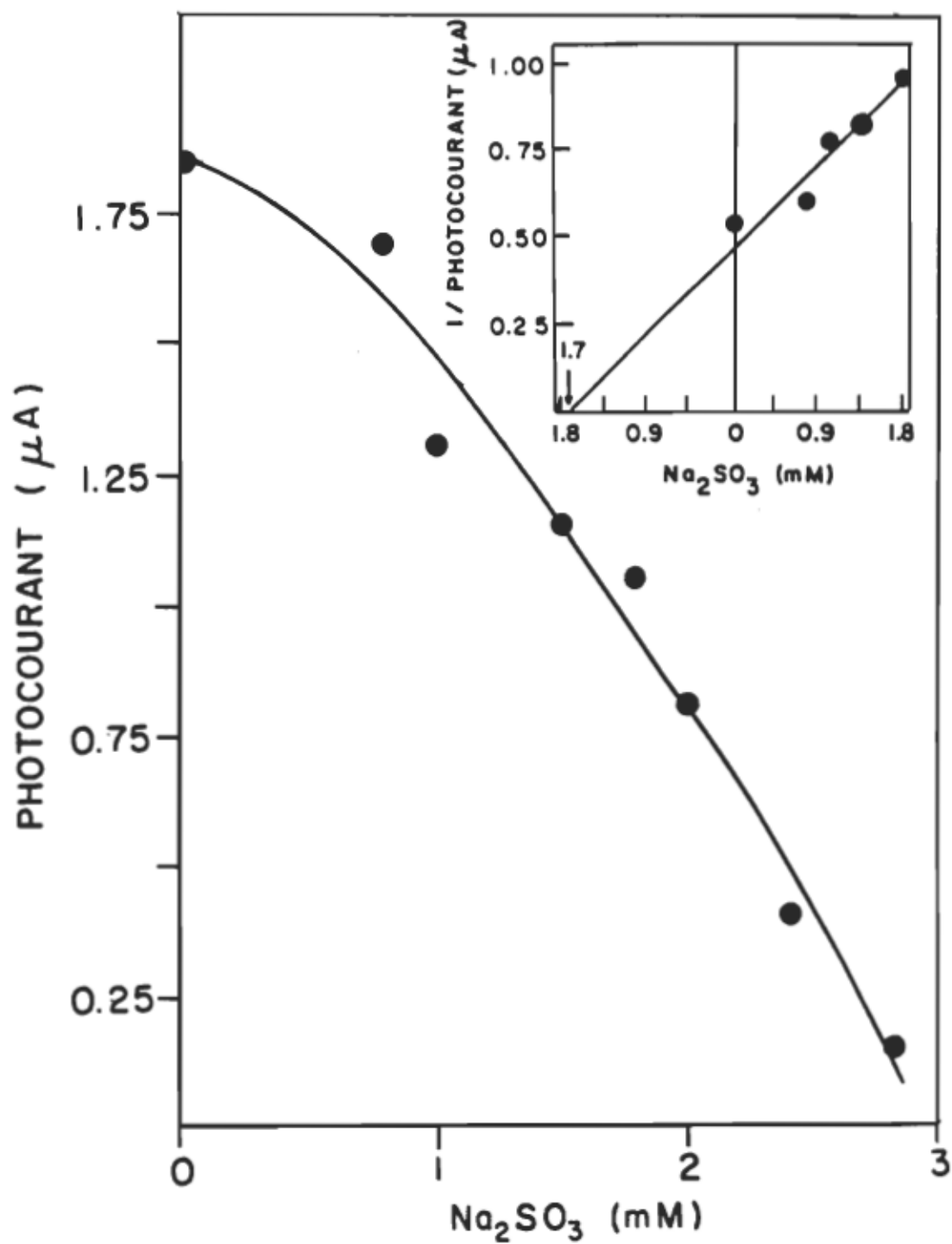


Figure 49. Inhibition du photocourant par le Na_2SO_3 . Intégrée; simple réciproque en fonction du Na_2SO_3 . 250 μg Chl/ml.

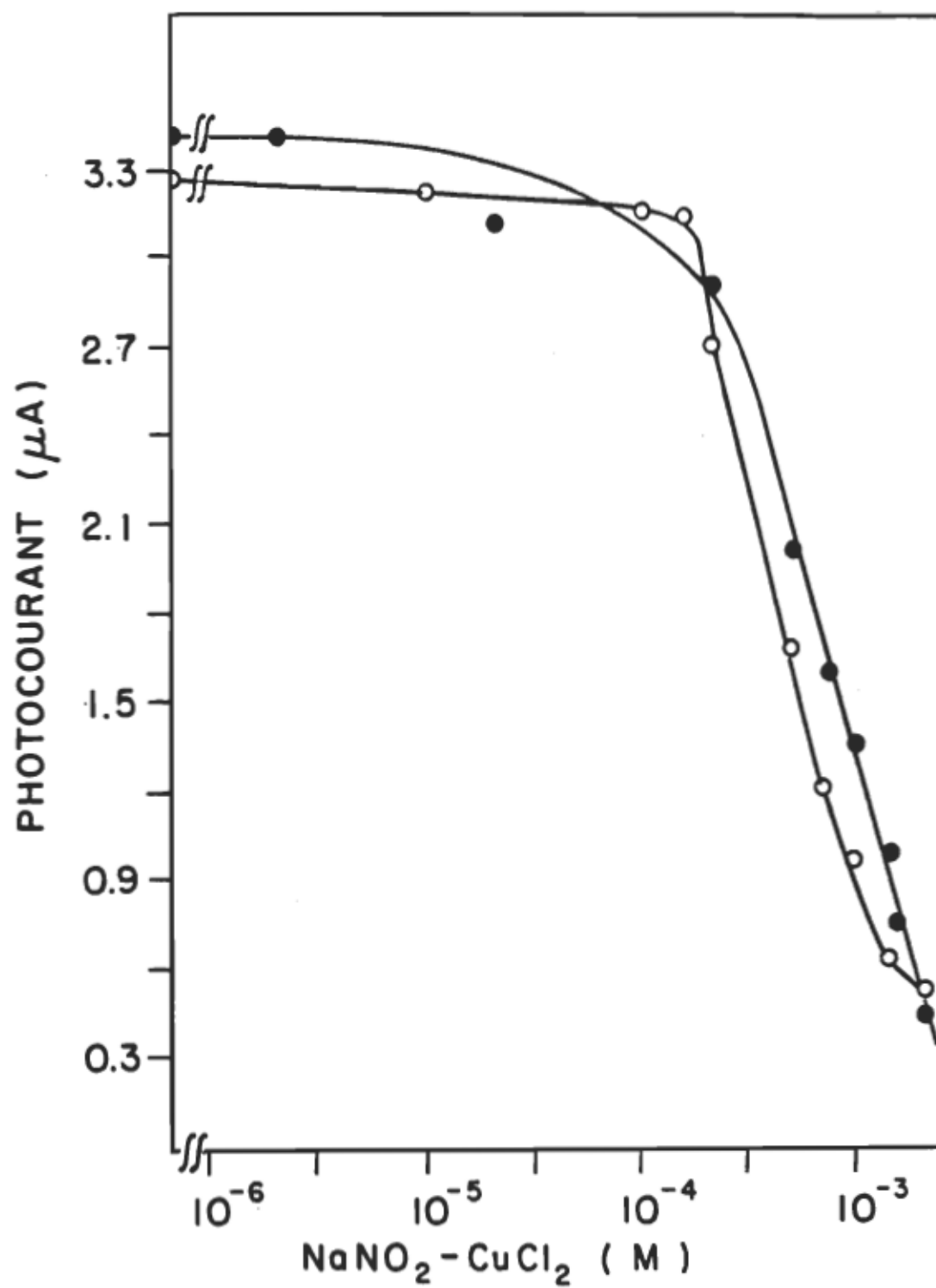


Figure 50. Inhibition du photocourant par le $NaNO_2$ (o) et le $CuCl_2$ (●). 250 μg Chl/ml.

figure, l'inhibition du cuivre (CuCl_2) est aussi représentée. Le cuivre, bien connu pour être un micronutriment essentiel pour les algues et les plantes supérieures (Sommer, 1945; Walker, 1953), et qui par contre peut être très toxique à forte concentration (Cedeno-Maldonado, 1972; Shioi, 1978; Samuelsson, 1980; Baszynski, 1988; Hsu, 1988). On peut mesurer une baisse de photocourant significative avec seulement 10^{-5} M de CuCl_2 .

Toujours chez les chlorures, la figure 51 nous montre l'inhibition du photocourant par le zinc et le cadmium. Le Cd^{2+} est bien connu pour inhiber la chaîne de transport d'électrons du côté donneur du PSII, indiquant que le site de scindement de l'eau est très sensible à cet ion (Bazzaz, 1974; Van Duijvendijk-Matteoli, 1975; Hampp, 1976). Ainsi Li (1975), suggère que le site ultime du Cd^{2+} est localisé sur le premier donneur d'électrons du PSII; le PSI serait aussi affecté sur son côté réducteur au niveau de la ferrédoxine (De Filippis, 1981). La sensibilité à cet inhibiteur est de l'ordre de 10^{-5} M mais nécessite près de 10^{-2} M pour abaisser le photocourant de 50%. En présence d'une concentration modérément élevée (10^{-3} M), le zinc limite le transport d'électrons du côté oxydant du PSII (Tripathy, 1980). Avec un certain degré de liberté, nous pouvons déceler une quantité de l'ordre du μM .

