

N° D'ORDRE : 02/2004-E/S.N

UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE  
HOUARI BOUMEDIENNE  
USTHB/ALGER

FACULTE des SCIENCES BIOLOGIQUES

THESE

Présentée Pour l'obtention

du Diplôme de Docteur es Sciences Naturelles  
Spécialité : Physiologie Végétale

Par : Mme Ouzna ABROUS-BELBACHIR

SUJET :

**Contribution à l'étude du métabolisme lipidique des feuilles de soja *Glycine max* L. par une approche multidisciplinaire : effets d'un herbicide le Norflurazon.**

Soutenue le **18 Juillet 2004** devant le jury composé de :

<b>Mr G. Ayad</b>	Pr FSB/USTHB	Président
<b>Mme G. BENHASSAINE-KESRI</b>	Pr FSB/USTHB	Directeur de thèse
<b>Mr A TREMOLIERES</b>	Dr de Rech. CNRS Orsay	Codirecteur de thèse
<b>Mme F. AID</b>	Pr FSB/USTHB	Examineur
<b>Mr A. CHERIF</b>	Pr Université de Tunis	Examineur
<b>Mme R. De PAEPE</b>	Dr de Rech. CNRS Orsay	Examineur
<b>Mr J. JOYARD</b>	Dr de Rech. CNRS Grenoble	Examineur

## Avant propos

*Le présent travail a été initié au laboratoire de physiologie végétale de la faculté des Sciences Biologiques (FSB-USTHB). Les analyses des lipides et des espèces moléculaires ont été faites au laboratoire de physiologie Cellulaire et Moléculaire de l'Université P. et M. Curie (Paris VI) dirigé par Mrs le Professeur P. Mazliak et Mr J.C. Kader que je remercie vivement et à l'Institut de Biotechnologie des Plantes (Paris Sud) sous la direction de Mr A. Trémolières que je ne remercierais jamais assez pour toute l'aide qu'il m'a apportée pour mener à terme ce travail*

*La Partie Biologie Moléculaire a été réalisée à l'Institut de Biotechnologie des Plantes (Paris Sud) sous la direction de Madame R. De Paepe que je tiens à remercier très sincèrement.*

*Je remercie vivement madame le professeur G. Benhassaine Kesri pour la confiance qu'elle m'a accordée, son soutien, ses incessants encouragements, sa disponibilité à mon égard et pour les heures de lecture et de correction de ce manuscrit.*

*Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Monsieur A. Trémolières Directeur de recherches au CNRS, qui m'a toujours gentiment accueillie et conseillée dans le domaine des lipides végétaux. Durant mes différents stages j'ai pu apprécier son remarquable enthousiasme scientifique mais aussi ses grandes qualités humaines*

*Monsieur le professeur G. Ayad me fait l'honneur de présider ce jury, il m'a toujours encouragée, je lui adresse mes sincères remerciements.*

*Je suis très reconnaissante à Madame le professeur F. Aid qui a toujours répondu patiemment à mes nombreuses questions, qui a toujours suivi de près mon travail. Je tiens à lui exprimer mes sincères remerciements pour tous ses conseils et pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Je tiens à remercier du fond du cœur Madame R. De Pape qui m'a accueillie dans son équipe, m'a initiée aux techniques de biologie moléculaire et m'a permis de profiter de son expérience avec beaucoup de patience. Je lui exprime toute ma gratitude pour toute son aide, tous ses conseils et pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Je suis très honorée que Monsieur J. Joyard directeur de Recherche au CNRS, malgré ses nombreuses occupations, accepte de juger ce travail, il a fait partie de mon jury de thèse de magister il y a longtemps de cela, il a toujours répondu avec gentillesse à mes questions ; qu'il soit vivement et sincèrement remercié.*

*Je remercie Monsieur le Professeur A. Chérif pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger ce travail*

*Je remercie tous les membres du laboratoire de physiologie végétale de la FSB-USTHB, Réda pour son amitié sa disponibilité et ses qualités humaines, Aicha avec qui j'ai partagé pas mal de moments difficiles et à qui je souhaite un bon courage pour la finition de sa thèse, Fatima pour son amitié et ses encouragements incessants, Ghani qui nous manque beaucoup, Linda, Karima, Zahia, Mahfoud, Ali, Nedjma, Dinar, Nassima et Souhila.*

*Je remercie également vivement tous les membres de l'équipe de Mme De Paepe et de Monsieur A. Trémolières pour leur aide technique et Scientifique et leur gentillesse : Chantal Mathieu qui avec patience et bonne humeur m'a aidée dans les manipulations de Biologie moléculaire qu'elle soit également remerciée pour ses qualités humaines.*

*Catherine Gerard Hirne qui est toujours prête à rendre service et qui en plus de son travail s'est toujours occupée de la partie administrative au cours de nos stages qu'elle en soit vivement remerciée. Philippe Chetrit qui a toujours répondu avec gentillesse et patience à mes questions qu'il soit sincèrement remercié. Annick Bennardo Connan qui m'a aidée dans l'analyse des lipides par PhosphorImager. Mr Roland Boyer pour les photographies qu'il a réalisées pour moi. Messieurs Gilles Santé et Jean Paul Bares qui ont si gentiment réalisé les cultures de soja en serre.*

*Je voudrais adresser mes sincères remerciements à Marie Garmier pour sa gentillesse et sa disponibilité, à Madame Marie Henriette Trémolières, Monsieur Thil De Paepe, Monsieur et Madame Berreur qui nous ont toujours chaleureusement accueillis, Mr Bernard Pineau, pour sa gentillesse et sa disponibilité, Mr Guy Dubertret, Melle Christelle Dutilleul, Pierrick Priault, Adnane Boualem et Guillaume Duval tous très gentils et très serviables.*

*Je remercie particulièrement et chaleureusement Marcel Bois, Leila et Yasmina pour leur amitié sincère, leur soutien dans les moments difficiles et leurs continuels encouragements.*

*Je m'excuse auprès de toutes les personnes omises involontairement les priant d'accepter mes remerciements et de comprendre qu'il est difficile de n'oublier personne.*

*Je termine en disant un grand merci à tous les membres de ma famille qui m'ont toujours soutenue et encouragée en priant de tout cœur mes enfants Lyes, Lamia et Rabah-Aghiles (Bibouh) de m'excuser de les avoir quelque peu négligés.*

## **Publication et communications tirées de ce travail**

### **Publication**

**Abrous O.**, Benhassaine-Kesri G., Trémolières A. et Mazliak P., 1998- Effect of norflurazon on lipid metabolism in soya seedlings. *Phytochemistry*, **49** (4), 979-985.

### **Communications Internationales**

**Abrous O.**, Belkebir A. et Kesri-Benhassaine G., 1996. Effets du norflurazon sur le métabolisme lipidique des plantules de soja *Glycine max* L. 26<sup>ième</sup> Congrès du Groupe Français des Pesticides. Nancy France.

**Abrous O.**, Aïd F. et Kesri-Benhassaine G., 1997. Effets d'un herbicide le norflurazon sur la composition lipidique des feuilles de plantules de soja *Glycine max* L. Second Colloque Maghrébin sur la Biologie et l'environnement. Annaba.

**Abrous O.**, Kesri- Benhassaine G., Aid F., De Paepe R. et Trémolières A., 2001. Effet du Norflurazon sur la désaturation des lipides polaires des feuilles de plantules de soja *Glycine max* L. Colloque de la Société Française de Physiologie Végétale (SFPV) : Lipides des Plantes et Oxylipines. Juillet 2001 Strasbourg -France.

**Abrous O.**, Belkebir A., Aïd F. et Kesri-Benhassaine G., 2003. Mode d'action de deux herbicides le norflurazon et la séthoxydime sur le métabolisme lipidique. 1<sup>ier</sup> Salon international des produits phytosanitaires et du matériel végétal. Semences et plantes. Organisation Euro-méditerranéenne pour la protection des plantes. ALGER

### **Communications nationales**

**Abrous O.** et Kesri G., 1994. Effets d'un pyridazinone substitué : le norflurazon sur le métabolisme lipidique des plantules de soja. Journées de l'URBFA. Biologie Cellulaire et Moléculaire, Juin 1994 USTHB.

**Abrous O.**, Belkebir A. et Kesri G., 1994. Modes d'action de certains herbicides sur le métabolisme cellulaire. Journées de l'URBFA. Biologie Cellulaire et Moléculaire, Juin 1994 USTHB.

**Abrous O.** et Kesri G., 1996 : Effets du norflurazon sur la morphologie et la physiologie des plantules de soja. 4<sup>èmes</sup> Journées de l'URBFA. Mars 1996 USTHB.

**Abrous O.** , Belkebir A. et Aid F. 1998 - Effet d'un herbicide pyridazinone : le norflurazon sur la physiologie d'un végétal : le soja *Glycine max* L. 2<sup>èmes</sup> journées d'analyses physico-chimiques 8-9 Décembre 1998 ALGER.

**Abrous O.** , Belkebir A. Khelifa N. et Aid F. 2001. Impact de quelques herbicides sur les plantes cultivées. 4<sup>èmes</sup> Journées Scientifiques et Techniques Phytosanitaires. Novembre 2001 INPV. El Harrach Alger.

# **Abréviations**

## ABREVIATIONS

ACCase	AcétylCoA carboxylase
ACP	Acyl carrier protein (protéine transporteur d'acyl)
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN copie
AGS	Acide gras synthétase
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
CDP-choline	Cytidine diphosphocholine
CMP	Cytidine monophosphate
Ci	Curie
CoA	CoenzymeA forme oxydée
CoASH	CoenzymeA (forme réduite)
C <sub>16:0</sub>	Acide palmitique ou acide hexadécanoïque
C <sub>16:1c</sub>	Acide cis hexadécénoïque
C <sub>16:1t</sub>	Acide trans hexadécénoïque
C <sub>17:0</sub>	Acide heptadécanoïque
C <sub>18:0</sub>	Acide stéarique ou acide octadécanoïque
C <sub>18:1Δ9</sub>	Acide oléique ou acide cis- $\Delta_9$ octadécénoïque
C <sub>18:2 Δ9-12</sub>	Acide linoléique ou acide cis- $\Delta_9-12$ octadécadiénoïque
C <sub>18:1Δ9-12-15</sub>	Acide linoléique ou acide cis- $\Delta_9-12-15$ octadécatriénoïque
CytP <sub>450</sub>	CytochromeP <sub>450</sub>
DAG	Diacylglycérol
°C	Degré Celsius
DGDG	Digalactosyldiacylglycérol
DNTP	2'- désoxynucléotide 5'- triphosphate
DHAP	Dihydroxyacétone phosphate
DO	Densité optique
E	Essai (Plantules traitées par le norflurazon)
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
Fab	Fatty acid biosynthesis ou biosynthèse des acides gras
Fad	Fatty acid desaturase ou acide gras désaturase
G	Gramme
Kb	Kilobases
Kda	Kilodaltons
LHC	Complexe protéines-pigments de l'antenne collectrice d'énergie (Light harvesting complex)
LysoPC	Lysophosphatidylcholine
M	Molaire
MGDG	Monogalactosyldiacylglycérol

ml	Millilitre
$\mu$ ( $\mu$ l, $\mu$ g, $\mu$ M)	Microlitre, microgramme, micromolaire
Mol. (nmol., $\mu$ mol., pmol.)	moles, nanomoles, micromoles, picomoles
MOPS	Acide 4 N morpholino propane sulfonique
MVF	Matière végétale fraîche
NAD (P)	Nicotine amide adénine dinucléotide(phosphate) (forme oxydée)
NAD(P)H+H <sup>+</sup>	Nicotine amide adénine dinucléotide (phosphate) (forme réduite)
nm	Nanomètre
%	Pour cent
PA	Acide phosphatidique
PC	Phosphatidylcholine
PCR	Polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
PE	Phosphatidyléthanolamine
PEG	Polyéthylène glycol
PEP	Phosphoénolpyruvate
PG	Phosphatidylglycérol
PI	Phosphatidylinositol
PSII	Photosystème II
PVP	Polyvinyl pyrrolidone
Rpm	Rotation par minute
SAB	Sérum albumine bovine
San	Sandoz
SDS	Sodium dodécyl sulfate
Sn	Stereospecific numbering
Sn-1	Position 1 du glycérol
Sn-2	Position 2 du glycérol
SSC	Standard salin citrate
SQDG	Sulfoquinovosyldiacylglycérol
T	Témoin
TAG	Triacylglycérol
Tris	Tris-(hydroxyméthyl)aminométhane
UDP galactose	Uridine diphosphogalactose
UDP sulfoquinovose	Urididine diphosphosulfoquinovose
UV	Ultra violet