Comme le cadmium, le plomb s'accumule dans la feuille mais en moins grande quantité, pourtant aucunement

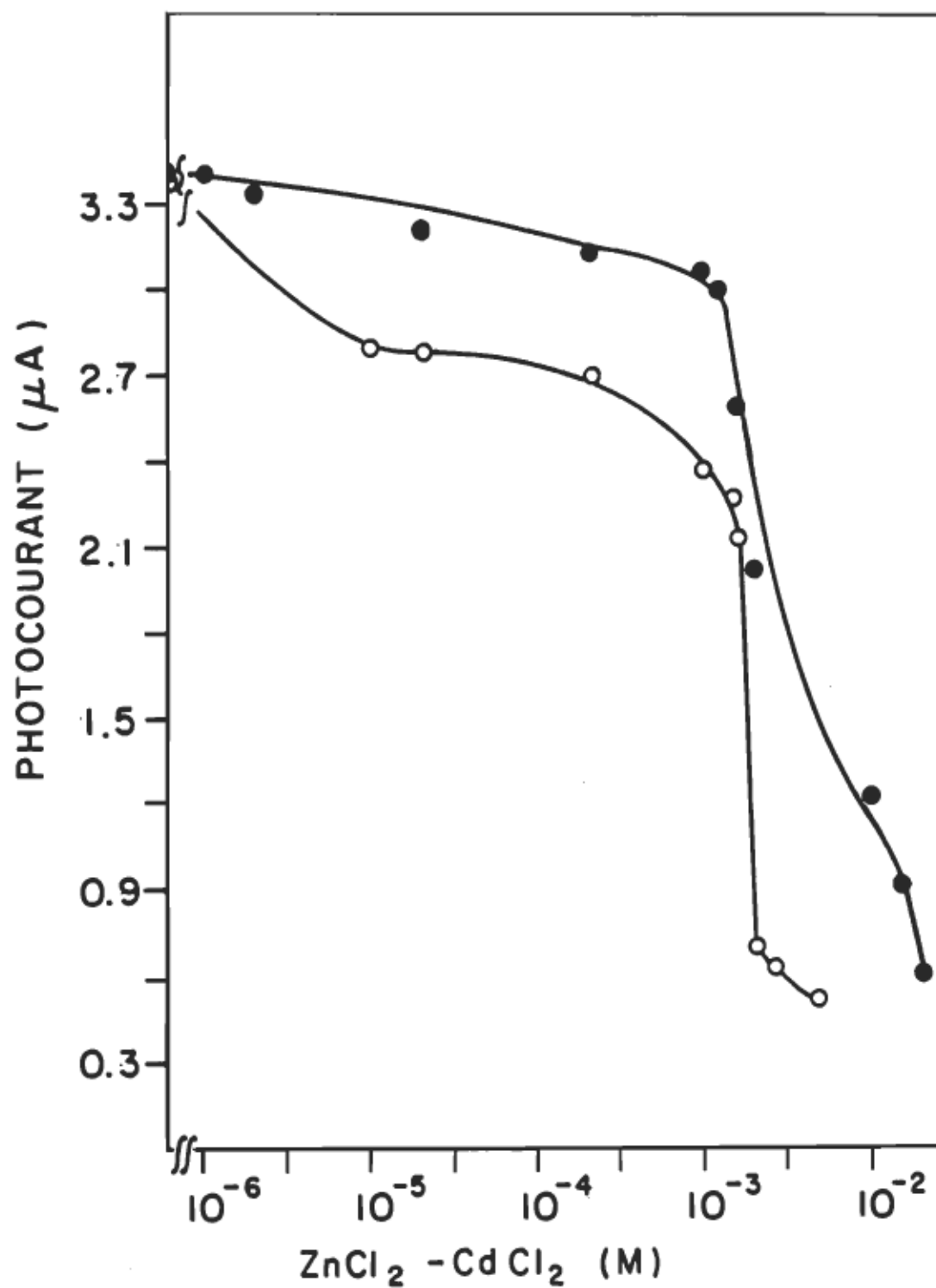


Figure 51. Inhibition du photocourant par le $ZnCl_2$ (o) et le $CdCl_2$ (●) .250 μg Chl/ml.

essentielle à la croissance de la plante. La littérature n'est pas claire sur le site exact d'action du Pb^{2+} ; par contre tous s'accordent pour dire que l'effet est principalement du côté du PSII, et quelques uns y font participer le PSI également (Becerril, 1988). De la même manière que les autres inhibiteurs, on peut détecter cet ion en présence de seulement 1 mM (Fig. 52). On observe également une chute de photocourant à une certaine concentration (10^{-4} M et plus) et cela chez la majorité des inhibiteurs étudiés. Sur la même figure, on détecte l'inhibition du courant en présence du chlorure de mercure. Hg^{2+} est connu depuis longtemps comme inhibiteur du transport d'électrons (Katoh, 1963); il agirait principalement au niveau de la plastocyanine (Kimimura, 1972). On en vient donc à la conclusion qu'une molécule qui inhibe la photosynthèse, pourra être détectée par la cellule photoélectrochimique. La question est maintenant de savoir, quel est le seuil de sensibilité. Définitivement il est très difficile de répondre à cette question, sachant que sur le terrain, la plante peut accumuler toutes ces substances et ainsi fausser la concentration critique. De plus, pour chacune des mesures précédentes, une concentration de 250 μg Chl/ml fut imposée; ce qui optimisait l'intensité du photocourant. Evidemment chez la plante in situ, les inhibiteurs ne rencontrent pas une aussi forte concentration en chlorophylle ce qui modifie

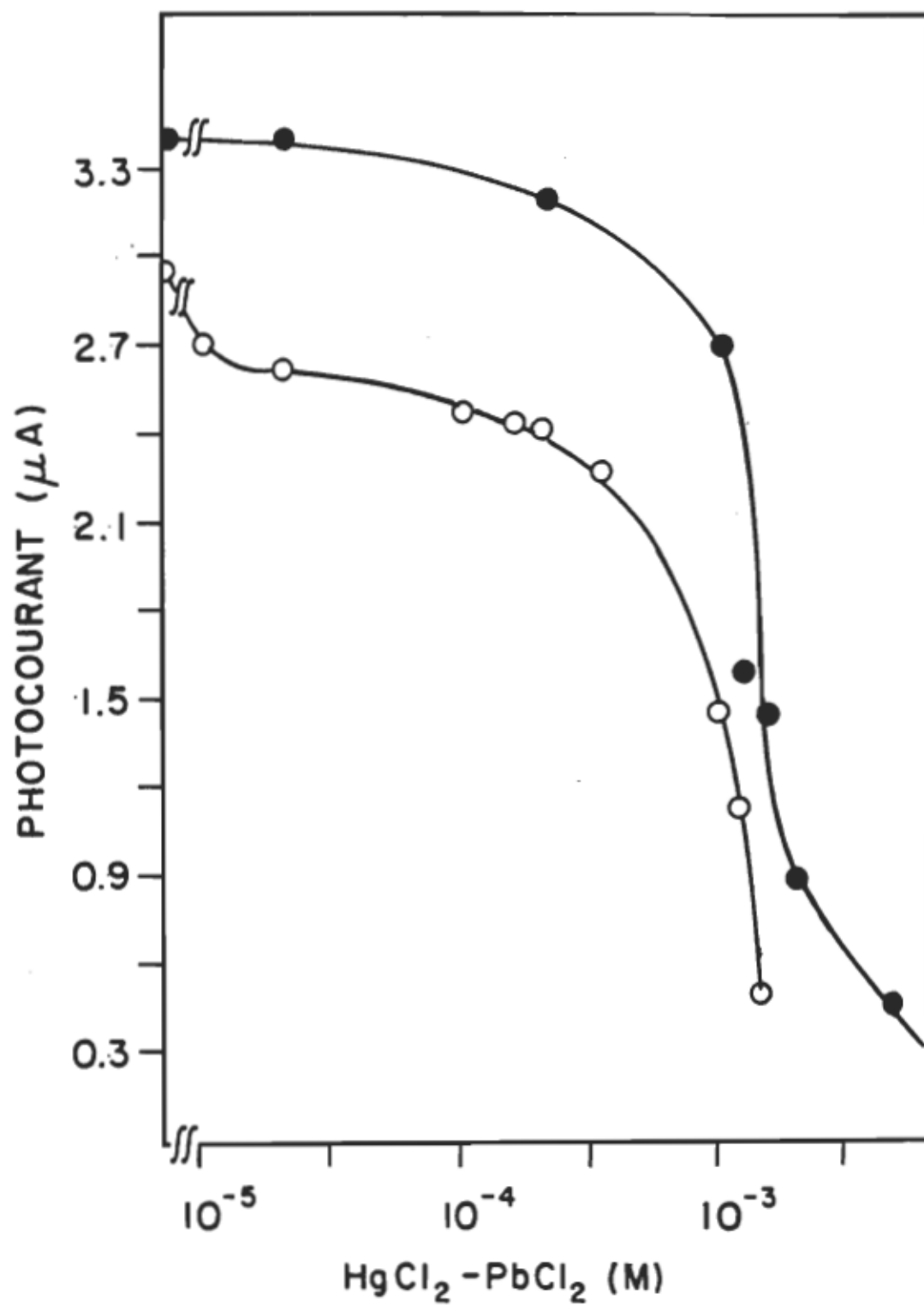


Figure 52. Inhibition du photocourant par le $HgCl_2$ (o) et le $PbCl_2$ (●). 250 μg Chl/ml.

la sensibilité de cette méthode à la baisse (pour une synthèse des résultats présentés voir Purcell, 1990b).

3.4.2 Sensibilité/diminution de la concentration en

chlorophylle

La diminution de la chlorophylle s'avère un moyen efficace pour augmenter la sensibilité de détection des inhibiteurs et est d'autant plus réaliste. La figure 53 nous montre l'inhibition du photocourant en présence de DCMU à trois concentrations de chlorophylle différentes. En utilisant 250 μg Chl/ml (soit la concentration utilisée auparavant), on peut détecter une inhibition avec 10^{-6} M; pour environ 10^{-7} M à 100 μg Chl/ml et environ 2×10^{-8} M avec seulement 50 μg Chl/ml. Evidemment une baisse de la concentration de chlorophylle entraîne une diminution du photocourant. Par contre cette diminution permet tout de même de mesurer l'activité de façon notoire. La réciproque des courbes précédentes permet de visualiser l'augmentation de sensibilité (Fig. 54). En diminuant la concentration de chlorophylle de 250, 100 à 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$; on observe 50% d'inhibition de l'activité photosynthétique (I_{50}) en présence d'une quantité de plus en plus faible de DCMU, soit 1.6, 1.2 et 0.4 μM , respectivement. Cette dernière approche permet non seulement d'augmenter la sensibilité mais aussi l'utilisation d'une moins grande quantité de matériel végétal.

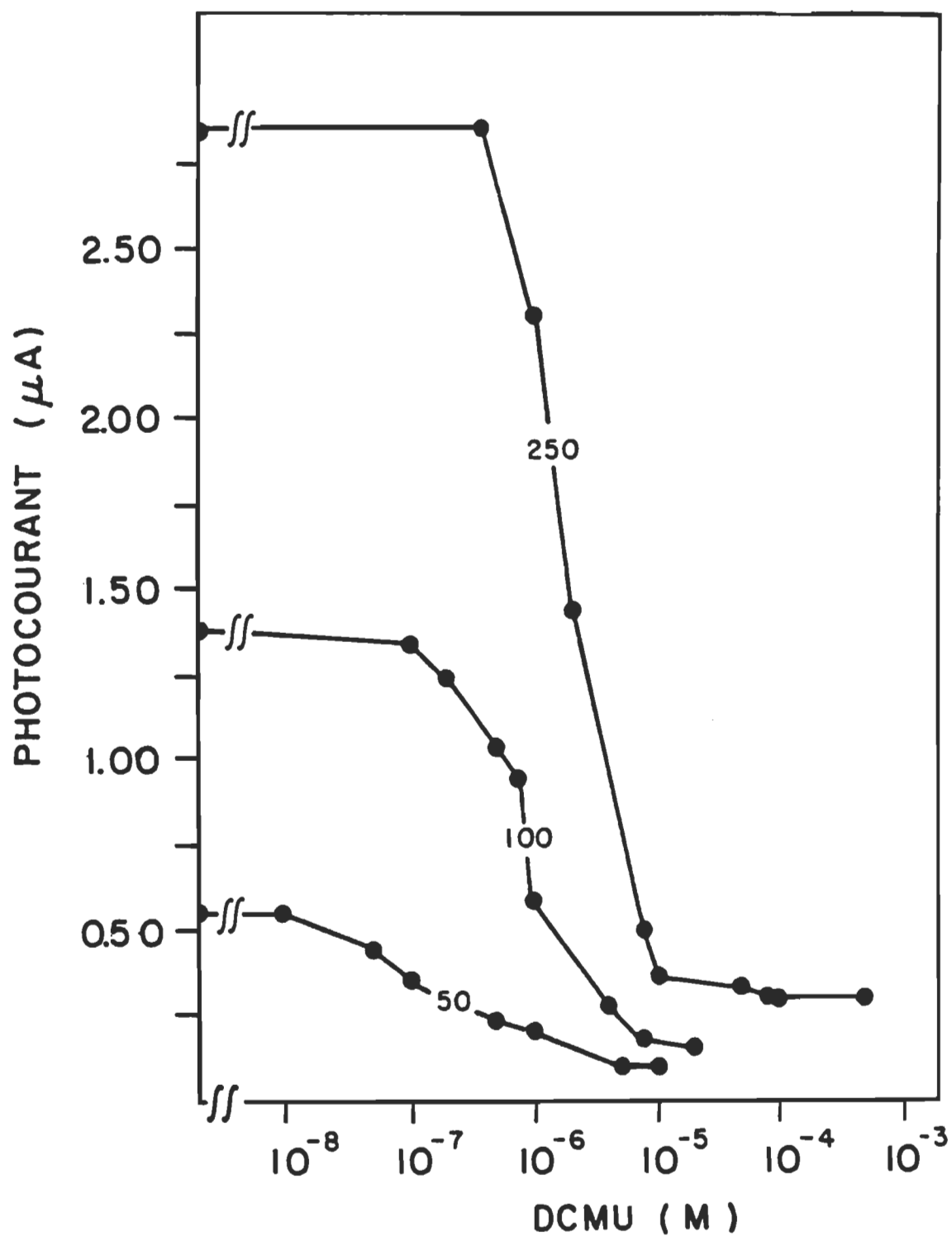


Figure 53. Inhibition du photocourant par le DCMU en fonction de la concentration de chlorophylle.

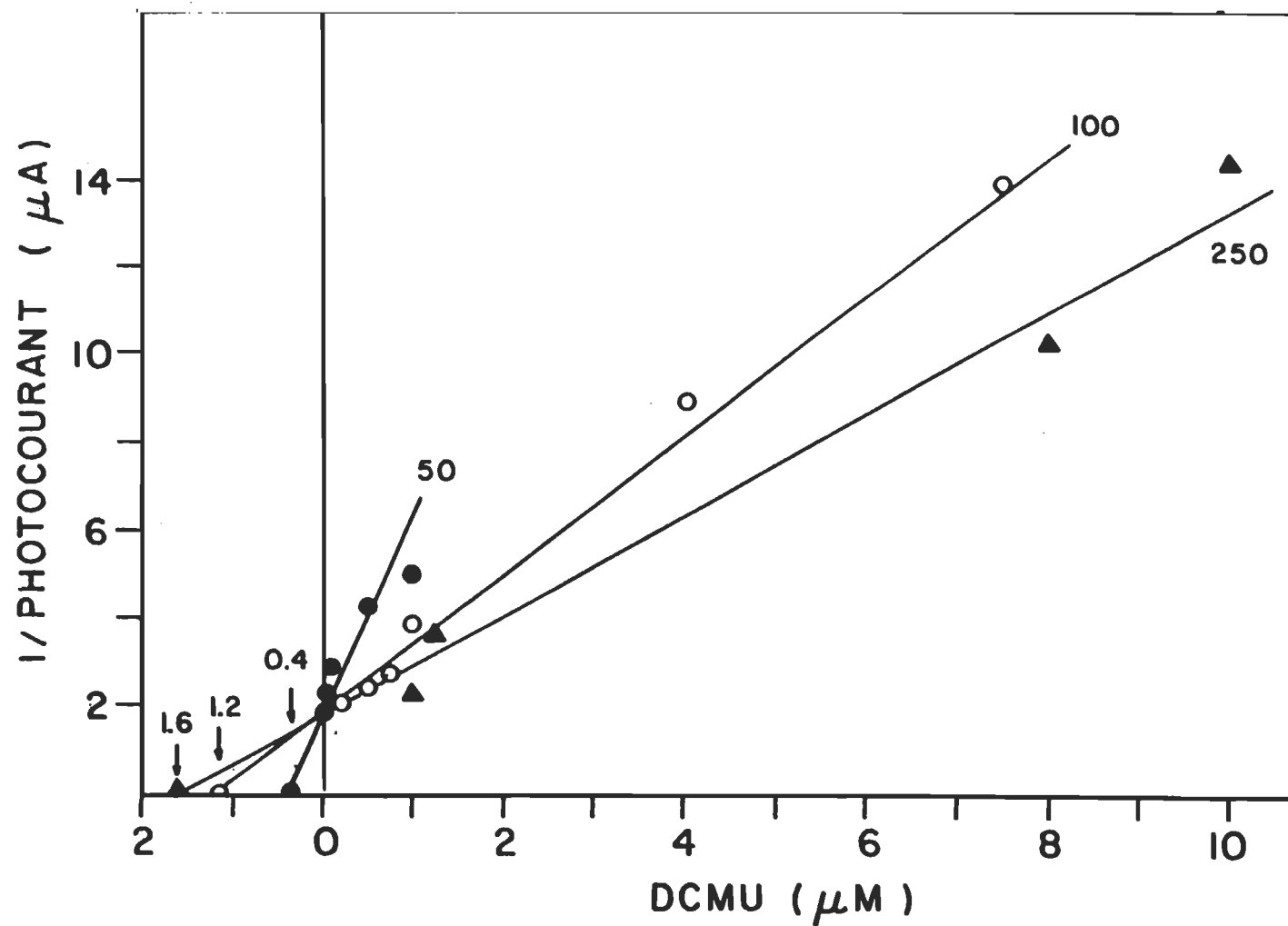


Figure 54. Simple réciproque du photocourant en fonction de la concentration de chlorophylle.

3.4.3 Immobilisation des membranes thylacoïdiennes

Le photocourant jusqu'ici généré est suffisamment élevé pour tirer, des membranes, l'information nécessaire à leur compréhension en présence d'inhibiteurs. Par contre la conversion d'énergie lumineuse en énergie électrique des membranes biologiques sous forte illumination, possède un temps de vie très court (Pan, 1982; Yagi, 1982; Pan, 1983; Sanderson, 1983). Plusieurs techniques ont été mises au point dans le but d'accroître la longévité du matériel biologique; dont l'une des premières, fut la microencapsulation dans une membrane perméable (Kitijima, 1976). Quelques années plus tard, l'immobilisation des membranes dans une matrice de glutaraldéhyde (voir la section 2.5.1 iv), fut introduite avec succès chez les membranes végétales (Cocquempot, 1981; Thomasset, 1983). Cette méthode, quoique procurant environ trois fois moins de photocourant, permet de garder les membranes dans un état physiologique satisfaisant, beaucoup plus longtemps (Carpentier, 1988).

Les membranes thylacoïdiennes immobilisées se comportent de la même façon que les natives en présence d'inhibiteurs du PSII. Avec l'atrazine, on réussit à inhiber le transfert d'électrons entre les quinones Q_A et Q_B (Fig. 55). La figure 56 nous montre, en présence de DCMU, le même type de résultats que précédemment. On remarque que cette technique