# **Sommaire**

# Sommaire

	pages
<b>Introduction</b>	1
<b>Synthèse Bibliographique</b>	
<b>1- Les lipides des végétaux</b>	3
<b>2- Biosynthèse des lipides chez les végétaux</b>	5
<b>2.1 - Biosynthèse des acides gras</b>	5
<b>2.2 - Biosynthèse des glycérolipides par la voie procaryote</b>	7
2.2.1- Formation du PA de type procaryote	7
2.2.2- Biosynthèse du PG chloroplastique	8
2.2.3- Formation des DAG	8
2.2.4- Biosynthèse des galactolipides	9
2.2.5- Biosynthèse du SQDG	12
<b>2.3- Biosynthèse des glycérolipides par la voie eucaryote</b>	13
2.3.1- Biosynthèse du PA eucaryote	13
2.3.2- Biosynthèse des phospholipides extrachloroplastiques	14
2.3.3- Biosynthèse des glycolipides	14
<b>2.4 - Désaturation des acides gras chez les végétaux supérieurs</b>	15
2.4.1- Sites et substrats de désaturation	17
2.4.2- Désaturases chloroplastiques	20
2.4.3- Désaturases extrachloroplastiques	22
2.4.4.- Flux des acides gras entre les compartiments chloroplastique et extrachloroplastique	24
2.4.5 - Autres désaturases	25
2.4.6 - Rôle des acides gras insaturés	25
<b>25 - Molécules signal dérivées des lipides</b>	26
2.5.1 - Signalisation lipidique	26
2.5.2 - Synthèse de l'acide jasmonique à partir du C18 :3	26
<b>3- Les herbicides</b>	27
3.1- Action des herbicides au niveau cellulaire	29
3.2- Les pyridazinones	29
3.2.1- Modes d'action des pyridazinones	30
3.2.2- Action des pyridazinones sur la biosynthèse des caroténoïdes	31
3.2.3- Action des pyridazinones sur le métabolisme lipidique	34
<b>Matériel et Méthodes</b>	
<b>1- Herbicide et matériel végétal utilisés</b>	37
1.1- herbicide utilisé	37
1.2- Matériel végétal	37
1.2.1 - Origine des graines et mise en culture	37
1.2.2 - Mode de traitement	38

<b>2- Techniques expérimentales</b>	38
<b>2.1- Obtention de la fraction microsomale</b>	38
<b>2.2- Utilisation des précurseurs radioactifs des lipides</b>	39
2.2.1 - Choix des précurseurs	39
2.2.2- Marquage <i>in vivo</i> des lipides des feuilles de soja	39
<b>2.3 - Extraction des lipides</b>	39
2.3.1 - A partir des feuilles	39
2.3.2 - A partir des espèces moléculaires	40
<b>2.4 - Analyse des lipides</b>	40
2.4.1 - Séparation des catégories lipidiques	40
2.4.1.1- Par chromatographie sur couche mince	40
2.4.1.2 - Par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	40
2.4.2 - Séparation des espèces moléculaires des catégories lipidiques	41
2.4.3 - Méthylation des acides gras	41
<b>2.5 - Analyse des esters méthyliques des acides gras par chromatograp en phase gazeuse</b>	42
<b>2.6 - Mesure de la Radioactivité</b>	43
2.6.1 - au niveau de la fraction lipidique totale	43
2.6.2 - Au niveau des classes lipidiques	43
2.6.3 - Au niveau des esters méthyliques des acides gras radioactifs	43
<b>2.7 – Mesure d’activités enzymatiques « <i>in vitro</i> »</b>	44
2.7.1 – Activité CDP Choline Phosphotransférase	44
2.7.2 - Activité lysoPC acyl transférase	44
<b>2.8 - Extraction et dosage des pigments foliaires : caroténoïdes et chlorophylles</b>	<b>45</b>
<b>2.9 - Dosage des protéines</b>	<b>45</b>
<b>2.10- Expression des résultats</b>	45
<b>2.11 – Etude de l’expression des gènes <i>FAD7</i> et <i>FAD3</i> des feuilles de soja</b>	46
2.11.1 - Extraction de l’ADN total de feuilles de soja	47
2.11.2 - Extraction des ARNs foliaires	47
<b>2.11.2.1- Analyse des ARNs totaux par Northern Blot</b>	48
2.11.3 - Amplification par PCR des gènes <i>FAD3</i> et <i>FAD7</i> de soja	49
2.11.3.1- Extraction de l’ADN du gel d’agarose : Kit QIAEX II	50
2.11.4 – Clonage des fragments PCR	51
2.11.4.1- Vecteur de clonage	51
2.11.4.2- Ligation	52
2.11.4.3 - Transformation des bactéries	52



## **Chapitre 2- Effet du norflurazon sur les plantules de soja : morphologie, pigments photosynthétiques et lipides**

1 – Effet sur la morphologie des plantules de soja	83
2 – Effet sur la teneur en pigments foliaires	84
2.1 – Au niveau de la feuille I	84
2.2 – Au niveau de la feuille II	84
3 – Effet sur la composition en lipides	86
3.1 – Teneur en lipides totaux	86
3.2 – Teneur et Composition en acides gras des lipides totaux	86
3.3- Teneur et composition en classes lipidiques	87
3.3.1 – Lipides des membranes chloroplastiques	87
3.3.2 – Lipides des membranes extrachloroplastiques	88
3.4 – Teneur en acides gras des classes lipidiques	89
3.5 – composition en acides gras et en espèces moléculaires des différentes classes lipidiques	91
3.5.1 – Composition en acides gras des lipides des membranes chloroplastiques	91
3.5.2 – Espèces moléculaires des lipides des membranes chloroplastiques	92
3.5.3 - Composition en acides gras des lipides des membranes extrachloroplastiques	94
3.5.4 - Espèces moléculaires des lipides des membranes extrachloroplastiques	95
<b>Discussion</b>	97

## **Chapitre 3 – Effet du norflurazon sur la biosynthèse des lipides foliaires du soja**

1 – Effet sur l'incorporation du [1- <sup>14</sup> C] acétate dans les lipides foliaires du soja	101
2 - Effet sur l'incorporation du [1- <sup>14</sup> C] acétate dans les acides gras des lipides foliaires	101
3 - Effet sur l'incorporation du [1- <sup>14</sup> C] acétate dans les lipides polaires et les lipides neutres	102
4 - Effet sur l'incorporation du [1- <sup>14</sup> C] acétate dans les lipides des membranes chloroplastiques	103
5 - Effet sur l'incorporation du [1- <sup>14</sup> C] acétate dans les lipides des membranes extrachloroplastiques	104
6 - Effet sur l'incorporation du [1- <sup>14</sup> C] acétate dans les acides gras des lipides des membranes chloroplastiques	106
6.1 - Acides gras du MGDG	106
6.2 – Effet sur la biosynthèse des espèces moléculaires du MGDG	107
6.3 - Acides gras du DGDG	107
6.4 - Acides gras du PG	108
7 - Effet sur l'incorporation du [1- <sup>14</sup> C] acétate dans les acides gras des lipides des membranes extrachloroplastiques	109

7.1 – Acides gras de PC	109
7.2 – Effet sur la biosynthèse des espèces moléculaires de PC	110
7.3 – Acides gras de PE	110
<b>Discussion</b>	111

#### **Chapitre 4 : Effet du norflurazon sur la désaturation *in vivo* des lipides foliaires du soja**

1 – Effet sur l'acylation du [1- <sup>14</sup> C] oléate dans les lipides foliaires du soja	114
2 – Effet sur l'incorporation du [1- <sup>14</sup> C] oléate dans les acides gras des lipides foliaires du soja	114
3 – Effet sur l'incorporation du [1- <sup>14</sup> C] oléate dans les lipides polaires des feuilles de soja	115
4 – Effet sur la désaturation du [1- <sup>14</sup> C] oléate dans les PC et MGDG	117
4.1 - Acides gras de PC	117
4.2 – Espèces moléculaires de PC	118
4.3 - Acides gras du MGDG	119
4.4 – Espèces moléculaires du MGDG	120
<b>Discussion</b>	120

#### **Chapitre 5 : Effet du norflurazon sur l'activité *in vitro* de deux enzymes liées à la synthèse de PC**

1 - Activité <i>in vitro</i> de la CDP-choline Phosphotransférase	123
2 - Activité <i>in vitro</i> de la lysoPC acyltransférase	123

#### **Chapitre 6 : Effet du norflurazon sur l'expression des gènes *FAD3* et *FAD7* des feuilles de soja**

1 – Séquençage des fragments amplifiés des gènes <i>FAD3</i> et <i>FAD7</i> des feuilles de soja	126
2 – Effet du norflurazon sur les ARNs des feuilles de soja	128
3 – Effet du norflurazon sur l'expression des gènes <i>FAD7</i> et <i>FAD3</i> des feuilles de soja	129
3.1 - Expression du gène <i>FAD7</i>	129
3.2 - Expression du gène <i>FAD3</i>	129
<b>Discussion</b>	130

<b>Discussion générale.</b>	134
-----------------------------	-----

Conclusion générale	140
---------------------	-----

Références bibliographiques	142
-----------------------------	-----

#### **Annexes**

# **Introduction**

Les lipides sont des composants essentiels de tous les organismes vivants : les glycérolipides en tant que constituants des membranes cellulaires occupent une place importante dans le monde végétal : ils intéressent la recherche fondamentale dans divers domaines (photosynthèse, respiration, systèmes de transport et de signalisation cellulaire) ; en tant que réserves nutritives, ils intéressent les secteurs agro-alimentaires et agro-industriels.

Chez les végétaux, les lipides membranaires jouent un rôle important dans les processus de tolérance à différents stress biotiques tels l'attaque par les pathogènes (Wallis et Browse, 2002), ou abiotiques (Gibson et *al.*, 1994) tels le stress thermique (Routaboul et *al.*, 2000), le déficit hydrique (Monteiro de Paula et *al.*, 1990), le stress salin (Sakamoto et Murata, 2002) et le stress chimique (herbicides) (Dalla Vecchia et *al.*, 2001).

Les herbicides sont des substances chimiques qui constituent un outil très intéressant pouvant être utilisé tant dans le domaine appliqué (l'agriculture moderne dépend de l'utilisation intensive des herbicides) que dans le domaine d'études fondamentales.

En agriculture, les herbicides sont utilisés pour détruire les adventices (souvent qualifiées de mauvaises herbes) ou limiter leur croissance afin d'améliorer le rendement agricole.

L'application des herbicides sur le terrain vise à obtenir un « bon résultat » ; celui-ci se traduit par une bonne efficacité herbicide c'est à dire pour une culture donnée par une destruction la plus complète possible des plantes indésirables, le plus rapidement possible et le plus durablement possible sans que la culture n'ait à souffrir de l'herbicide.

A l'exception de quelques produits étroitement sélectifs, les herbicides sont rarement totalement inoffensifs pour les cultures. Leur utilisation n'est possible qu'en jouant sur les stades de développement des cultures, leur vigueur mais surtout sur les doses de l'herbicide : le sous dosage risquant d'être inefficace pour la plante nuisible et le surdosage dangereux pour la culture.

Dans le domaine d'études fondamentales, les herbicides sont de plus en plus utilisés dans les laboratoires en vue d'un approfondissement de certains métabolismes cellulaires ou d'une meilleure connaissance de leur fonctionnement. En effet la compréhension du mode d'action des herbicides représente un élément dans la recherche du métabolisme des plantes ce qui a facilité leur application dans différentes pratiques agricoles.

Parmi les herbicides les plus utilisés, figure le norflurazon (4 chloro 5 méthyl amino 2  $\alpha$ ,  $\alpha$ ,  $\alpha$  trifluoro méthyl phényl 3 (-2H) pyridazinone) connu pour être un puissant inhibiteur de la phytoène désaturase ( Sandmann et *al.*, 1989), enzyme clef dans la biosynthèse des caroténoïdes permettant la désaturation du phytoène en phytolfluène.

Le soja *Glycine max* L. est une plante protéo-oléagineuse, elle a été décrite comme une plante intéressante à introduire en Algérie pour ses intérêts économiques multiples: alimentation humaine, alimentation du bétail et industrie chimique et pharmaceutique.

Parallèlement aux études effectuées sur le terrain sur cette plante, (rendement, conditions culturales), notre laboratoire s'est intéressé à certains aspects fondamentaux tels son comportement vis à vis de différents stress : hydrique, salin, thermique et chimique (herbicides et insecticides).

Le soja fait partie des plantes de type C<sub>18:3</sub> dont la synthèse des lipides chloroplastiques (galactolipides) est réalisée par la voie coopérative faisant appel à deux compartiments cellulaires : le réticulum endoplasmique et le chloroplaste.

Alors que la synthèse des lipides membranaires est en partie élucidée, la synthèse des acides gras insaturés (linoléate et surtout linoléate) qui les composent présente encore des zones d'ombre.

L'utilisation des herbicides constitue une approche adoptée dans l'étude du système de désaturation des acides gras.

La désaturation des acides gras est dans son ensemble une réaction de déshydrogénation extrêmement similaire à la déshydrogénation du phytoène en phytofluène inhibée par le norflurazon (Wilkinson, 1985).