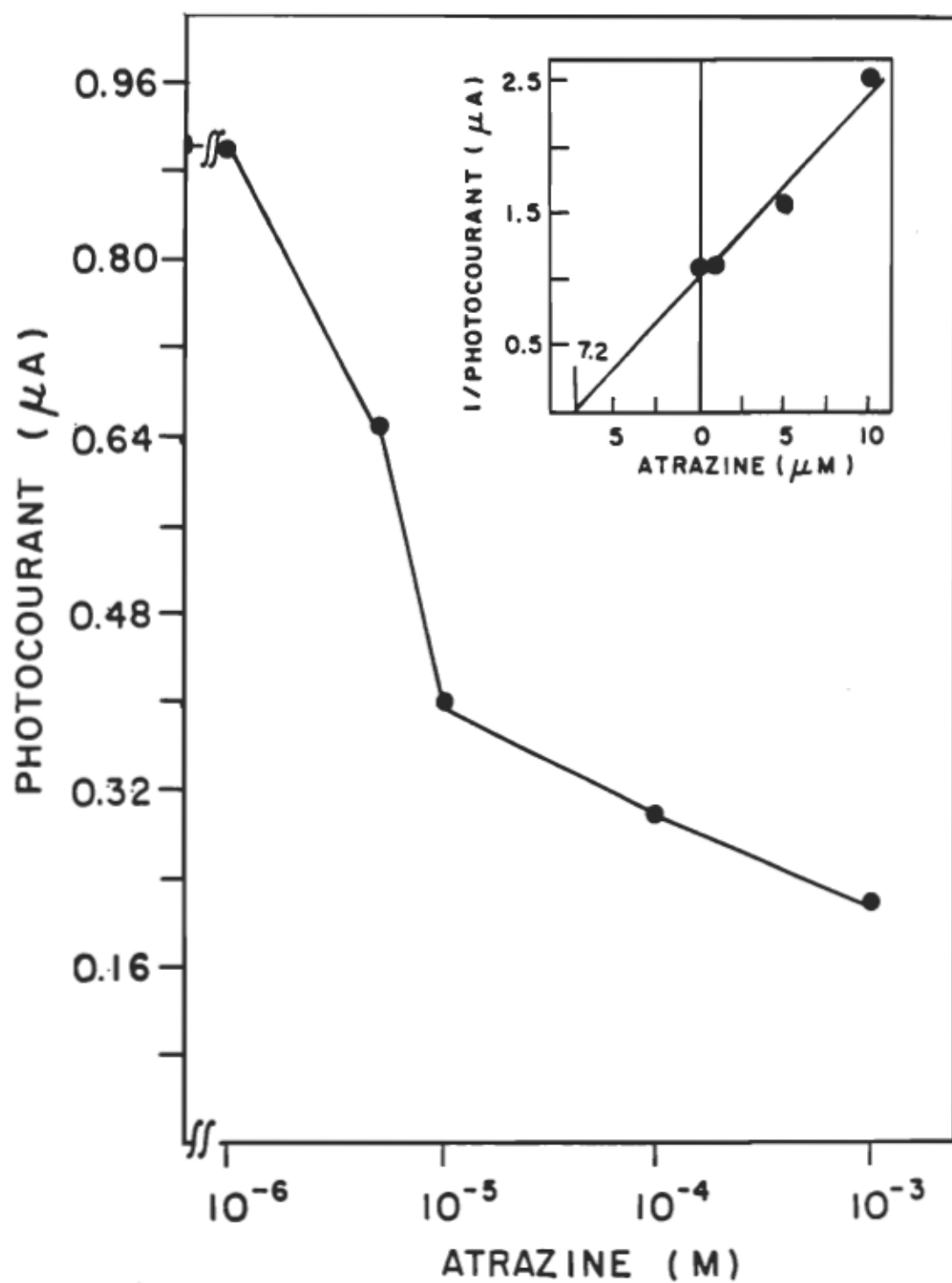


Figure 55. Inhibition du photocourant par l'atrazine chez des thylacoïdes immobilisés. Intégrée; simple réciproque en fonction du l'atrazine. 250 μg Chl/ml.

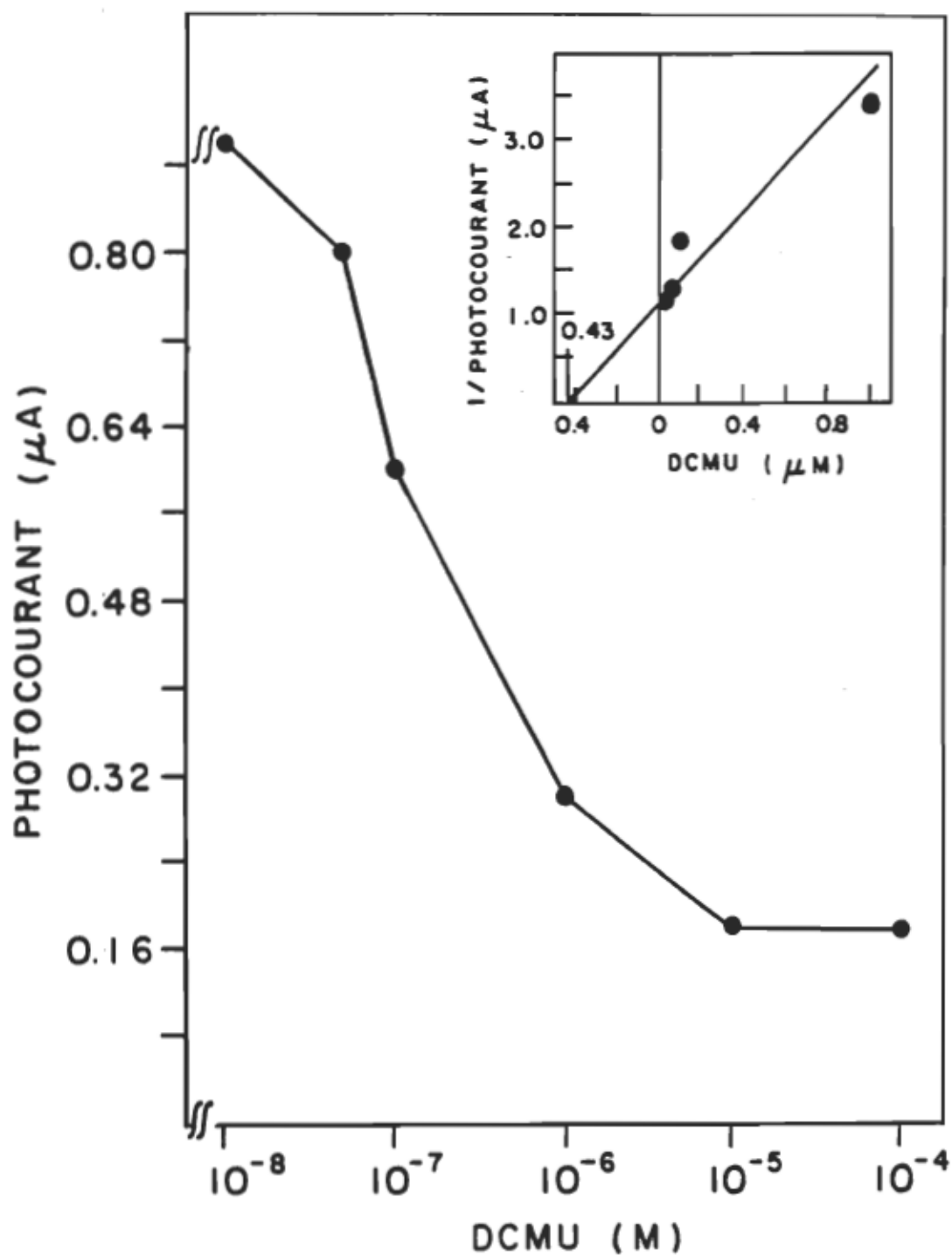


Figure 56. Inhibition du photocourant par le DCMU chez des thylacoïdes immobilisés. Intégrée simple réciproque en fonction du DCMU. 250 μg Chl/ml.

nous permet de gagner légèrement en sensibilité (voir Carpentier, 1989 et Purcell, 1990d pour une partie de ces résultats). Pour mieux visualiser l'implication physiologique des différents traitements pour chaque inhibiteur, la comparaison des I_{50} est démontrée au tableau 5.

Les membranes thylacoïdiennes utilisées dans la cellule photoélectrochimique s'avèrent un moyen efficace et sensible pour détecter les polluants aquatiques. Les différentes techniques présentées ici dans le but de signaler la présence de quantités de plus en plus infimes d'inhibiteurs, nous apportent une information supplémentaire: la quantité à laquelle la plante subira des dommages fonctionnels irréversibles. Cette méthode permettra dans le futur, de faire des mesures sur le terrain, par le biais des membranes thylacoïdiennes immobilisées, et ainsi avoir un résultat direct et temporel. Ce cheminement peut aussi nous amener à déceler les quantités accumulées chez la plante, qui affecteraient les échelons supérieurs de la chaîne alimentaire. Chez plusieurs poissons, dont la carpe, l'absorption de végétaux contaminés à l'atrazine s'est avérée néfaste physiologiquement, et ce surtout au niveau des reins, du foie et des muscles (Cossarini-Dunier, 1988). On a même décelé des quantités non négligeables dans le lait de consommation provoquée par son accumulation dans le régime de bovins (Krivankova, 1989).

TABLEAU 5

VALEURS DE I_{50} PAR INHIBITEUR (D'APRES LA METHODE DE
LINEWEAVER BURK)

Inhibiteurs	I_{50} (M)
Atrazine	
(250 μ g Chl/ml)	9.0×10^{-6}
imm. (250 μ g Chl/ml)	7.2×10^{-6}
DCMU	
(250 μ g Chl/ml)	1.6×10^{-6}
(100 μ g Chl/ml)	1.2×10^{-6}
(50 μ g Chl/ml)	4.0×10^{-7}
imm. (250 μ g Chl/ml)	4.3×10^{-7}
NaNO_2	5.5×10^{-4}
CuCl_2	7.2×10^{-4}
PbCl_2	1.0×10^{-3}
Na_2SO_3	1.7×10^{-3}
HgCl_2	1.8×10^{-3}
ZnCl_2	2.0×10^{-3}
CdCl_2	4.0×10^{-3}

Le nombre d'études sur cet herbicide est largement justifié compte tenu du fait qu'aux Etats Unis seulement, il s'utilise 79 millions de livres d'atrazine par année, le plaçant ainsi au deuxième rang des herbicides dans ce pays (anonyme, 1987).

CHAPITRE 4

CONCLUSION

L'étude présentée ici avait pour but de mieux comprendre les interactions de l'atrazine avec la membrane thylacoïdienne sous divers angles afin d'augmenter nos connaissances sur le mode d'action de ce type d'herbicide. L'analyse des interactions PSII/inhibiteurs nous a permis de mieux comprendre certains mécanismes d'action. Dans un premier temps, cette analyse s'est portée sur la probabilité d'un deuxième site d'inhibition de l'atrazine du côté donneur du PSII. En utilisant deux types de membranes différentes (PSII et thylacoïdes entiers), il a été possible de mieux caractériser un second site d'action de l'atrazine. Ainsi, avec le DPC et le $MnCl_2$ comme donneurs artificiels d'électrons, le site d'inhibition a été localisé sur le premier donneur d'électrons au P680 (Z) ou en amont (davantage vers l'appareil de dégagement d'oxygène). Cette conclusion est principalement basée sur la levée d'inhibition significative dans le cas du PSII comparativement aux membranes thylacoïdiennes. Ces résultats ont été répétés avec Chenopodium album L., Amaranthus Powellii S Wats et Brassica rapa L. pour s'assurer de la reproductibilité de la

conclusion. Par ailleurs, le second site d'action du côté donneur s'est avéré également présent chez le biotype résistant et résistant à l'atrazine en proportion semblable. Il est également possible qu'un changement conformationnel affecte la liaison de l'atrazine du côté donneur du PSII. Par contre, comme les résultats l'indiquent, le DPC interfère avec le site de liaison des herbicides de type triazine. Les données sur la photoréduction du DCPIP, le dégagement d'oxygène et la liaison de l'inhibiteur en présence d'atrazine marqué, s'accordent pour démontrer une inhibition compétitive de la liaison de l'atrazine par le DPC. Cette compétition prend la forme d'un déplacement de l'atrazine et ce, même à de très faibles concentrations des molécules impliquées.