Il est possible que le norflurazon en plus de son effet sur la phytoène désaturase enzyme située sur la membrane interne des chloroplastes (Joyard et al., 1998), puisse avoir un effet inhibiteur sur les désaturases liées aux lipides chloroplastiques dont deux ( $\omega^6$  et  $\omega^3$  désaturases) ont été identifiées par Ferro et al., (2003) au niveau de la membrane interne de l'enveloppe des chloroplastes d'arabidopsis.

Ce travail se veut donc une contribution à l'étude de la biosynthèse des acides gras polyinsaturés des végétaux mettant à profit les progrès réalisés ces dernières années dans l'étude du métabolisme des lipides.

Nous avons d'abord procédé à l'analyse des lipides des feuilles de soja puis à la séparation des espèces moléculaires des phospholipides et des galactolipides.

Nous avons suivi la biosynthèse *in vivo* des lipides à partir du [1-<sup>14</sup>C] acétate et *in vitro* en étudiant les activités CDP choline phosphotransférase et LysoPC phosphotransférase.

Nous avons tenté de préciser les substrats de désaturation des acides gras dans les feuilles en suivant par des marquages à l'aide du [1-<sup>14</sup>C] oléate le devenir de diverses espèces moléculaires de la phosphatidylcholine et du monogalactosyl-diacylglycérol.

Nous avons également étudié l'expression des gènes *FAD7* et *FAD3* codant respectivement pour la  $\omega_3$  désaturase chloroplastique et la  $\Delta^{15}$  désaturase cytosolique permettant la formation de l'acide linoléique. Ces études ont été conduites parallèlement sur les plantules de soja témoins et les plantules traitées par le norflurazon.

# **Synthèse Bibliographique**

## 1 - Les lipides des végétaux

Les cellules végétales ont une composition lipidique très distincte selon qu'il s'agit des membranes des compartiments extrachloroplastiques ou des compartiments chloroplastiques ou plus généralement des plastes si l'on considère les tissus non photosynthétiques.

Dans les membranes extraplastidiales, les lipides polaires sont essentiellement représentés par des phospholipides. Les deux phospholipides majoritaires sont la phosphatidylcholine (ou PC) et la phosphatidyléthanolamine (ou PE) qui sont retrouvés en proportions élevées dans la membrane cytoplasmique ainsi que dans les membranes du réticulum endoplasmique, du golgi, du peroxyosome, du glyoxysome et de la vacuole.

Ces deux phospholipides sont également les lipides majeurs des membranes de l'enveloppe nucléaire et des deux membranes mitochondriales.

La phosphatidylcholine est un constituant mineur des membranes plastidiales ; des proportions de 30 à 35% ont été signalées du côté cytosolique de la membrane externe de l'enveloppe des chloroplastes (Dorne et *al.*, 1985).

Toutes les membranes extrachloroplastiques contiennent de faibles proportions de phosphatidyl inositol ou PI.

Enfin la membrane mitochondriale interne des cellules végétales à l'instar de celle des cellules animales ou des levures, contient du diphosphatidylglycérol (DPG) ou cardiolipide, phospholipide qui lui est spécifique.

Au niveau des membranes plastidiales, quatre types de lipides (les mêmes que ceux décrits chez les cyanobactéries) sont retrouvés. Il s'agit des galactolipides : monogalactosyldiacylglycérol (ou MGDG), du digalactosyl-diacylglycérol (ou DGDG), d'un glucosulfolipide le sulfoquinovosyl-diacylglycérol (ou SQDG) et d'un phospholipide le phosphatidylglycérol (ou PG).

Les galactolipides constituent la classe majeure des glycolipides des plantes supérieures, ils sont spécifiques des membranes plastidiales au niveau desquelles ils représentent 80% des lipides totaux.

Le MGDG, lipide le plus abondant dans la nature (Gounaris et Barber, 1983), est le lipide essentiel des thylakoides, alors que le DGDG est le lipide prédominant de l'enveloppe des plastes (Joyard et *al.*, 1991).

Les galactolipides et plus particulièrement le MGDG ont pour particularité d'être enrichis en acides gras polyinsaturés : plus de 80% des acides gras chloroplastiques sont triénoïques, correspondant surtout à l'acide  $\alpha$  linoléique. Ces acides gras insaturés jouent un rôle important dans la fluidité des membranes photosynthétiques, dans leur stabilité thermique (Routaboul et *al.*, 2000) et dans le maintien de la fonction photosynthétique (Wallis et Browse, 2002).

Le MGDG chez les plantes supérieures consiste en deux types d'espèces moléculaires (Heinz, 1977). La première (18 :3/18 :3) majoritaire présente du 18 :3 aussi bien en position sn1 qu'en position sn2 du squelette glycérol. Cette

structure (de même que 16 :0/18 :3) est typique des lipides de type eucaryote tels la phosphatidylcholine.

Le deuxième type d'espèces moléculaires présente du 18 :3 en position sn-1 du glycérol et du 16 :3 exclusivement en position sn2 du glycérol (18 :3/16 :3). Cette structure est similaire à celle des glycérolipides des cyanobactéries et est appelée procaryote (Roughan et Slack, 1984 ; Wada et Murata, 1998).

Pratiquement toutes les plantes étudiées contiennent du MGDG ayant la structure eucaryotique : certaines plantes telles le pois, le soja, le haricot, le concombre, ne contiennent que du MGDG 18 :3/18 :3 : elles sont appelées plantes en C<sub>18:3</sub>.

D'autres telles l'épinard, l'arabidopsis, le colza, le tabac contiennent à la fois du MGDG 18 :3/18 :3 mais aussi du MGDG 18 :3/16 :3 ; elles sont appelées plantes en C<sub>16:3</sub> ; celles ci possèdent une voie plastidiale leur permettant de désaturer l'acide palmitique (C16 :0) en acide hexadécatriénoïque (C16 :3).

De ce fait, différentes espèces moléculaires de galactolipides (18(16)/18 ou 18/16) peuvent être présentes dans les membranes plastidiales. Les proportions de ces deux types d'espèces moléculaires du MGDG varient selon les plantes.

La proportion des espèces moléculaires eucaryotes ou procaryotes n'est pas la même pour tous les glycolipides d'une même plante : chez l'épinard, bien que la moitié du MGDG est de type procaryotique, seulement 10 à 15% du DGDG l'est (Bishop et *al.*, 1985).

Le SQDG est largement représenté chez les bactéries photosynthétiques et les cyanobactéries alors qu'il ne se trouve qu'en faibles proportions chez les organismes photosynthétiques eucaryotes. L'analyse de la composition en acides gras de ce sulfolipide chez les plantes supérieures a montré deux structures différentes 16 :0/16 :0 et 18 :3/16 :0 chez les plantes de type C<sub>16:3</sub> et 18 :3(16 :0)/18 :3 chez les plantes de type C<sub>18:3</sub> (Siebertz et *al.*, 1979 ; Bishop et *al.*, 1985).

Le PG est le phospholipide majeur des membranes des plastes. Il représente environ 20% des lipides des cyanobactéries et environ 7 à 10% des lipides des membranes de l'enveloppe et des thylakoides des chloroplastes des cellules photosynthétiques eucaryotes (Joyard et *al.*, 1998).

Le PG plastidial a une structure unique (Dorne et Heinz, 1989), dans la mesure où il présente une structure procaryotique (18/16) avec du C16 :0 ou du C16 :1tr ou acide  $\Delta^3$  trans hexadécénoïque acide gras inhabituel estérifié en position sn-2 du glycérol.

Des fonctions spécifiques lui ont alors été assimilées chez les plantes. Le PG joue un rôle crucial dans l'organisation et le fonctionnement des membranes des thylakoides : les complexes LHCII sont intimement liés au PG et ce dernier intervient dans la trimérisation des oligomères LHCII (Trémolières et Siegenthaler, 1998).

Des corrélations ont été faites entre l'accumulation du PG C16 :1tr et l'empilement granulaire des membranes plastidiales, pour exemple, des mutants

de *Chlamydomonas reinhardtii* déficients en centres réactionnels PSII se sont avérés déficients en PG C16 :1tr ( Dubertret et *al.*, 1994 ; El Maani et *al.*, 1998).

Par ailleurs, il est admis que la résistance des plantes supérieures au froid est fortement corrélée avec les niveaux d'acides gras insaturés liés au PG des membranes plastidiales : les plantes résistantes contiennent de fortes proportions d'acides gras insaturés en position sn1 du PG alors que les plantes sensibles contiennent des combinaisons des espèces moléculaires 16 :0/16 :0 PG et 16 :0/16 :1tr PG qui présentent un haut point de fusion (Murata et *al.*, 1982 ; Ariizumi et *al.*, 2002).

## **2 - Biosynthèse des lipides chez les végétaux**

L'originalité des végétaux réside dans le fait que chez les eucaryotes photosynthétiques, un système de coopération s'est développé entre les compartiments chloroplastique et extrachloroplastique (réticulum endoplasmique) permettant la synthèse des glycérolipides des membranes cellulaires (Trémolières et *al.*, 1980a ; Drapier et *al.*, 1982).

### **2.1 - Biosynthèse des acides gras**

Dans les cellules végétales, le stroma plastidial est le site majeur de la synthèse *de novo* des acides gras (Harwood, 1996). De ce fait le processus de biosynthèse des lipides chez les végétaux est différent de celui des animaux et des champignons qui produisent des acides gras dans le cytosol (Ohlrogge et Browse, 1995).

De nombreuses études ont impliqué l'acétate comme source de carbone pour la synthèse *de novo* des acides gras dans les plantes, ce dernier étant activé en acétyl CoA par une acétyl CoA synthétase plastidiale dans une réaction ATP dépendante (Roughan et Slack, 1982). Mais des travaux récents ont montré que des sources de carbone cytosolique tels, le phosphoénolpyruvate, le pyruvate, le glucose6P et le malate peuvent être des substrats importants dans la synthèse des acides gras dans les plastes (Harwood, 1996 ; Rawsthorne, 2002).

L'AcétylCoA peut également provenir de la carnitine acyl transférase plastidiale ou encore dériver de la réaction ATP citrate lyase ou ACL (Rangasamy et Ratledge, 2000). L'origine de l'acétyl-CoA dépend en fait des espèces, du tissu, du stade de développement et des conditions physiologiques.

La première étape de biosynthèse *de novo* des acides gras est catalysée par l'acétyl-CoA carboxylase ou ACCase qui catalyse la formation du malonyl-CoA à partir de l'acétyl-CoA et du bicarbonate.

Actuellement il est admis l'existence de deux types d'ACCcase qui diffèrent par leur structure (Sasaki et *al.*, 1995 ; Nikolau et *al.*, 2003) :

- L'ACCcase à sous unités multiples (MS-ACCcase) ou forme hétéromérique (Nikolau et *al.*, 2003) qui consiste en trois ou plus sous unités formant un grand complexe de 700 kd (Reverdatto et *al.*, 1999). Cette forme dite procaryotique constitue la forme majeure et se trouve dans les plastes de toutes

les plantes non graminées. Chez toutes les espèces dicotylédones étudiées jusqu'à présent, l'ACCase multi-sous unités consiste en quatre polypeptides (Shorrosh et al., 1995) : la biotine carboxylase (BC) qui active le CO<sub>2</sub> en le fixant sur la biotine dans une réaction ATP dépendante, la biotine carboxyl carrier proteine (BCCP) et la carboxyl transférase (CT) qui transfère le CO<sub>2</sub> activé de la biotine carboxylase vers l'acétyl-CoA. La carboxyl transférase comprend deux sous unités la  $\alpha$ CT et la  $\beta$ CT. Les BC, BCCP et  $\alpha$ CT sont des protéines codées par le noyau et la sous unité  $\beta$ CT est codée par le génome chloroplastique (Sasaki et al., 1993).

- L'ACCase à structure multifonctionnelle (MF-ACCase) ou forme homo-mérique (Nikolau et al., 2003) dont les trois domaines fonctionnels BCCP, BC et CT sont assemblés en un seul polypeptide de plus de 200 kd. Cette structure dite eucaryotique ressemble à celle retrouvée dans le cytosol des levures et des animaux (Alban et al., 1994). Cette enzyme est détectée dans les cellules épidermiques et elle sert probablement à fournir le malonyl-CoA pour différentes voies entre autres la biosynthèse des flavonoïdes et la production des acides gras à longue chaîne des cuticules (Harwood, 1996 ; Podkowinski et al., 2003). Cette enzyme se trouverait dans le cytosol des dicotylédones et dans le cytosol et les plastes des poacées (Sasaki et al., 1995).

Chez les végétaux, il est suggéré que l'activité ACCase plastidiale contrôle le flux des acides gras à travers la voie de biosynthèse *de novo* des acides gras (Ohlrogge et Jaworski, 1997 ; Rawsthorne et al., 2001).