L'étude du cytochrome b-559 chez les deux biotypes, révèle qu'il y aurait plus de cytochrome à bas potentiel chez les plantes résistantes à l'atrazine. Ceci appuie l'hypothèse de départ affirmant que le biotype résistant pourrait subir un changement conformationnel causant ainsi une réduction du potentiel rédox. D'autre part la photoréduction et la phooxydation du cytochrome en présence d'atrazine confirment son inter relation avec la chaîne de transport d'électrons.

La cellule photoélectrochimique utilisée comme biosenseur d'herbicides et de métaux lourds s'avère une

méthode d'une sensibilité appréciable. De plus il est possible d'augmenter la sensibilité de détection en diminuant la quantité de chlorophylle ou encore en immobilisant les membranes. Cette méthode s'applique donc à toute molécule affectant la photosynthèse, même à de très faibles concentrations et en particulier aux herbicides tels l'atrazine et le DCMU où la sensibilité de la technique est remarquable.

ANNEXE A

EVALUATION QUANTITATIVE DU COMPLEXE DE LIAISON DE
L'INHIBITEUR

L'extrapolation linéaire du graphique de la réciproque nous renseigne sur le processus de la liaison à haute affinité. Ce processus est appelé liaison spécifique et peut être formulé par la réaction suivante:



(A, inhibiteur; X, site spécifique de liaison;

XA, complexe du site de liaison de l'inhibiteur)

Et du tracé de la double réciproque:

$$K = \frac{a \cdot x}{xa}$$

Ainsi le processus de la liaison spécifique de l'inhibiteur est décrit par l'équation:

$$xa = \frac{x_t \cdot a}{K \cdot a}$$

x = concentration de site de liaison inoccupé

a = concentration d'inhibiteur libre

xa = concentration du complexe inhibiteur/site de liaison

x_t = concentration totale de site spécifique de liaison

K = constante de liaison

(Tischer, 1977)

ANNEXE B

PARAMETRES DE VERIFICATION D'UNE CINETIQUE D'ORDRE 1

$$\Delta A = \Delta A_{\max} (1 - e^{-T/\tau})$$

T = constante de temps (s)

$$\tau = 1/K$$

K = constante de vitesse (s^{-1})

SI $T = \tau$:

$$\Delta A = \Delta A_{\max} (1 - e^{-1})$$

$$\Delta A = \Delta A_{\max} 0.63$$

On peut donc évaluer $T = \tau$ en mesurant 63% du changement maximum d'absorbance directement sur les courbes de cinétiques. Par la suite, l'obtention d'une droite sur le graphique $\ln (\Delta A_{\max} - \Delta A_t)$ en fonction du temps réel, nous assure qu'il s'agit d'une réaction d'ordre 1.

BIBLIOGRAPHIE

Allen, M.J., et Crane, A.E. Null potential voltammetry - An approach to the study of plant photosystems.

Bioelectrochem. Bioenerg. 1976, 3, 84-91.

Anderson, J.M., et Andersson, B. Photosynthesis (G.

Akoyunoglou, ed.), vol.III Structure and molecular

organization of the photosynthetic apparatus. 1981, 23-31.

Anonyme National pesticide use analysed. Alternative Agr.

News 1987, 5, 1-4.

Apostolova, E.L. Effect of the detergents on the

microviscosity of chloroplast membranes - A spin label

study. Comptes Rendus Aca. Bul. Sci. 1988a, 41, 97-100.

Apostolova, E.L. Effect of detergent treatment and

glutaraldehyde modification on the photochemical activity

of chloroplasts. Comptes Rendus Aca. Bul. Sci. 1988b, 41, 117-120.

- Arntzen, C.J., Ditto, C.L., et Brewer, P.E. Chloroplast membrane alteration in triazine resistant Amaranthus retroflexus biotypes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979, 76, 278-282.
- Bailey, R., et Lebel, G. Gas-liquid chromatography of triazine herbicides as heptafluorobutyl derivatives and some applications to analysis in foods. J. chromatogr. 1978, 161, 251-257.
- Barabas, K., et Garab, G. Two populations of the high-potential form of cytochrome b-559 in chloroplasts treated with 2-(3-chloro-4-trifluoromethyl)anilino-3,5-dinitrothiophene (Ant 2p). FEBS Letters 1989, 248, 62-66.
- Barber, J., Gounaris, K., et Chapman, D.J. in Cytochrome Systems: Molecular biology and bioenergetics (S. Papa, B. Chance, and L. Ernster, eds.) Plenum press, New York. 1987, 657-666.
- Barros, M.D.C., et Dyer, T.A. Atrazine resistance in the grass Poa annua is due to a single base change in the chloroplast gene for the D1 protein of photosystem II. Theor. Appl. Genet. 1988, 75, 610-616.

Barry, B.A., et Babcock, G.T. Tyrosine radicals are involved in the photosynthetic oxygen-evolving system. Proc. Natl. Acad. Sci. 1987, 84, 7099-7103.

Baszynski, T, Tukendorf, A., Ruszkowska, M., Skorzynska, E., et Maksymiec, W. Characteristics of the photosynthetic apparatus of copper non-tolerant spinach exposed to excess copper. J. Plant Physiol. 1988, 132, 708-713.

Bazzaz, M.B., et Govindjee Effects of cadmium nitrate on spectral characteristics and light reactions of chloroplasts. Environm. Lett. 1974, 6, 1-12.

Becerill, J.M, Munoz-Rueda, A., Aparicio-Tejo, P., et Gonzalez- Murua, C. The effects of cadmium and lead on photosynthetic electron transport in clover and lucerne. Plant Physiol. Biochem. 1988, 26, 357-363.

Bendall, D.S., Davenport, H.E., et Hill, R. Cytochrome components in chloroplasts of the higher plants. Methods Enzymol. 1971, 23, 327-343.

Bendall, D.S. Photosynthetic cytochromes oxygenic organisms. Biochim. Biophys. Acta., 1982, 683, 119-151.

Ben-Hayyim, G., et Avron, M. Mn^{2+} as electron donor in isolated chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta. 1970, 205, 86-94.

Ben-Hayyim, G., et Avron, M. Cytochrome b of isolated chloroplasts. Eur. J. Biochem. 1970, 14, 205-213.

Black, V.J. Effects of sulfur dioxide on physiological processes in plants. in Effects of gaseous air pollution in agriculture and horticulture. (eds. Unsworth, M.H., Ormrod, D.P.) 1982, 67-91.

Böger, P. Replacement of photosynthetic electron transport inhibitors by silicomolybdate. Physiol. Plant. 1982, 54, 221-224.

Böhme, H., et Cramer, W.A. Plastoquinone mediates electron transport between cytochrome b-559 and cytochrome f in spinach chloroplasts. FEBS Lett. 1971a, 15, 349-351.

Böhme, H., Reimer, S., et Trebst, A. On the role of plastoquinone in photosynthesis: The effect of dibromothymoquinone, an antagonist of plastoquinone on non-cyclic and cyclic electron flow system in isolated chloroplasts. Z. Naturforsch. 1971b, 26b, 341-352.

- Bouges-Bocquet, B. Electron transfer between the two photosystems in spinach chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta. 1973, 314, 250-256.
- Bouges-Bocquet, B. Kinetic models for the electron donors of photosystem II of photosynthesis. Biochim. Biophys. Acta. 1980, 594, 85-103.
- Brettel, K., Schlodder, E., et Witt, H.T. Nanosecond reduction kinetics of photooxidized chlorophyll- a_{11} (P680) in single flashes as a probe for the electron pathway, H^+ -release and charge accumulation in the O_2 -evolving complex. Biochim. Biophys. Acta. 1984, 766, 403-415.
- Brooks, M.W., Jenkins, J., Jimenez, M., Quinn, T., et Clark, J.M. Rapid method for the determination of alachlor, atrazine and metolachlor in groundwater by solid-phase extraction. Analyst 1989, 114, 405-406.
- Burke, J.J., Wilson, R.F., et Swafford, J.R. Characterization of chloroplasts isolated from triazine-susceptible and triazine-resistant biotypes of Brassica campestris L. Plant Physiol. 1982, 70, 24-29.

Bushway, R.J., Perkins, B., Savage, S.A., Lekousi, S.L., et Ferguson, B.S. Determination of atrazine residues in food by enzyme immunoassay. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1989, 42, 899-904.

Butler, W.L. On the role of the cytochrome two in non-chloroplasts. FEBS Lett., 1978, 95, 19-25.

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

Carpentier, R. et Nakatani H.Y. Inhibition affecting the oxidizing side of photosystem II at the Ca^{2+} -and Cl^{-} -sensitive site. Biochim. Biophys. Acta., 1985b, 808, 288-292.

Carpentier, R., et Mimeault, M. The photosynthetic partial reactions involved in photoelectrochemical current generation by thylakoid membranes. Biotechnol. Lett. 1987, 2, 111-116.

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

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

Cedeno-Maldonado, A., Swader, J.A., et Heath, R.L. The cupric ion as an inhibitor of photosynthetic electron transport in isolated chloroplasts. Plant Physiol. 1972, 50, 698-701.

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

Coleman, W.J., Govindjee, et Gutowsky, H.S. ^{35}Cl -NMR measurement of chloride binding to the oxygen-evolving complex of spinach photosystem II. Biochim. Biophys. Acta. 1987, 894, 443-452.

Cossarini-Dunier, M., Demaël, A., Riviere, J.L., et Lepot, D. Effects of oral doses of the herbicides atrazine on carp (Cyprinus carpio). AMBIO 1988, 17, 401-405.

Cramer, W.A. et Böhme, H. High-potential cytochrome b-559 as a secondary quencher of chloroplast fluorescence in the presence of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea. Biochim. Biophys. Acta., 1972, 256, 358-369.

Cramer, W.A., et Whitmarsh, Photosynthetic cytochromes. J. Annu. Rev. Plant Physiol. 1977, 28, 133-172.

Cramer, W.A., Theg, S.M. et Widger, W.R. On the structure and function of cytochrome b-559. Photosynth. Res. 1986, 10, 393-403.

Crofts, A.R., et Wraight, C. The electrochemical domain of photosynthesis. Biochim. Biophys. Acta. 1983, 726, 149-185.