Le malonyl-CoA est transformé en malonyl ACP (acyl carrier protein, petite protéine d'environ 10 kd transporteuse d'acyl) grâce à une malonyl CoA : ACP transacylase ou malonyl transférase.

Tous les acides gras formés dans les plastes sont ACP dépendants et le malonyl-ACP constitue le donneur d'une chaîne à deux carbones pour toutes les étapes d'élongation de la chaîne acyl.

La biosynthèse des acides gras chez les végétaux fait intervenir un système multienzymatique appelé acide gras synthétase. Cette enzyme est de type procaryotique ou type II, elle constitue un complexe protéique comparable à celui retrouvé chez les bactéries, à partir duquel toutes les enzymes peuvent être séparées facilement.

La première étape de synthèse de la chaîne acyl est catalysée par la 3 cétol'acyl synthétase et consiste en la condensation de l'acétyl-CoA et du malonyl-ACP en une molécule à quatre carbones le cétol'-butyryl ACP. Ce dernier est transformé en butyryl ACP par l'action de trois enzymes successives : une 3 cétol'-acyl ACP réductase, une hydro-acyl-ACP déshydratase et une énoyl-ACP réductase. Cette série de réactions se reproduit après chaque étape d'élongation (de deux carbones). Elle aboutit à la formation d'acides gras saturés à 16 carbones ou à 18 carbones (Fig. 1). Trois types de KAS (keto acylACP synthases) interviennent (Wallis et Browse, 2002) : la KAS III permettant la synthèse du cétol' butyryl, la KAS I qui catalyse essentiellement la synthèse du palmitoyl ACP et la KAS II

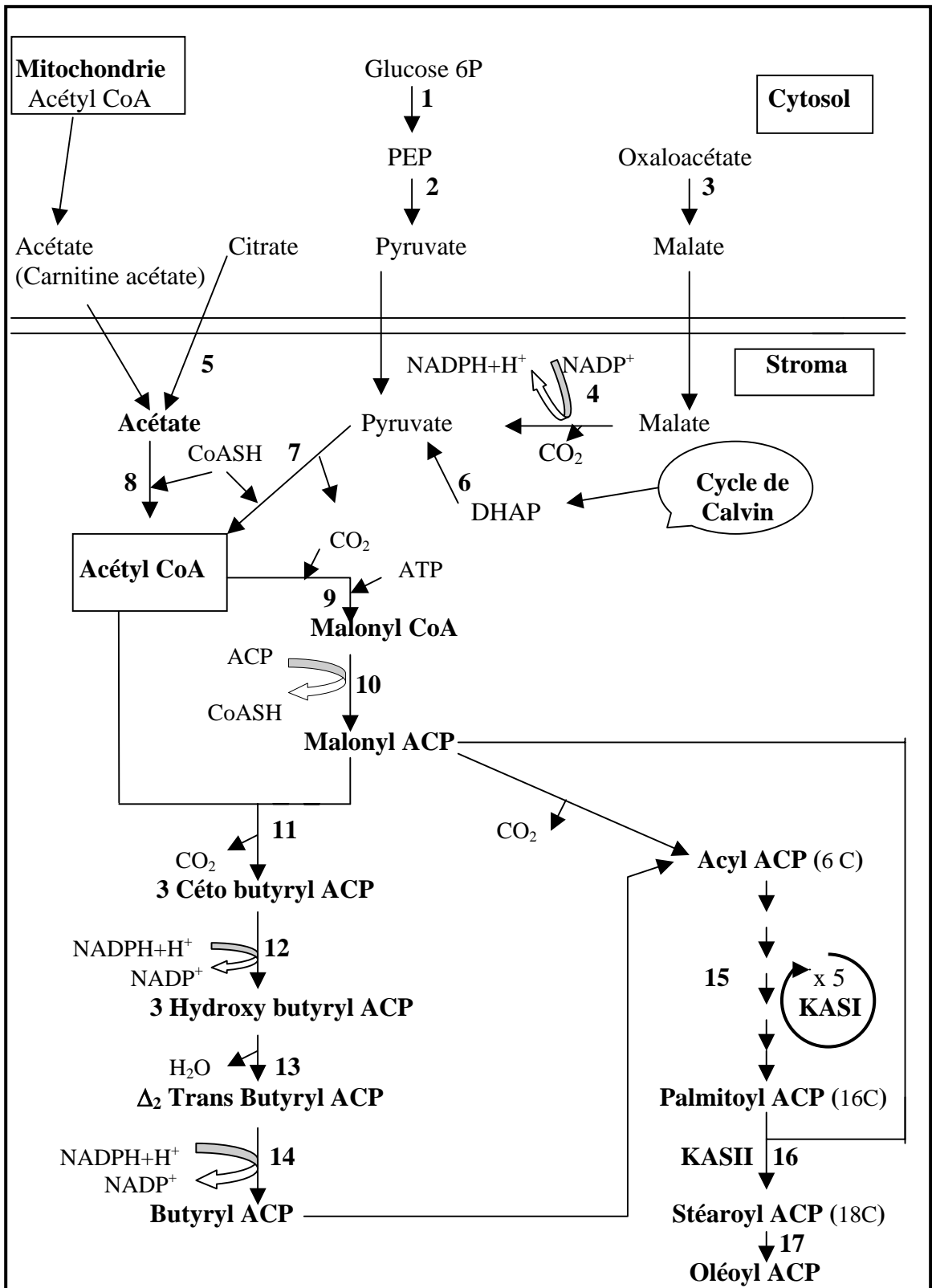


Figure 1 : Schéma de biosynthèse des acides gras dans le chloroplaste.

1 : enzymes de la glycolyse ; 2 : PEP phosphatase ; 3 : malate déshydrogénase ; 4 : enzyme malique NADP dépendante ; 5 : Citrate lyase ; 6 : DHAP réductase ; 7 : Pyruvate décarboxylase/déhydrogénase ; 8 : AcétylCoA Synthétase ; 9 : AcétylCoA carboxylase ; 10 : MalonylCoA-ACP transacylase ; 11 : 3-céto acyl ACP synthétase III ; 12 : 3-céto acyl ACP réductase ; 13 : 3-Hydroxyacyl ACP déhydratase ; 14 : Enoyl ACP réductase ; 15 : Palmitoyl ACP synthétase ; 16 : Palmitoyl ACP élongase ; 17 : Stéaroyl ACP désaturase.

permettant principalement l'élongation du palmitoyl ACP (16 :0ACP) en stéaroyl ACP (18 :0ACP).

Un mutant d'*Arabidopsis fab1* présentant une augmentation du niveau de 16 :0 suite à la réduction de l'activité de l'enzyme KASII a été caractérisé dans les graines et les tissus foliaires (Wu et *al.*, 1994). Cette mutation entraîne une perturbation dans la croissance et le développement des plantules.

Dans la plupart des tissus végétaux, plus de 75% des acides gras synthétisés sont désaturés ; la première double liaison est introduite dans le stéaroyl-ACP en position  $\Delta^9$  par la stéaroyl-ACP désaturase soluble dans le stroma (McKeon et Stumpf, 1982) et catalysant la formation de l'oléoyl-ACP (18 :1ACP). Cette première désaturation est cruciale pour les étapes suivantes de biosynthèse des acides gras polyinsaturés; en effet les mutants d'*Arabidopsis thaliana fab2* défectueux en C18 :0 ACP désaturase présentent un phénotype nain et l'expansion de certains types cellulaires (cellules du mésophylle et cellules épidermiques) est sévèrement compromise (Lightner et *al.*, 1994<sub>b</sub>).

Les acides gras nouvellement synthétisés dans le plaste peuvent avoir deux destinées :

- une part de C16 :0ACP et de C18 :1ACP est utilisé directement à l'intérieur du plaste pour la synthèse des glycérolipides de type procaryote.
- Une autre part est exportée en dehors du chloroplaste et servira à la biosynthèse des phospholipides extra-chloroplastiques, des glycolipides de type eucaryote et des triacyl-glycérol (ou TAG) dans les graines en formation.

## **2.2 - Biosynthèse des glycérolipides par la voie procaryote**

La biosynthèse des glycérolipides requiert du glycérol 3P, des acides gras et une tête polaire. Le glycérol 3P dérive pour une grande part de la dihydroxyacétone phosphate (formée au cours de la photosynthèse) grâce à la dihydroxyacétone phosphate réductase (Gee et *al.*, 1988a).

### **2.2.1- Formation du PA de type procaryote**

La voie biosynthétique démarre avec l'activité de la glycérol-3-P acyl transférase. Cette enzyme catalyse l'estérification d'un groupe acyl sur la position sn-1 du glycérol 3P. Dans les cellules végétales il existe deux types de glycérol 3P acyltransférase une dans le cytosol et l'autre dans le chloroplaste (McKeon et Stumpf, 1982). Ces enzymes diffèrent dans l'utilisation des groupes acyls : l'enzyme cytosolique utilise des acyls CoA alors que l'enzyme chloroplastique utilise des acyls ACP. La spécificité des acyls glycérol 3P acyl transférase pour le C16 :0 ou le C18 :1 en position sn2 du glycérol 3P détermine le type d'espèces moléculaires des lipides synthétisés (procaryote ou eucaryote).

La glycérol 3P acyl transférase du chloroplaste est une enzyme soluble étroitement associée à la membrane interne de l'enveloppe et spécifique du transfert de l'acide oléique du C18:1ACP vers la position sn-1 du glycérol produisant le 1 oléoyl-sn glycérol 3P ou acide lysophosphatidique (Frentzen, 1993).

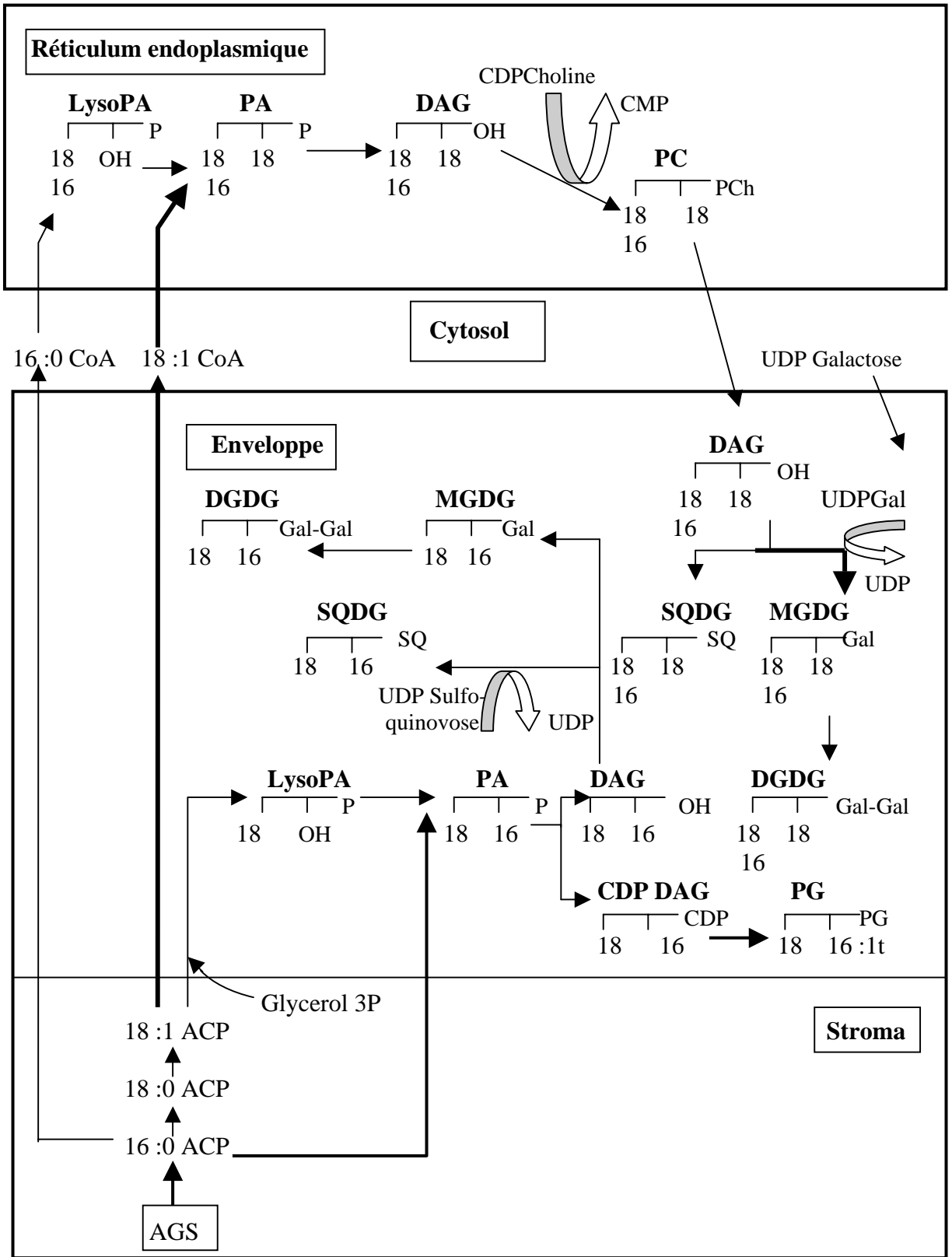


Figure 2 : Différentes voies de biosynthèse des lipides chez les végétaux.