Debus, R.J., Barry, B.A., Babcock, G.T. et McIntosh, L. Site-directed mutagenesis identifies a tyrosine radical involved in the photosynthetic oxygen-evolving system. Proc. Natl. Acad. Sci. 1988, 85, 427-430.

De Filippis, L. F., Hampp, R. et Ziegler, H. The effects of sublethal concentration of zinc, cadmium and mercury on Euglena. II. Respiration, photosynthesis and photochemical activities. Arch. Microbiol. 1981, 128, 407-411.

Dekker, J.P., Van Gorkom, H.J., et Duwehand, L. Optical characterization of photosystem II electron donors. Biochim. Biophys. Acta. 1984, 764, 301-309.

DeLaRosa, F.F., Galvan, F. et Lasada, M. in photosynthesis II. Electron transport and phosphorylation (G. Akoyunoglou, ed.) Balaban International Science Services. Philadelphia. 1981, 531-541.

Demetriou, C., Lockett, C.J., et Nugent, J.H.A. Photochemistry in the isolated photosystem II reaction-center core complex. Biochem. J. 1988, 252, 921-924.

De Paula, J.C., Innes, J.B., et Brudvig, G.W. Electron transfert in photosystem II at cryogenic temperatures. Biochemistry, 1985, 24, 8114-8120.

Dietz, B., Moors, I., Flammersfeld, U., Rühle, W. et Wild, A. Investigation on the photosynthetic membranes of spruce needles, in relation to the occurrence of a novel forest decline. I. The photosynthetic electron transport. Z. Naturforsch. 1988, 43c, 581-588.

Evans, M.C.W., Diner, B.A., et Nugent, J.H.A. Characteristics of the photosystem II reaction center. I. Electron acceptors. Biochim. Biophys. Acta. 1982, 682, 97-105.

Fan, H.A., et Cramer W.A. The redox potentials of cytochrome b-559 and b-563 in spinach chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta. 1970, 216, 200-207.

Foyer, C.H. Photosynthesis (E.E. Bittar, ed.), 1984, 1-77.

Galvan, F., de la Rosa, F.F., Hervas, M., et Losada, M. pH-dependent interconversion between the two redox forms of chloroplast cytochrome b-559. Bioelectrochem. Bioenerg. 1983, 10, 413-426.

Gardner, G. Azidoatrazine: Photoaffinity label for the site of triazine herbicide action in chloroplasts. Science. 1981, 211, 937-940.

Garewal, H.S., et Wasserman, A.R. Triton X-100 -4 M urea as an extraction medium for membrane proteins: I. Purification of chloroplast cytochrome b-559. Biochemistry, 1974, 13, 4063-4071.

Garewal, H.S., et Wasserman, A.R. Triton X-100 -4 M urea as an extraction medium for membrane proteins: II. Molecular properties of pure cytochrome b-559: A lipoprotein containing small polypeptide chains and composition. Biochemistry, 1974, 13, 4072-4079.

Gerken, S., Brettel, K., Schlodder, E., et Witt, H.T. Direct observation of the immediate electron donor to chlorophyll- a_{II}^+ (P-680⁺) in oxygen-evolving photosystem II complexes. FEBS Lett. 1987, 223, 376-380.

Gerken, S., Brettel, K., Schlodder, E., et Witt, H.T. Optical characterization of the immediate electron donor to chlorophyll a_2^+ in O₂-evolving photosystem II complexes: Tyrosine as possible electron carrier between chlorophyll a_2 and the water-oxidizing manganese complex. FEBS Lett. 1988, 237, 69-75.

Ghanotakis, D.F., Babcock, G.T., et Yocum, C.F. Structural and catalytic properties of the oxygen-evolving complex. Correlation of polypeptide and manganese release with the behavior of Z^{+} in chloroplasts and a highly resolved preparation of the photosystem II complex. Biochim. Biophys. Acta. 1984, 765, 388-398.

Graan, T. The interaction of silicomolybdate with the photosystem II herbicide-binding site. FEBS Lett. 1986, 206, 9-14.

Greenbaum, E. Biomolecular electronics: observation of oriented photocurrents by entrapped platinized chloroplast. Bioelectrochem. Bioenerg. 1989, 21, 171-177.

Grob, K.jr., et Li, Z. Coupled reversed-phase liquid chromatography-capillary gas chromatography for the determination of atrazine in water. J. Chromatogr. 1989, 473, 423-430.

Hampp, R., Beulich, K., et Ziegler, H. Effects of zinc and cadmium on photosynthetic CO_2 -fixation and Hill activity of isolated spinach chloroplasts. Z. Pflanzenphysiol. 1976, 77, 336-344.

Heber, U., Kirk, M.R. et Boardman, N.K. Photoreactions of cytochrome b-559 and cyclic electron flow in photosystem II of intact chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta. 1979, 546, 292-306.

Hermann, P., Hladik, J., et Sofrova, D. Effect of detergents on thylakoid membranes of chloroplasts. Photosynth. 1988, 22, 411-422.

Hervas, M., Ortega, J.M., De la Rosa, M.A., De la Rosa, F.F., et Losada, M. Location and function of cytochrome b-559 in the chloroplast noncyclic electron transport chain. Physio. Veg. 1985, 23, 593-604.

Hill, D.J., Thomas, M.D. Influence of leaf destruction by sulfur dioxide and clipping on yield of alfalfa. Plant Physiol. 1933, 8, 223-245.

Hill, R., et Bendall, D.S. Function of the two cytochrome components in chloroplasts: A working hypothesis. Nature 1960, 186, 136-137.

Hirschberg, J., et McIntosh, L. Molecular basis of herbicide resistance in Amaranthus hybridus. Science, 1983, 222, 1346-1349.

Horton, P. et Cramer, W.A. Light-induced turnover of chloroplast cytochrome b-559 in the presence of N-methylphenazonium methosulphate. Biochim. Biophys. Acta. 1975, 396, 310-319.

Horton, P., Whitmarsh, J., et Cramer, W.A. On the specific site of action of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea in chloroplasts: Inhibition of a dark acid-induced decrease in midpoint potential of cytochrome b-559. Arch. Biochem. Biophys. 1976, 176, 519-524.

Horton, P., et Cramer, W.A. Stimulation of photosystem I induced oxydation of chloroplast cytochrome b-559 by pre-illumination and by low pH. Biochim. Biophys. Acta. 1976, 430, 122-134.

Houchins, J.P., et Hind, G. Concentration and function of membrane-bound cytochromes in cyanobacterial heterocysts. Plant Physiol. 1984, 76, 456-460.

Hsu, B.-D., et Lee, J.-Y. Toxic effects of copper on photosystem II of spinach chloroplasts. Plant Physiol. 1988, 87, 116-119.

- Huang, L.Q. Simultaneous determination of alachlor, metolachlor, atrazine, and simazine in water and soil by isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1989, 72, 349-354.
- Ikeuchi, M. Yuasa, M. et Inoue, Y. Simple and discrete isolation of an O_2 -evolving PSII reaction center complex retaining Mn and the extrinsic 33 kDa protein. FEBS Lett. 1985, 185, 316-322.
- Ikeuchi, M., Koike, H., et Inoue, Y. Iodination of D1 (herbicide-binding protein) is coupled with photooxidation of $^{125}I^-$ associated with Cl^- -binding site in photosystem II water-oxidation system. Biochim. Biophys. Acta., 1988, 932, 160-169.
- Ikeuchi, M. et Inoue, Y. Partial characterization of the iodination site in D1 protein of manganese-retaining and manganese-depleted photosystem II membranes. Plant Cell Physiol. 1988b, 29(4), 695-705.
- Inoue, H., Kitamura, T., et Noguchi, M. Heat inactivation of electron transport reactions in photosystem II particles. Physiol. Plant. 1987, 71, 441-447.

Izawa, S. Photoreduction of 2,6-dichlorophenolindophenol by chloroplasts with exogenous Mn^{2+} as electron donor.

Biochem. Biophys. Acta., 1970, 197, 328-331.

Izawa, S. Acceptors and donors for chloroplast electron transport. Meth. Enzymol., 1980, 69, 413-433.

Joliot, P., et Joliot, A. in Forti G (ed.) Proc 2nd Int Congr Photosynth. Elsiever, Amsterdam New York Oxford, 315-322.

Joliot, P. et Kok, B. Bioenergetics of photosynthesis (Govindjee, ed.). 1975, 387-412.

Junge, W. Encyclopedia of plant physiology, new series. 1977, Vol. 5, 59-93.

Jursinic, P. et Stemler, A. Changes in [^{14}C]atrazine binding associated with the oxidation-reduction state of the secondary quinone acceptor of photosystem II. Plant. Physiol. 1983, 73, 703-708.

Kato, S., et Takamiya, A. Iron-protein binding photosynthetic pyridine nucleotide reductase. Arch. Biochem. Biophys. 1963, 102, 189-200.

Kimimura, M., et Katoh, S. Studies on electrons transport associated with photosystem I. 1. Functional site of plastocyanin; Inhibitory effects of HgCl_2 on electron transport and plastocyanin in chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta. 1972, 283, 279-292.

Kitajima, M., et Butler, W.L. Microencapsulation of chloroplast particles. Plant Physiol. 1976, 57, 746-750.

Klimov, V.V., Dolan, E., Shaw, E.R., et Ke, B. Interaction between the intermediary electron acceptor (pheophytin) and a possible plastoquinone iron complex in photosystem II reaction centers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1980, 77, 7227-7231.

Knaff, D.B., et Arnon, D.I. A concept of three light reactions in photosynthesis by green plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1969, 63, 956-962.

Knaff, D.B. The effect of pH on the midpoint oxidation-reduction potentials of components associated with plant photosystem II. FEBS Lett. 1975, 60, 331-335.

Kok, B., Forbush, B., et McGloin, M. Cooperation of charges in photosynthetic oxygen evolution. I. A linear four-step mechanism. Photochem. Photobiol. 1970, 11, 457-475.

Krivankova, L., Bocek, P., Tekel, J., et Kovacicova, J.

Isotachophoretic determination of herbicides prometryne, desmetryne, terbutryne and hydroxy-derivatives of atrazine and simazine in extracts of milk.

Electrophoresis 1989, 10, 731-734.

Kyle, D.J., Ohad, I., Guy, R., et Arntzen, C.J. Assignment of function to polypeptides of 32-34 kilodaltons in thylakoids. In The oxygen evolving system of photosynthesis, (Y. Inoue eds.), Academic press, Tokyo, 1983, 401-410.

Lach, H.-J., Böhme, H., et Böger, P. Some photoreactions of isolated cytochrome b-559. Biochim. Biophys. Acta. 1977, 462, 12-19.

Lam, E., Baltimore, B., Ortiz, W., Chollar, S., Melis, A. et Malkin, R. Characterization of a resolved oxygen-evolving Photosystem II preparation from spinach thylakoids. Biochim. Biophys. Acta., 1983, 724, 201-211.

Lehoczki, E., Pölös, E., Laskay, G., et Farkas, T.

Chemical compositions and physical states of chloroplast lipids related to atrazine resistance in conyza canadensis L. Plant Science, 1985, 42, 19-24.

Lemieux, S., et Carpentier, R. Properties of a photosystem

II preraration in a photoelectrochemical cell. J.

Photochem. Photobiol. 1988, 2, 221-231.

Li, E.H., et Miles, C.D. Effects of cadmium of photoreaction

II of chloroplasts. Plant Sci. Lett. 1975, 5, 33-40.

Losada, M., Hervas, M., De la Rosa, M.A., De la Rosa, F.F.

Energy transduction by bioelectrochemical systems.

Bioelectrochem. Bioenerg. 1983, 11, 193-230.

Mathis, P., Satoh, K., et Hansson, ö. Kinetic evidence for

the function of Z in isolated photosystem II reaction

centers. FEBS Lett. 1989, 251, 241-244.

Mattoo, A.K., St. John, J.B., et Wergin, W.P. Adaptive

reorganization of protein and lipid components in chloroplast membranes as associated with herbicide

binding. J. cell. Biochem. 1984, 24, 163-175.

- Maroc, J., et Garnier, J. Photooxidation of the cytochrome b-559 in the presence of various substituted 2-anilinothiophenes and of some other compounds, in chlamydomonas reinhardtii. Biochem. Biophys. Acta. 1979, 548, 374-385.
- Melher, A.H. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. Arch. Biochem. Biophys. 1951, 33, 65-77.
- Menke, W. Structure and chemistry of plastids. Ann. Rev. Plant physiol. 1962, 13, 27-44.
- Metz, J.G., Pakarasi, H.B., Seibert, M. et Arntzen, C.J. Evidence for a dual fonction of the herbicide-binding D1 protein in photosystem II. FEBS Lett. 1986, 205, 269-274.
- Metz, J.G., Nixon, P.J., Rögner, M., Brudvig, G.W., et Diner, B.A. Directed alteration of the D1 polypeptide of photosystem II: Evidence that tyrosine-161 is the redox component, Z, Connecting the oxygen-evolving complex to the primary electron donor, P680. Biochemistry, 1989, 28, 6960-6969.
- Mimeault, M. et Carpentier, R. Electrochemical differentiation between photosystem I and II in thylakoid membranes. Biochem. Cell Biol. 1988, 66, 436-441.

Mullet, J.E., et Arntzen, C.J. Identification of a 32-34 kilodalton polypeptide as a herbicide receptor protein in photosystem II. Biochim. et biophys. Acta., 1981, 635, 236-248.

Murata, M., Miyao, M., Omata, T., Matsunami, H., et Kurabara, T. Stoichiometry of components in the photosynthetic oxygen evolution system of photosystem II particles prepared with Triton X-100 from spinach chloroplast. Biochim. Biophys. Acta. 1984, 765, 363-369.

Nakatani, H.Y. Inhibition of photosynthetic oxygen evolution by calmodulin-type inhibitors and other calcium-antagonists. Biochem. Biophys. Res. Comm. 1984, 121, 626-633.

Nelson, N., et Neumann, J. Partial resolution of the enzyme catalyzing phosphorylation: XI. Magnesium-adenosine triphosphate properties of heat-activated coupling factor I from chloroplasts. J. Biol. Chem. 1972, 247, 1817-1824.

Newsome, W.H. Potential and advantages of immunological methods for analysis of foods. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1986, 69, 919-923.

Nugent, J.H.A., Diner, B.A., Evans, M.C.W. Directe
detection of the electron acceptor of the photosystem II.
Evidence that Q is an iron-quinone complex. FEBS Lett.
1981, 124, 241-244.

Oettmeier, W., Masson, K., et Johanningmeier, U. Evidence
for two different herbicide-binding proteins at the
reducing side of photosystem II. Biochim. Biophys. Acta.
1982, 679, 376-383.

Oettmeier, W., Masson, K., et Höhfeld, J. [¹²⁵I]Azido
-ioxy nil labels val₂₄₉ of the photosystem II D-1 reaction
center protein. Z. Naturforsch. 1989, 44c, 444-449.

Okamura, M.Y., Debus, R.J., Kleinfeld, D. et Feher, G.
Quinone binding sites in reaction centers from
photosynthetic bacteria. In Function of quinones in
energy conserving systems (B.L. Trumpower ed.), Academic
press, New York, 1982, 299-317.

Oren, A., Padan, E., et Malkin, S. Sulfide inhibition of
photosystem II in cyanobacteria (blue-green algae) and
tobacco chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta. 1979, 546,
270-279.

Ortega, J.M., Hervas, M., et Losada, M. Redox and acid-base characterization of cytochrome b-559 in photosystem II particles. Eur. J. Biochem. 1988, 171, 449-455.

Ortega, J.M., Hervas, M., et Losada, M. Isolation and comparison of molecular properties of cytochrome b-559 from both spinach thylakoids and PSII particules. Z. Naturforsch., 1989, 44c, 6-13.

Pan, R.L., Ji Fan, I., Bhardwaj, R., et Gross, E.L. A photosynthetic photoelectrochemical cell using flavin mononucleotide as the electron acceptor. Photochem. Photobiol. 1982, 35, 155-164.

Pan, R.L., Bhardwaj, R., et Gross, E.L. Photochemical energy conversion by a thiazine photosynthetic -photoelectrochemical cell. J. Chem. Tech. Bioechnol. 1983, 33A, 39-48.

Pfister, K., Radosevich, S.R., et Arntzen, C.J. Modification of herbicide binding to photosystem II in two biotypes of Senecio vulgaris L. Plant physiol. 1979, 64, 995-999.

Pfister, K., Steinback, K.E., Gardner, G., et Arntzen, C.J.

Photoaffinity labelling of an herbicide receptor protein in chloroplast membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981, 78, 981-985.

Preston, C., et Seibert, M. Regeneration of the high

-affinity manganese-binding site in the reaction center of an oxygen-evolution deficient mutant of Scenedesmus by protease action. Photosynth. Res. 1989, 22, 101-113.

Purcell, M., Leroux, G.D., et Carpentier, R. Atrazine

action on the donor side of photosystem II in triazine-resistant and -susceptible weed. Pest. Biochem. Physiol. 1990a, 37, (sous presse).

Purcell, M., et Carpentier, R. A phototoxicity biosensor

using photosynthetic membranes. Water poll. res. J. Can. 1990b, (soumis).

Purcell, M., Leroux, G.D., et Carpentier, R. Interaction

of diphenylcarbazine with the herbicide binding niche of photosystem II. Biochim. Biophys. Acta. 1990c (soumis).

Purcell, M., Bélanger, D., Fortier, G., et Carpentier, R.

An herbicide biosensor using photosynthetic membranes.

Biosensors Bioelectro. 1990d (en préparation)

Radmer, R. et Kok, B. Energy capture in photosynthesis:

photosystem II. Ann. Rev. Biochem. 1975, 44, 409-433.

Radunz, A., et Bader, K.P. Influence of β -carotene

antibodies on the photosynthetic electron transport in

chloroplasts of higher plants and in thylakoids of the

blue green alga, Oscillatoria chalybea. Biochemistry and

metabolism of plant lipids (Wintermans, J.F.G.M., Kuiper,

P.J.C. editors). 1982, 377-383.

Rao, L.V.M., Usharani, P., Butler, W.L., et Tokuyasu, K.T.

Localization of the cytochrome b-559 in the chloroplast

thylakoid membranes in spinach. Plant Physiol. 1986, 80,

138-141.

Rashid, A. et Van Rensen, J.J.S. Uncoupling and

photoinhibition in chloroplasts from a triazine-resistant

and a susceptible Chenopodium album biotype. Pest.

Biochem. and Physiol. 1987, 28, 325-332.

Rawyler, A., et Siegenthaler, P.-A. Role of lipids in functions of photosynthetic membranes revealed by treatment with lipolytic acyl hydrolase. Eur. J. Biochem. 1980, 110, 179-187.

Rawyler, A., et Siegenthaler, P.-A. Transmembrane distribution of phospholipids and their involvement in electron transport, as revealed by phospholypase A₂ treatment of spinach thylakoids. Biochim. Biophys. Acta. 1981, 635, 348-358.

Renger, G. Photosynthetic water oxidation (H. Melzner, ed.) Academic Press, London. 1978, 229-248.

Renger, G., Hagemann, R. et Dohnt, G. The role of lysine residues for excitation energy transfer and herbicide action in system II. Photobiochem. Photobiophys. 1983, 5, 273-279.

Renger, G., Hagemann, R. et Fromme, R. The suseptibility of the p-benzoquinone-mediated electron transport and atrazine binding to trypsin and its modification by CaCl₂ in thylakoids and PSII membrane fragments. FEBS Lett. 1986, 203, 210-214.

Renger, G., Fromme, R. et Hagemann, R. The modification of atrazine binding by the redox state of the endogenous high-spin iron and by specific proteolytic enzymes in photosystem II membrane fragments and intact thylakoids. Biochim. Biophys. Acta. 1988, 935, 173-183.

Renger, G., Völker, M., Eckert, H.J., Fromme, R., Hohm-Veit, S., et Gräber, P. On the mechanism of photosystem II deterioration by UV-B irradiation. Photochem. photobiol. 1989, 49, 97-105.

Rich, P.R. et Bendall, D.S. The redox potentials of the b₆-type cytochromes of higher plant chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta., 1980, 591, 153-161.

Rich, P.R. A generalised model for the equilibration of quinone pools with their biological donors and acceptors in membrane-bound electron transfer chains. FEBS Lett. 1981, 130, 173-178.

Rich, P.R., et Moss, D.A. The reactions of quinones in higher plant photosynthesis. The light reactions, edited by J. Barber. 1987, 421-445.

Roseboom, H., et Herbold, H.A. Determination of triazine herbicides in various crops by capillary gas chromatography with thermionic detection. J. Chromatogr. 1980, 202, 431-438.