L'acide lysophosphatidique formé au niveau des membranes de l'enveloppe est ensuite acylé en position sn-2 par la 1-acyl glycérol 3P acyl transférase. Cette enzyme est spécifique de la position sn-2 et du palmitoyl ACP.

Les deux acyl transférases ont donc des spécificités et des sélectivités pour l'acylation du sn- glycérol 3P. Elles permettent la formation au niveau de la membrane interne de l'enveloppe de l'acide phosphatidique ou 1,2 diacyl glycérol 3P présentant du C18 :1 en position sn-1 et du C16 :0 en position sn-2 du glycérol. Cette structure est typique des glycérolipides de type procaryote.

L'acide phosphatidique formé est ensuite transformé soit en CDP-DAG servant à la synthèse du phosphatidyl glycérol soit en DAG servant à la synthèse des MGDG, DGDG et SQDG (Fig. 2).

### 2.2.2 - Biosynthèse du PG chloroplastique

La synthèse du PG chloroplastique est localisée dans la membrane interne de l'enveloppe (Andrews et Mudd, 1985). Ce PG aussi bien chez les plantes C<sub>16:3</sub> que chez les plantes C<sub>18:3</sub> est de type procaryote.

L'acide phosphatidique est transformé en CDP-DAG grâce à la phosphatidate cytidyltransférase. Le CDP-DAG réagit avec une molécule de glycérol 3P pour donner du phosphatidylglycérol3P, la réaction étant catalysée par la CDP-DAG glycérol3P phosphatidyltransférase. Le phosphatidylglycérol3P est alors déphosphorylé par la phosphatidylglycérol phosphatase (Fig. 2).

Dans le PG ainsi formé, 30 à 70% du C16 :0 en position sn-2 sont convertis en acide Δ<sup>3</sup> trans hexadécénoïque ou C16 :1tr par une désaturase spécifique du PG, de la position sn-2 du squelette glycérol et de l'acide gras ; il s'agit de la PG sn-2 Δ<sup>3</sup> trans désaturase (Dubacq et Trémolières, 1983).

### 2.2.3 - Formation des DAG

La phosphatidate phosphatase ou 3 sn phosphatidate phosphohydrolase catalyse la déphosphorylation de l'acide phosphatidique (Fig. 3).

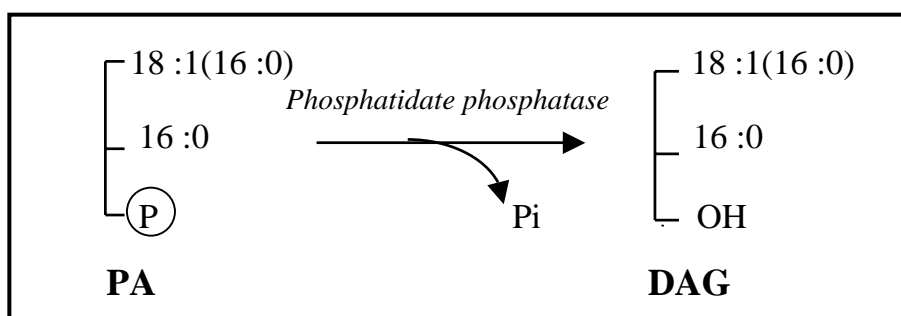


Figure 3 : Formation du DAG à partir de l'acide phosphatidique.

Dans les chloroplastes, cette enzyme est membranaire et elle est localisée exclusivement dans la membrane interne de l'enveloppe (Andrews et *al.*, 1985). Elle régule le niveau de glycolipides procaryotes dans les membranes

chloroplastiques : son activité est élevée chez les plantes C<sub>16:3</sub> et basse chez les plantes C<sub>18:3</sub> (Roughan et Slack, 1984).

La réduction du niveau d'activité de cette enzyme dans les plantes C<sub>18:3</sub> n'est pas clarifiée on ne sait s'il s'agit d'une baisse de l'expression du gène codant pour cette enzyme ou de la présence de molécules régulatrices contrôlant son activité.

Les molécules de DAG formées *de novo* dans la membrane interne de l'enveloppe constituent un pool de substrats partagés par la MGDG synthétase et la SQDG synthétase (Joyard *et al.*, 1986) (Fig. 4).

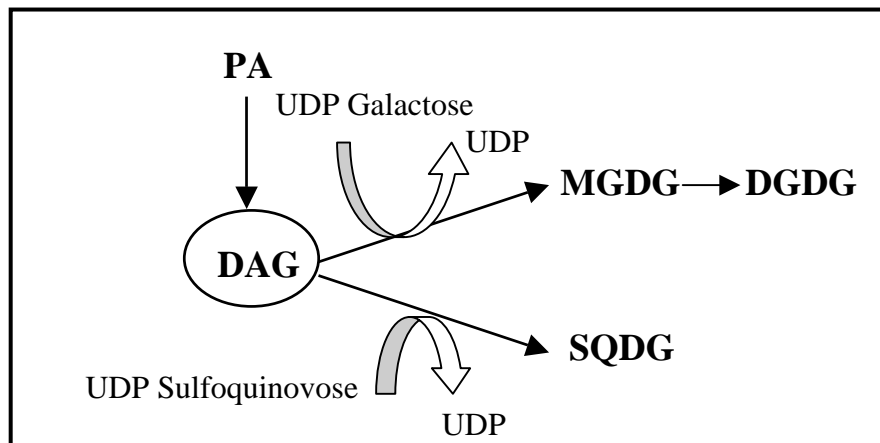


Figure 4 : Utilisation du pool de DAG pour la synthèse des galactolipides et des sulfolipides.

#### 2.2.4 - Biosynthèse des galactolipides

Les membranes des chloroplastes contiennent de très fortes teneurs en galactolipides MGDG et DG DG. L'isolement des gènes impliqués dans la biosynthèse du MGDG et DG DG et l'identification des mutants d'*Arabidopsis mgd1* (Jarvis *et al.*, 2000) et *dgd1* (Dormann *et al.*, 1995) déficients en galactolipides ont contribué aux études de biosynthèse des galactolipides et à la compréhension de leur fonction (Klaus *et al.*, 2002).

Les galactolipides jouent un rôle essentiel dans la biogénèse et le fonctionnement des membranes chloroplastiques (Rawlyer et Siegenthaler, 1980 ; Hartel *et al.*, 1998 ; Jarvis *et al.*, 2000). En favorisant l'intégration des complexes protéiques dans les membranes des thylakoides (Dormann et Benning 2002), ils interviennent dans la formation des empilements granaires de ces membranes (Lee, 2000). Les galactolipides sont également indispensables à l'importation correcte des protéines dans les chloroplastes (Chen et Li, 1998).

##### 2.2.4.1 - Biosynthèse du MGDG

La synthèse du MGDG (Fig. 2) est catalysée par l'UDP galactose 1,2 diacylglycérol 3 β-D galactosyl transférase ou MGDG synthétase (E.C 2.4.1.46).

Cette enzyme transfère le  $\beta$  galactose d'un donneur nucléotidique hydrosoluble l'UDPgalactose cytosolique vers un accepteur hydrophobe le 1,2 DAG en position sn-3 (Joyard *et al.*, 1998).

La MGDG synthétase a été étudiée par de nombreux groupes de chercheurs dont Douce et Joyard (1980), Heemskerk *et al.*, (1986), Maréchal *et al.*, (1994), Miège *et al.*, (1999) ; elle a été solubilisée par Covés *et al.*, (1986-1987). La localisation de la MGDG synthétase au niveau des membranes de l'enveloppe des plastes n'est pas encore bien définie et semble différente chez les plantes 16 :3 et les plantes 18 :3.

Chez l'épinard l'activité MGDG synthétase est essentiellement retrouvée dans des fractions d'enveloppe enrichies en membrane interne (Block *et al.*, 1983b ; Tietje et Heinz, 1998). Chez le pois, Cline et Keegstra (1983) ont localisé cette activité dans la membrane externe de l'enveloppe ; Néanmoins dans plusieurs autres analyses, aussi bien la membrane interne que la membrane externe semblent présenter une activité MGDG synthétase significative (Tietje et Heinz, 1998). Cette enzyme marqueur des membranes de l'enveloppe et responsable de la synthèse du lipide polaire le plus abondant sur terre est cependant un composant mineur ( $0,5\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  de protéines) des membranes de l'enveloppe (Joyard et Douce, 1987).

L'affinité de la MGDG synthétase pour le DAG dépend de la longueur des chaînes acyl (16 carbones ou 18 carbones), de leur position (sn-1 ou sn-2) et de leur nombre de doubles liaisons (0 à 3). De ce fait la liaison du 1-2 DAG à la MGDG synthétase fait intervenir au moins partiellement la partie acyl.

Le site actif de la MGDG synthétase comporte 3 parties : 2 sites indépendants pour la fixation des substrats un pour l'UDP galactose , l'autre pour le 1-2 DAG et un troisième site catalytique au sens strict où est réalisé le transfert du galactose.

La MGDG synthétase montre une forte affinité pour le 1-oléoyl 2-palmitoyl glycérol (18 :1/16 :0) qui est produit en fortes proportions par la phosphatidate phosphatase dans l'enveloppe.

Chez *Arabidopsis*, le MGDG est synthétisé par une famille multigénique de MGDG synthétases correspondant à deux types d'enzymes le type A (atMGD1) et le type B (atMGD2 et atMGD3) se distinguant par la longueur de la portion N terminal de leurs précurseurs présumés (Awai *et al.*, 2001).

La caractérisation d'un mutant *mgd1* d'*Arabidopsis* (Jarvis *et al.*, 2000) présentant seulement 25% de l'activité MGDG synthétase indique que la MGDG synthétase de type A est codée par un gène *MGD1* qui est abondamment exprimé dans les tissus verts et tout au long du développement du végétal. Son activité permet la production massive de MGDG requise pour la formation de la membrane interne de l'enveloppe et des membranes des thylakoïdes.

Malgré la réduction de 75% de l'activité de la MGDG synthétase, le mutant ne présente que 42% de réduction du MGDG ce qui suggère la présence des autres MGDG synthétases (type B) codées par les gènes *MGD2* et *MGD3*.

Les MGDG synthétases de type B seraient localisées sur la membrane externe des chloroplastes (Froehlich *et al.*, 2001) et auraient une plus grande spécificité pour les

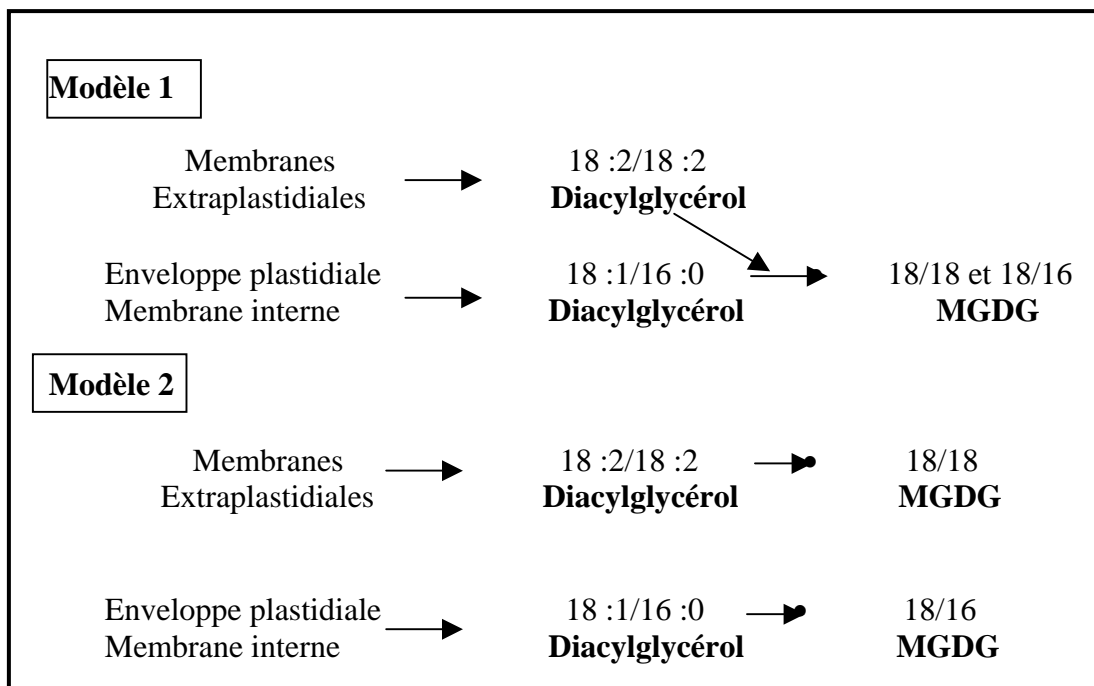


Figure 5 : Modèles hypothétiques de synthèse du MGDG de type eucaryote et procaryote (Miège et *al.*, 1999).

espèces moléculaires 18 :2/18 :2 que pour les espèces 18 :1/16 :0. Elles contribueraient à l'expansion de la membrane externe.