Rutherford, A.W., et Zimmermann, J.L. A new EPR signal attributed to the primary plastosemiquinone acceptor in photosystem II. Biochim. Biophys. Acta. 1984, 767, 168-175.

Salin, M.L. Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. Physiol. Plant., 1987, 72, 681-689.

Samuelsson, G., et Öquist, G. Effects of copper chloride on photosynthetic electron transport and chlorophyll-protein complexes of Spinacia oleracea. Plant Cell Physiol. 1980, 21, 445-454.

Sanderson, D.G., Pan, R.L., et Gross, E.L. Studies of photosynthetic photoelectrochemical cell using various electrodes. Appl. Biochem. Biotechnol. 1983, 8, 395-405.

Satoh, K., Nakatani, H.Y., Steinback, K.E., Watson, J. et
Arntzen, C.J. Polypeptide composition of a photosystem
II core complex presence of a herbicide-binding protein.
Biochim. Biophys. Acta. 1983, 724, 142-150.

Sauer, K. Photosynthesis. The light reaction. Ann. Rev.
Phys. Chem. 1979, 30, 155-178.

Sayer, R.T., Andersson, B., et Bogorad, L. The topology, of
a membrane protein: The orientation of the 32 kd Qb
-binding chloroplast thylakoid membrane protein. Cell,
1986, 47, 601-608.

Schlaeppli, J.-M., Föry, W., et Ramsteiner, K.
Hydroxyatrazine and atrazine determination in soil and
water by enzyme-linked immunosorbent assay using specific
monoclonal antibodies. J. Agr. Food Chem. 1989, 37, 1532
-1538.

Schmid, G.H., et Lehmann-Kirk, U. Photooxidation reactions
of diphenylcarbazine and their DCMU-sensitivity in
thylakoids of the blue-green alga *Oscillatoria chalybea*.
Arch. Microbiol. 1977, 115, 265-269.

- Seibert, M., Tamura, N., et Inoué, Y. Lack of photoactivation capacity in Scenedesmus obliquus LF-1 results from loss of half the high-affinity manganese-binding site. Relationship to the unprocessed D1 protein. Biochim. Biophys. Acta. 1989, 974, 185-191.
- Shimazaki, K., Nakamachi, K., Kondo, N., et Sugahara, K. Sulfite inhibition of photosystem II in illuminated spinach leaves. Plant Cell Physiol. 1984, 25, 337-341.
- Shioi, Y., Tamai, H. et Sasa, T. Effects of copper on photosynthetic electron transport systems in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol. 1978, 19, 203-209.
- Sinclair, J. Changes in spinach thylakoid activity due to nitrite ions. Photosynth. Res. 1987, 12, 255-263.
- Spiller, H., et Boger, P. Photosynthetic nitrite reduction by dithioerythritol and the effect of nitrite on electron transport in isolated chloroplasts. Photochem. Photobiol. 1977, 26, 397-402.

- Steinback, K.E., McIntosh, L., Bogorad, L., et Arntzen, C.J.
Identification of the triazine receptor protein as a
chloroplast gene product. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.
1981a, 78, 7463-7467.
- Tae, G.S., Blake, M.T., Cramer, W.A., Vallon, O., et
Bogorad, L. Thylakoid membrane protein topography
transmembrane orientation of the chloroplast cytochrome
b-559 psbE gene product. Biochemistry, 1988, 27, 9075
-9080.
- Tamura, N., Ikeuchi, M., et Inoué, Y. Assignment of
histidine residues in D1 protein as possible ligands for
functional manganese in photosynthetic water-oxidizing
complex. Biochim. Biophys. Acta. 1989, 973, 281-289.
- Thomasset, B., Barbotin, J.-N., Thomas, D., Thomasset, T.,
Vejux, A. et Jeanfils, J. Fluorescence and photoacoustic
spectroscopy of immobilized thylakoids. Biotechnol.
Bioeng. 1983, 25, 2453-2468.
- Tischer, W., et Strotmann, H. Relationship between
inhibitor binding by chloroplasts and inhibition of
photosynthetic electron transport. Biochim. Biophys.
Acta. 1977, 460, 113-125.

Trebst, A. The tree-dimensional structure of the herbicide binding niche on the reaction center polypeptides of photosystem II. Z. Naturforsch., 1987, 42c, 742-750.

Tripathy, B.C., et Mohanty, P. Zinc-inhibited electron transport of photosynthesis in isolated barley chloroplasts. Plant Physiol. 1980, 66, 1174-1178.

Tsujimoto, H.Y. et Arnon, D.I. Differential inhibition by plastoquinone analogues of photoreduction of cytochrome b-559 in chloroplasts. FEBS Lett. 1985, 179, 51-54.

Vallon, O., Tae, G.-S., Cramer, W.A., Simpson, D., Hoyer-Hansen, G., et Bogorad, L. Visualisation of antibody binding to the photosynthetic membrane: the transmembrane orientation of cytochrome b-559. Biochem. Biophys. Acta. 1989, 975, 132-141.

Van Duijvendijk-Matteoli, M.A., et Desmet, G.M. On the inhibitory action of cadmium on the donor site of photosystem II in isolated chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta. 1975, 408, 164-169.

- Vasil'ev, I.R., Matorin, D.N., Lyadsky V.V., Venediktov, P.S. Multiple action sites for photosystem II herbicides as revealed by delayed fluorescence. Photosynth. Res. 1988a, 15, 33-39.
- Vasil'ev, I.R., Il, L.D., Matorin, D.N., Venediktov, P.S. Multiple action sites for herbicides that inhibit photosystem II of green plants. Sov. Plant Physiol. 1988b, 35, 694-702.
- Velthuys, B., Amez, J. Charge accumulation at the reducing side of system II of photosynthesis. Biochim. Biophys. Acta. 1974, 333, 85-94.
- Velthuys, B.R. Electron-dependent competition between plastoquinone and inhibitors for binding to photosystem II. FEBS Lett. 1981, 126, 277-281.
- Velthuys, B.R. in Fonctions of quinones in energy conserving systems (B.L. Trumpower, ed.) Academic Press, New York 1982, 401-408.

Vermaas, W.F.J., Arntzen, C.J., Gu, L.-Q., et Yu, C.-A.

Interaction of herbicides and azidoquinones at the photosystem II binding site in the thylakoid membrane.

Biochim. Biophys. Acta. 1983, 723, 266-275.

Vermaas, W.F.J., Dohnt, G., et Renger, G. Binding and

release kinetics of inhibitors of Q_A^- oxidation in

thylakoid membranes. Biochim. Biophys. Acta. 1984, 765,

74-83.

Vermaas, W.F.J., Renger, G., Arntzen, C.J. Herbicide/quinone

binding interactions in photosystem II. Z. Naturforsch.,

1984, 39c, 368-373.

Vernon, L.P., et Shaw, E.R. Oxidation of 1,5

-diphenylcarbazide as a measure of photosystem 2 activity

in subchloroplast fragments. Biochem. Biophys. Res. Comm.

1969, 36, 878-884.

Völker, M., Renger, G. et Rutherford, A.W. Effects of

trypsin upon EPR signals arising from components of the

donnor side of photosystem II. Biochim. Biophys. Acta.

1986, 851, 424-430.

Whitford, D., Gounaris, K. et Barber, J. in Advances in photosynthesis Research, Vol. 1 (Martinus Nijhoff and W. Junk, pub.). 1984, 497-500.

Whitmarsh, J., et Cramer, W.A. Kinetics of the photoreduction of cytochrome b-559 by photosystem II in chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta. 1977, 460, 280-289.

Whitmarsh, J., et Cramer, W.A. A pathway for the reduction of cytochrome b-559 by photosystem II in chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta. 1978, 501, 83-93.

Whitmarsh, J., et Ort, D.R. Stoichiometry of electron transport complexes in spinach chloroplasts. Arch. Biochem. Biophys. 1984, 231, 378-389.

Widger, W.R., Cramer, W.A., Hermodson, M., Meyer, D. et gullifor, M. Purification and partial sequence of the chloroplast cytochrome b-559. J. Biol. Chem. 1984, 259, 3870-3876.

- Widger, W.R., Cramer, W.A., Hermodson, M. et Herrmann, R.G.
Evidence for a hetero-oligomeric structure of the
chloroplast cytochrome b-559. FEBS Lett. 1985, 191, 186-
190.
- Wikstrom, M.K.F., et Berden, J.A. Energy-linked charge in
the redox state and absorption spectrum of cytochrome a
in situ. Biochim. Biophys. Acta. 1972, 283, 403-420.
- Wolber, P.K., et Steinback, K.E. Identification of the
herbicide binding region of the Q_b-protein by
photoaffinity labeling with azidoatrazine. Z.
Nathuforsch. 1984, 39c, 425-429.
- Wolber, P.K., Eilmann, M. et Steinback, K.E. Mapping of the
triazine binding site to a highly conserved region of the
Q_b-protein. Arch. Biochem. Biophys. 1986, 248, 224-233.
- Wraight, C. Electron acceptors of photosynthetic bacterial
reaction centers. Direct observation of oscillatory
behavior suggesting two closely equivalent ubiquinones.
Biochim. Biophys. Acta. 1977, 459, 250-256.

- Wraight, C.A. Oxidation-reduction physical chemistry of the acceptor-quinone complex in bacterial photosynthetic reaction centers: evidence for a new model of herbicide activity. Isr. J. chem. 1981, 21, 348-354.
- Yagi, T., et Hisada, R. Effects of some derivatives of 5-methylphenazinium methyl sulfate on photoanodic current produced by chloroplast electrodes. J. Appl. Biochem. 1982, 4, 411-417.
- Yamada, Y., Tang, X.-S., Itho, S. et Satoh, K. Purification and properties of an oxygen-evolving photosystem II reaction-center complex from spinach. Biochem. Biophys. Acta. 1987, 891, 129-137.
- Yamagishi, A., et Fork, D.C. Photoreduction of Q_A , Q_B , and cytochrome b-559 in an oxygen-evolving photosystem II preparation from the thermophilic Cyanobacterium *synechococcus* sp. Arch. Biochem. Biophys. 1987, 259, 124-130.
- Zielinski, R.E., et Price, C.A. Synthesis of thylakoid membrane proteins by chloroplasts isolated from spinach. Cytochrome b-559 and P700-chlorophyll a-protein. J. Cell Biol. 1980, 85, 435-445.