L'expression des gènes des enzymes de type B est plus importante dans les tissus non verts (inflorescences : atMGD2 et racines atMGD3). Cette expression est augmentée en cas de privation en phosphate (Hartel et *al.*, 2000) et participerait en partie à la synthèse du DGDG résiduel chez les mutants *dgd1* (Awai et *al.*, 2001).

Les gènes des MGDG synthétase de type A et B sont largement retrouvés chez les plantes supérieures et ne sont pas liées aux catégories des plantes 16 :3 ou 18 :3 et donc à une hypothétique spécialisation dans les voies procaryote ou eucaryote de synthèse des glycolipides (chez le soja, les deux types de MGDG synthétases sont retrouvées).

Chez l'épinard, deux modèles hypothétiques de synthèse de MGDG de type procaryote et eucaryote (Fig. 5) sont proposés par Miège et *al.*, (1999) dans lesquels l'étape finale de la synthèse du MGDG aussi bien de type eucaryote que procaryote est réalisée par une seule MGDG synthétase (modèle 1) ou par des MGDG synthétases distinctes (modèle 2).

#### 2.2.4.2 - Biosynthèse du DGDG

La synthèse du DGDG (Fig. 2) se distingue de celle du MGDG mais semble associée à cette dernière.

La galactolipide : galactolipide galactosyl transférase ou GGGT ou encore DGD1 synthétase est la seule enzyme de formation du DGDG clairement décrite dans les plantes jusqu'à ce jour (Van Besouw et Wintermans, 1978 ; Heemskerk et *al.*, 1990).

Cette enzyme susceptible d'être détruite par la thermolysine est localisée du côté cytosolique de la membrane externe de l'enveloppe (Dorne et *al.*, 1982) ; elle catalyse l'échange interlipide de galactose entre deux molécules de MGDG formant ainsi du DGDG et libérant du DAG (Fig. 6).

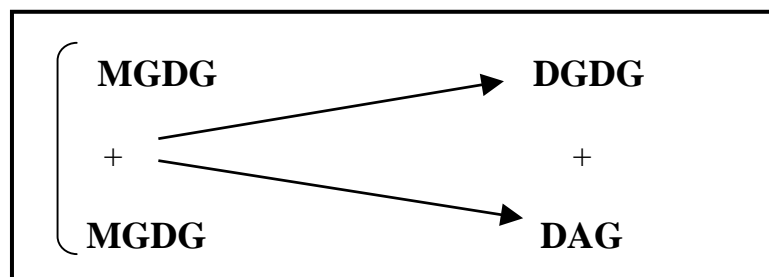


Figure 6 : Formation du DGDG catalysée par la galactolipide : galactolipide galactosyl transférase.

Le DGDG et le MGDG ont des compositions en acides gras différentes, de ce fait la plupart des molécules de MGDG ne sont pas toujours à l'origine directe du DGDG.

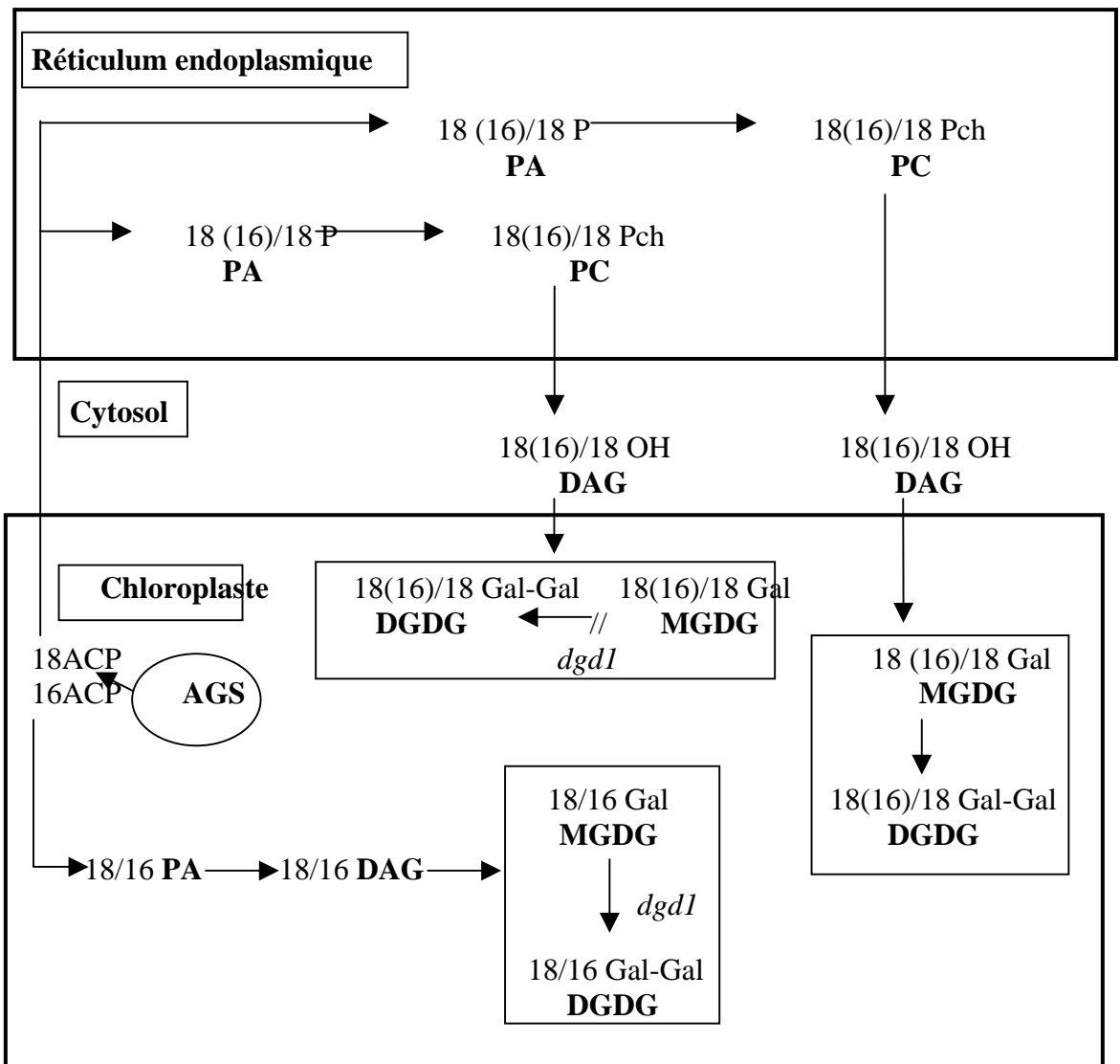


Figure 7 : Représentation schématique des voies de biosynthèse du DGDG d'après (Hartel et al., 2000).

Afin de comprendre le processus complexe impliqué dans la synthèse du DGDG, une approche génétique a été développée par Dörmann et *al.*, (1995) qui ont isolé un mutant d'*Arabidopsis* *dgd1* déficient en DGDG. Cette mutation qui entraîne une diminution de plus de 90% de la teneur en DGDG, engendre des changements structuraux de l'appareil photosynthétique et des altérations du fonctionnement du complexe d'oxydation de l'eau (Hartel et *al.*, 1997) ainsi qu'une diminution dans l'importation des protéines (Chen et Li, 1998).

Un certain nombre de faits militent en faveur de l'existence d'une voie de synthèse du DGDG autre que celle de la GGGT :

- ✓ La mutation du gène *dgd1* suggère sa complète inactivation (Dörmann et *al.*, 1999), or chez le mutant *dgd1*, il subsiste une synthèse de DGDG résiduel.
- ✓ Par ailleurs, si la GGGT était la seule enzyme permettant la formation du DGDG, la mutation *dgd1* devrait aboutir à l'accumulation de MGDG. Mais le niveau de MGDG est à peine augmenté dans le mutant.
- ✓ La synthèse du DGDG demeure active dans les chloroplastes isolés du mutant et la composition en acides gras de ces molécules de DGDG est différente de celles synthétisées dans les chloroplastes normaux.
- ✓ La synthèse du DGDG peut être augmentée chez le mutant en cas de privation en phosphate (Hartel et *al.*, 2000).

La synthèse du DGDG dans les chloroplastes semble donc plus complexe que ce l'on pensait initialement. Des travaux récents de Hartel et Benning, (2000), Kelly et Dörmann (2002) et Klaus et *al.*, (2002) ont montré chez *Arabidopsis* deux gènes codant pour deux DGDG synthétase (DGD1 et DGD2). La DGD1 synthétase (Fig. 7) serait responsable de la synthèse de la fraction prédominante de DGDG retrouvé dans les membranes des chloroplastes. La DGD2 synthétase permettrait la synthèse du DGDG résiduel chez le mutant *dgd1* mais aussi serait impliquée dans la synthèse du DGDG dans des conditions spécifiques de croissance telles une privation en phosphate (Hartel et *al.*, 2000, Dörmann et Benning, 2002). Klaus et *al.*, (2002) ont démontré que le niveau additionnel de DGDG synthétisé durant la privation en phosphate est en partie localisé dans les membranes extraplastidiales.

La synthèse du DGDG via la DGD2 synthétase ferait intervenir les MGDG synthétase de type B. En effet une augmentation de l'expression de *atMGD2* et *atMGD3* a été observée chez *Arabidopsis thaliana* privée de phosphate (Awai et *al.*, 2001).

### 2.2.5 - Biosynthèse du SQDG

Le plus important sulfolipide retrouvé dans les plantes supérieures est le sulfoquinovosyl 1-2 diacylglycérol.

Peu de choses sont connues sur l'enzyme UDP sulfoquinovosyl 1-2 diacyl glycérol sulfoquinovosyl transférase ou SQDG synthétase des plantes intervenant dans la biosynthèse du SQDG. Cette enzyme entre en compétition avec la MGDG synthétase pour les molécules de DAG (Joyard et *al.*, 1986).

L'analyse de la distribution des acides gras dans le SQDG (Siebertz et *al.*, 1979) ont montré chez les plantes supérieures, des proportions significatives de SQDG saturé ou dipalmitoyl SQDG. La présence ou l'absence de SQDG 16 :0/16 :0 dépend des espèces végétales. Cependant les espèces moléculaires majeures contiennent aussi bien du C16 :0 que du C18 :3. Deux structures distinctes peuvent donc être observées dans le SQDG des plantes supérieures : la structure eucaryote 16 :0/18 :3 et la structure procaryote 16 :0/16 :0 ; 18 :3/16 :0 (Bishop et *al.*, 1985). Le SQDG serait indispensable au fonctionnement des complexes PSII (Minoda et *al.*, 2002) de même qu'il jouerait un rôle de molécule signal en cas de stress (Taran et *al.*, 2000).

### **2.3 - Biosynthèse des glycérolipides par la voie eucaryote ou voie coopérative**

Trémolières et *al.*, (1980b et 1980c) ont été parmi les premiers à démontrer cette voie coopérative qui implique la coopération entre le réticulum endoplasmique et le chloroplaste pour la synthèse des glycolipides de type eucaryote. Cette voie fonctionne quasi exclusivement chez les plantes en 18 :3 telles le pois et existe aussi chez les plantes en 16 :3 telles l'épinard.

Les proportions d'acides gras exportés en dehors des plastes pour être incorporés dans les lipides au niveau du réticulum endoplasmique par la voie eucaryote varient selon le type de plantes : chez les plantes de type C<sub>18:3</sub>, une grande partie des acides gras est exportée dans le cytosol contrairement aux plantes de type C<sub>16:3</sub> qui utilisent une grande proportion des acides gras synthétisés au sein du plaste pour la synthèse des glycolipides de type procaryote (Browse et *al.*, 1986).

La première étape de l'exportation des acides gras hors du plaste consiste en l'hydrolyse des acyl-ACP par une acyl ACP thioesterase ou hydrolase soluble libérant les acides gras. Ces derniers traversent les deux membranes puis ils sont transformés au niveau de la membrane externe de l'enveloppe en acylsCoA par des acylCoA synthétases ou ACS (Roughan et Slack, 1982 ; Schnurr et *al.*, 2002).

Les acylCoAs sont alors utilisés au niveau du réticulum endoplasmique par des acyl transférases pour la synthèse des glycérolipides.

Les mécanismes de transfert des acyl CoA ne sont pas connus, néanmoins des protéines spécifiques reliées aux acyl CoA pourraient être impliquées (Hills et *al.*, 1994).

Les thioesters Acyl CoA peuvent rester dans le cytosol en tant que pool soluble et servir à la biosynthèse des DAG puis des TAG dans les tissus de réserves lipidiques (Browse et Somerville, 1991).

#### **2.3.1 - Biosynthèse du PA eucaryote**

Les acylases du réticulum endoplasmique contrairement à celles du chloroplaste produisent des molécules d'acide phosphatidique avec des configurations de type eucaryote (Fig. 8) : ces molécules possèdent du C18 :1 en position sn-1 et sn-2

(18 :1/18 :1). Le C16 :0 quand il est présent est confiné à la position sn-1 (Frentzen et *al.*, 1983).

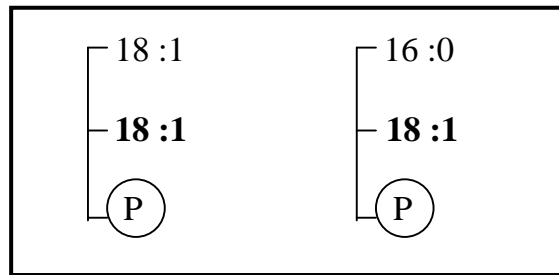


Figure 8 : Structure de l'acide phosphatidique ou PA de type eucaryote

### 2.3.2 - Biosynthèse des phospholipides extrachloroplastiques

Le réticulum endoplasmique est le site majeur de la synthèse des phospholipides des plantes et plus précisément de la PC ou phosphatidylcholine (Fig. 9).

L'acide phosphatidique est transformé soit en DAG sous l'action d'une phosphatidate phosphatase, servant ainsi à la synthèse du PC et du PE soit en cytidyl diphosphate diacylglycérol (CDP-DAG) grâce à une cytidyl triphosphate phosphatidate cytidyl transférase ; le CDP-DAG ainsi formé sert de précurseur à la synthèse du PI (phosphatidylinositol) et du PG (phosphatidylglycérol) de type eucaryote (Moore, 1982).

La PC a une grande importance chez les plantes : c'est un constituant majeur des membranes extrachloroplastiques. Ce phospholipide joue un rôle clef dans le métabolisme des lipides : c'est le substrat de la désaturation de l'oléate au niveau du réticulum endoplasmique (Murphy et *al.*, 1984) ; il est considéré chez la majorité des plantes comme site majeur de désaturation des acides gras à 18 carbones et comme précurseur d'un pool de DAG servant à la synthèse des lipides chloroplastiques de type eucaryote (MGDG, DGDG et SQDG) dans les feuilles.

Par ailleurs, la PC est impliquée dans de nombreuses réponses physiologiques aux stress tel le stress hydrique (Thomas et *al.*, 1982).

Malgré ce rôle important dans la synthèse des lipides chloroplastiques, peu de détails sont connus quant au transfert de la PC vers le chloroplaste.

### 2.3.3 - Biosynthèse des glycolipides

L'importation des lipides des membranes du réticulum vers le chloroplaste est un phénomène majeur dans le métabolisme lipidique des plantes. Il contribue en moyenne à environ 50% du total des galactolipides formés quand les deux voies procaryote et eucaryote sont opérationnelles et à 100% quand la voie procaryote ne fonctionne que pour la synthèse du PG.

L'origine des DAG utilisés pour la biosynthèse des molécules de MGDG ayant la structure de type eucaryote n'est pas encore bien élucidée.

Des cinétiques d'incorporation d'acétate radioactif dans les lipides chloroplastiques suggèrent que la PC fournirait les DAG pour la biosynthèse des glycérolipides

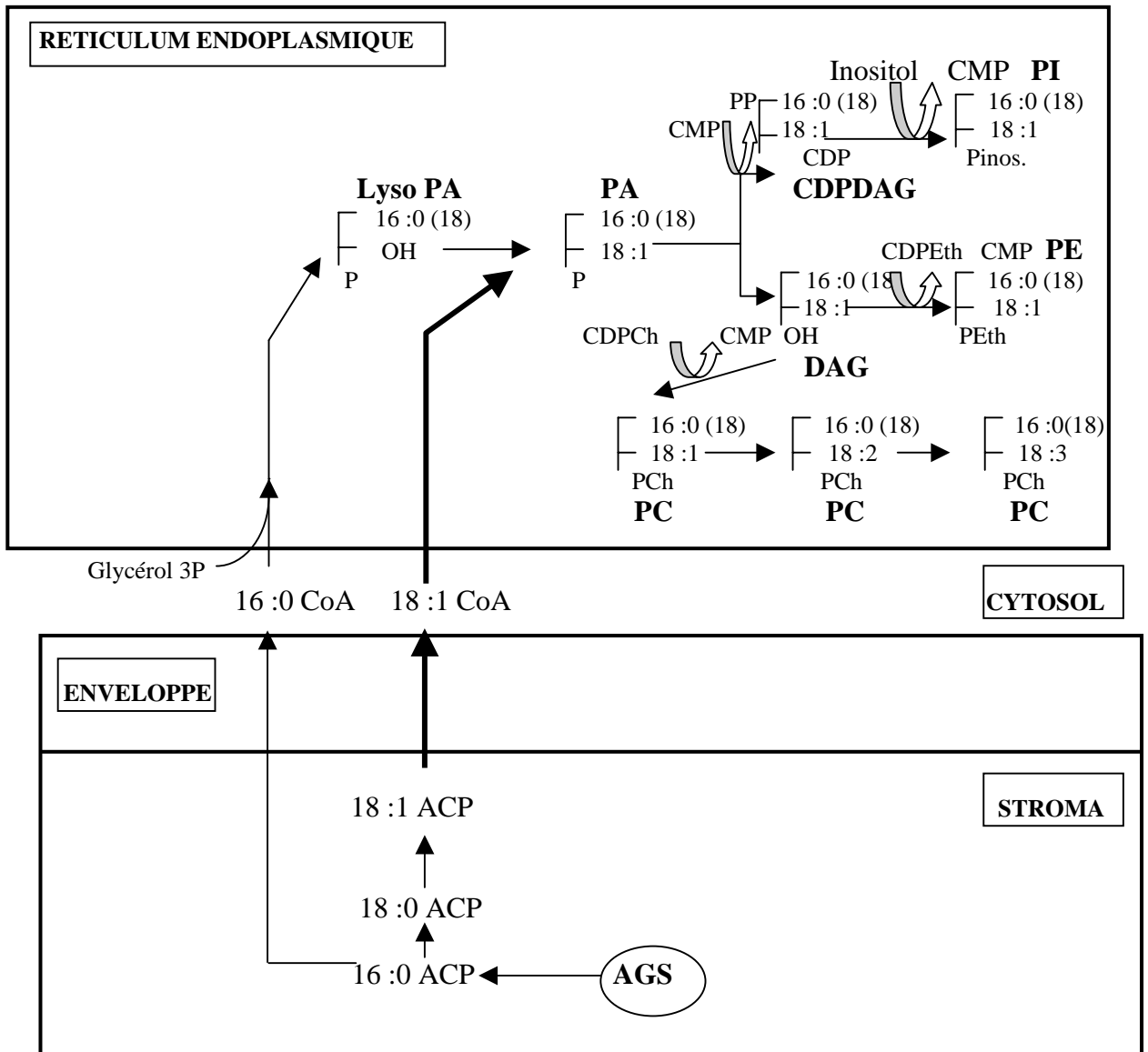


Figure 9 : Biosynthèse des phospholipides chez les végétaux d'après Moore, (1982).

plastidiaux de type eucaryotes (Roughan et Slack, 1982), et la MGDG synthétase a une forte affinité pour les DAG ayant une structure type eucaryotique C18 /C18. De ce fait il devrait exister des mécanismes de transfert de molécules de PC de leur site de synthèse (RE) vers la membrane externe des plastes. Kader et *al.*, (1984) ont montré un transfert *in vitro* des phospholipides entre les membranes cellulaires par des protéines LTP ou lipid transport proteins ; cependant ce rôle est très discuté dans la mesure où ces PLTP seraient impliquées dans des processus d'excrétion et d'exportation de produits lipophiles (Madrid et Weittstein, 1991 ; Kader, 1996).

Dans les chloroplastes, la PC qui est concentrée dans la face externe de la membrane externe de l'enveloppe (Dorne et *al.*, 1985) contient des proportions significatives de 18 :2 en position sn-1 et sn-2 du glycérol (Siebertz et *al.*, 1979), mais l'enzyme générant le DAG de la PC à savoir la phospholipase C n'a pas été retrouvée dans les membranes de l'enveloppe. Par ailleurs très peu de choses sont connues sur le transfert des DAG de la membrane externe vers la membrane interne.

Un autre mécanisme de synthèse des lipides plastidiaux de type eucaryote a été récemment proposé par Bessoule et *al.*, (1995) et Mongrand et *al.*, (2000) impliquant l'importation de la lysoPC vers le chloroplaste. En effet en préincubant des membranes de microsomes avec de la lysoPC radioactive, ces équipes ont montré que la lysoPC peut être transférée vers le chloroplaste où elle est acylée par une lysoPC acylCoA acyltransférase (identifiée par Bessoule et *al.*, (1995) au niveau des membranes des chloroplastes) pour donner de la PC. Au niveau de la membrane externe, la PC serait alors transformée en DAG.

La nature des lipides importés du réticulum vers le chloroplaste demeure donc non claire : d'une part, les plastes contiennent de la PC sur la face cytosolique de la membrane externe (Dorne et *al.*, 1985), ayant la même structure de son DAG que le PC extraplastidial, mais ils sont dépourvus de l'activité CDP-choline DAG choline phospho transférase et de l'activité phospholipase C (Joyard et *al.*, 1998), d'autre part de nombreuses expériences ont montré *in vivo* l'évidence de la relation PC précurseur/galactolipide produit chez les végétaux (Browse et *al.*, 1986 ; Oursel et *al.*, 1987).

#### **2.4 - Désaturation des acides gras chez les végétaux supérieurs**

Les acides gras insaturés sont des constituants importants des membranes cellulaires des végétaux. Les tissus photosynthétiques des plantes supérieures contiennent plus de 70% d'acide linoléique acide gras le plus abondant dans la nature (Gounaris et Barber, 1983).

Les acides gras polyinsaturés confèrent fluidité et perméabilité sélective aux membranes cellulaires (Wallis et *al.*, 2002) ; ils sont déterminants dans la stabilité

thermique des membranes photosynthétiques (Routaboul et *al.*, 2000) et jouent également un rôle crucial dans les processus de signalisation chez les organismes vivants (Gallis et *al.*, 2002).

Les acides gras polyinsaturés sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques aussi bien chez les végétaux que chez les animaux tels l'adaptation au froid et à la survie ( Miquel et *al.*, 1993 ; Sakamoto et Murata, 2002) le développement du chloroplaste (McConn et Browse, 1998), la formation du pollen (McConn et Browse, 1996) et la défense contre les pathogènes (Wallis et Browse, 2002).

Les recherches sur les désaturases par des approches de biochimie traditionnelle ont été limitées du fait des difficultés de la solubilisation et de la purification de ces protéines membranaires ( Schmidt et *al.*, 1994).

Une nouvelle approche a été adoptée dans l'étude du système de désaturation consistant en l'utilisation des herbicides tels le San 9785 de la famille des pyridazinones en tant qu'outil biochimique, ce qui a permis à Norman et St John, (1987) de confirmer l'existence de différents sites de biosynthèse du C18 :3.

Ce n'est que depuis le début des années 1990 avec l'utilisation combinée d'organismes modèles (*Arabidopsis thaliana*) et d'outils de génétique moléculaire, que les connaissances sur les désaturases des acides gras se sont améliorées et que les gènes qui codent pour ces dernières ont été isolés (Browse et Somerville, 1991 ; Ohlrogge et Browse, 1995).

La dernière étape de biosynthèse des lipides consiste en la désaturation des acides gras qui les composent. Dans les tissus végétaux, la majorité des glycérolipides sont synthétisés à partir des groupes acyls C16 :0 et C18 :1. La désaturation de ces lipides en lipides insaturés typiques des membranes des cellules végétales est réalisée par des désaturases membranaires liées au réticulum endoplasmique et aux chloroplastes. Dans les tissus non verts et les graines en formation, la voie microsomale (réticulum endoplasmique) est prédominante (Browse et Somerville, 1991 ; Heinz, 1993).

Deux systèmes de notation des désaturases sont généralement utilisés (Shanklin et Cahoon, 1998) :

Le système de notation delta ( $\Delta$ ), est utilisé pour définir le niveau de désaturation de l'acide gras en comptant les carbones à partir du carboxyl terminal, le système oméga ( $\omega$ ) définit le niveau de désaturation de l'acide gras à partir de la fin méthyl.

Les désaturases des acides gras retrouvées chez les végétaux sont les acyls ACP et les acyls lipides. La plupart des acyls lipides désaturases membranaires comprennent 300 à 350 résidus acides aminés correspondant à des protéines hydrophobes traversant plusieurs fois (4 fois) la membrane (Murata et Wada, 1995). Toutes les désaturases connues sont caractérisées par la présence de 3 groupes d'histidine occupant des positions fortement conservées dans la séquence d'acides aminés de chaque protéine ; ces groupes histidine et des ions fer constituent le centre catalytique de l'enzyme (Fox et *al.*, 1993).

### 2.4.1 - Sites et substrats de désaturation

Dans les tissus végétaux, les deux voies procaryote et eucaryote de biosynthèse des lipides sont associées à la production des acides gras polyinsaturés.

Cependant l'origine des acides gras polyinsaturés des lipides chloroplastiques n'est pas tout à fait clarifiée selon qu'on s'adresse aux plantes de type  $C_{16:3}$  ou  $C_{18:3}$ .

En effet différentes expériences menées *in vitro* avec des chloroplastes isolés de plantes  $C_{18:3}$  ont montré l'incapacité de ces organites à fabriquer du  $18:3/18:3$  MGDG (Trémolières et *al.*, 1980a).

Cette absence de synthèse des acides gras polyinsaturés par les chloroplastes isolés et cette incapacité du chloroplaste à effectuer certaines réactions du métabolisme lipidique ont ouvert la voie à l'exploration de la coopération entre compartiments chloroplastique et extrachloroplastique pour la réalisation de la synthèse des lipides membranaires de la cellule végétale.

Le site et les substrats de désaturation de l'oléate et du linoléate varient donc selon le type de plante considérée.

L'utilisation de traceurs radioactifs (acétate, oléate et linoléate) ont permis de mettre en évidence des cinétiques de formation des acides gras différentes chez les deux groupes de plantes : chez les plantes en  $C_{16:3}$  (épinard, colza) la radioactivité est incorporée dans des proportions similaires dans la PC et le MGDG, alors que dans les plantes en  $C_{18:3}$ , la PC est d'abord fortement marquée, puis cette radioactivité diminue alors qu'elle augmente de manière concomitante dans le MGDG. Cette différence de cinétique de marquage entre la PC et le MGDG, ajoutée à la différence de composition en espèces moléculaires des galactolipides a poussé plusieurs auteurs à supposer l'existence de deux voies majeures de synthèse des acides gras polyinsaturés du MGDG (Roughan et Slack, 1982 ; Heemskerk et Wintermann, 1987). Chez les plantes  $C_{18:3}$ , la voie eucaryote ou coopérative serait prédominante et chez les plantes en  $C_{16:3}$  les deux voies coexisteraient.

Chez les plantes  $C_{16:3}$ , la synthèse de l'espèce moléculaire la plus insaturée du MGDG à savoir la  $18:3/16:3$  se déroulerait entièrement dans le chloroplaste : le  $18:1/16:0$  serait désaturé en  $18:1/16:1$  puis en  $18:2/16:2$  lui même désaturé en  $18:3/16:3$  respectivement par la  $\Delta^7$  (n-9) désaturase et les  $\omega^6$  (n-6) et  $\omega^3$  (n-3) désaturases.

Chez les plantes  $C_{18:3}$  des études de cinétique d'incorporation de l'oléate radioactif dans la feuille entière suivies d'un fractionnement cellulaire (Trémolières et *al.*, 1980b) ont montré que la radioactivité s'accumule dans le  $18:2$  PC de la fraction microsomale puis qu'elle diminue dans ce lipide alors qu'elle s'accumule dans le  $18:3$  lié aux galactolipides.

Par ailleurs, les travaux de Jaworsky (1987), ont indirectement suggéré que le MGDG eucaryotique pouvait être le substrat de la désaturation du  $C_{18:2}$ .

La PC participe ainsi non seulement à la synthèse des DAG précurseurs des MGDG, mais aussi au moins partiellement à la désaturation du  $C_{18:2}$  en  $C_{18:3}$ .

Il existe donc deux sites de biosynthèse des acides gras insaturés ; un au niveau du réticulum endoplasmique lié à la PC et un autre au niveau du chloroplaste lié au MGDG.

La biosynthèse des acides gras polyinsaturés à 18 carbones fait intervenir des désaturations successives et chaque étape est catalysée par une enzyme différente.

La première étape de désaturation a lieu dans le stroma, elle correspond à la désaturation du stéaroylACP en oléoylACP (C<sub>18</sub>:1ACP) par la stéaroylACP désaturase ou  $\Delta^9$  désaturase (Lindqvist et al., 1996), enzyme soluble dans le stroma des chloroplastes des feuilles et des graines en formation. Cette enzyme est unique dans le règne végétal dans lequel toutes les autres désaturases sont des protéines membranaires.

Cette enzyme isolée et purifiée à partir de nombreuses espèces végétales (Heinz, 1993 ; Harwood, 1996) est un homodimère (Ohlrogge et Browse, 1995) et requiert deux électrons et une molécule d'oxygène. La ferredoxine est le donneur d'électrons (Wada et al., 1993).

En 1996, l'équipe de Lindqvist a cristallisé la  $\Delta^9$  désaturase de ricin et a totalement élucidé sa structure tridimensionnelle ainsi que le mode de fonctionnement de son site actif.

Le C<sub>18</sub>:1ACP est soit utilisé *in situ* dans le chloroplaste où il est désaturé à son tour en C<sub>18</sub>:2 puis en C<sub>18</sub>:3 par des désaturases liées aux galactolipides, sulfolipides et PG, soit exporté vers le réticulum endoplasmique pour y être désaturé.

L'acide oléique transféré dans le cytosol est estérifié à la PC qui agit en tant que substrat de la désaturation. L'insertion des résidus oléoyl se ferait dans les molécules de PC soit à la suite de l'acylation d'une molécule de lysoPC par action d'une acyl transférase donnant l'oléoylPC, soit après des mécanismes d'échange de reste acyl entre l'oléoylCoA et la PC (Demandre et al., 1986). Ainsi, ces derniers ont noté la formation d'oléoylPC parallèlement à la disparition de l'oléoylCoA à partir de microsomes auxquels de l'oléoylCoA marqué a été fourni.

La technique de séparation par HPLC des espèces moléculaires de PC a permis à de nombreux auteurs dont Murphy et al., (1985) et Demandre et al., (1986), d'identifier les substrats et les produits de l'oléate désaturase.

Pour Murphy et al., (1985), l'espèce 16:0/18:1PC serait le substrat de l'oléate désaturase microsomale dans les feuilles de pois ; celle-ci s'attaquerait préférentiellement aux résidus oléoyl situés en position sn-2 du glycérol de la PC.

Dans le parenchyme de tubercule de pomme de terre en survie, Demandre et al., (1986) ont identifié trois espèces moléculaires majeures comme substrats possibles de la désaturation à savoir : 16:0/18:1PC, 18:2/18:1PC et 18:1/18:2PC.

### • Localisation de la désaturation du C18 :2 en C18 :3

La désaturation de l'acide linoléique en acide linoléique par la voie eucaryotique, le lieu de cette désaturation et les substrats utilisés font l'objet de recherches de nombreuses équipes.

Les travaux de Roughan et Slack, (1982) et Davies et Harwood, (1983) avaient identifié le MGDG comme seule source de 18 :3 dans les tissus photosynthétiques. De même que les travaux de Heinz et Roughan (1983) ont démontré que le 18 :2 MGDG pouvait être converti en 18 :3 MGDG au niveau de l'enveloppe des chloroplastes grâce à des désaturases utilisant la ferredoxine comme source d'électrons.

Des études effectuées *in vivo* et les analyses de DAG contenant des acides gras triinsaturés dans les plantes en C<sub>18:3</sub> ont suggéré que la désaturation du C<sub>18:2</sub> en C<sub>18:3</sub> a lieu dans la PC.

Par ailleurs les travaux de Roughan et Slack (1982) ont démontré que dans les graines oléagineuses, le 18 :2 PC pouvait être converti en 18 :3 PC au niveau du réticulum endoplasmique.

De leur côté, Lem et Williams (1981) avaient prouvé l'existence d'un site extrachloroplastique de synthèse du C18 :3 lié à la PC dans les tissus foliaires de *Vicia faba* et montré que ce site était relativement insensible au BASF13 338 reconnu comme herbicide bloquant la désaturation du C18 :2 en C18 :3 liée au MGDG.

Il existe donc deux types de linoléate désaturase l'une chloroplastique liée au MGDG et l'autre extrachloroplastique liée à la PC au niveau du réticulum endoplasmique.

Les données actuelles sur les désaturases ont énormément bénéficié de la caractérisation des mutants d'*Arabidopsis* déficients en une étape spécifique de désaturation (Browse et Somerville, 1991 ; Ohlogge et Browse, 1995). Ces mutants constituent un énorme potentiel pour la compréhension du métabolisme lipidique, la confirmation de l'existence de deux séries d'activité désaturases, leur site d'action subcellulaire et leur substrat spécifique

Sept classes de gènes ont été identifiés (Fig. 10) :

- Les gènes *FAD2* et *FAD3* codant pour les n-6 ou  $\Delta^{12}$  et n-3 ou  $\Delta^{15}$  désaturases localisées dans les membranes du réticulum endoplasmique.

- Quatre gènes *FAD4*, *FAD5*, *FAD6* et *FAD7* codant pour les désaturases des membranes chloroplastiques qui sont respectivement la  $\Delta^3$  trans désaturase, la  $\Delta^7$  désaturase, la n-6 ou  $\omega^6$  désaturase et la n-3 ou  $\omega^3$  désaturase.

Un cinquième gène a été identifié il s'agit du gène *FAD8* qui code pour une n-3 ou  $\omega^3$  désaturase qui ne s'exprime que dans des conditions de basse température (Brockman et *al.*, 1990).

Les sept désaturases mentionnées se distinguent par la spécificité de leur substrat, leur localisation sub-cellulaire (Tab. I) et éventuellement leur mode de régulation.

Tableau I : Principales désaturases d'*Arabidopsis*. GL : Galactolipides, SL : Sulfolipides. Dés : désaturase ; Fer. : ferrédoxine ; Ret. Endopl. : réticulum endoplasmique ; cyt b5 : cytochrome b5. ( Miquel et Browse ,1998).

Gène	Nom de l'Enzyme	Substrat	Localisation	Précurseur	Produit	Donneur d'électrons
<i>FAB2</i>	$\Delta^9$ Dés.	Acyl ACP	Chloroplaste	18 :0 <b>ACP</b>	$\Delta^9$ 18 :1 <b>ACP</b>	Fer.
<i>FAD2</i> <i>FAD3</i>	$\Delta^{12}$ Dés. $\Delta^{15}$ Dés.	PC PC	Rét.Endopl.	$\Delta^9$ 18 :1 <b>PC</b> $\Delta^{9-12}$ 18 :2 <b>PC</b>	$\Delta^{9-12}$ 18 :2 <b>PC</b> $\Delta^{9-12-15}$ 18 :3 <b>PC</b>	Cyt b5 Cyt b5
<i>FAD4</i>	$\Delta^{3t}$ Dés.	PG	Chloroplaste	16 :0 <b>PG</b>	$\Delta^{3t}$ 16 :1 <b>PG</b>	Fer.
<i>FAD5</i>	$\Delta^7$ Dés.	GL-SL	Chloroplaste	16 :0	$\Delta^7$ 16 :1	Fer.
<i>FAD6</i>	$\omega^6$ Dés.	GL-SL GL-SL-PG	Chloroplaste	$\Delta^7$ 16 :1 $\Delta^9$ 18 :1	$\Delta^{7-10}$ 16 :2 $\Delta^{9-12}$ 18 :2	Fer. Fer.
<i>FAD7</i> <i>FAD8</i>	$\omega^3$ } Dés.	GL-SL GL-SL-PG	Chloroplaste	$\Delta^{7-10}$ 16 :2 $\Delta^{9-12}$ 18 :2	$\Delta^{7-10-12}$ 16 :3 $\Delta^{9-12-15}$ 18 :3	Fer. Fer.

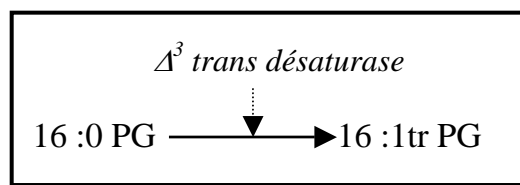
Les gènes *FAD2* et *FAD3* ont été isolés par « gène tagging » qui consiste à inactiver ou « étiqueter » le gène par insertion au hasard d'un plasmide d'*Agrobacterium tumefaciens* (ADNt) et /ou par la technique de la « marche sur le chromosome » ou « map based chromosome walking » qui consiste à progresser le long de l'ADN en clonant des séquences légèrement chevauchantes à partir d'une séquence initiale connue (Arondel et al., 1992).

Ces gènes ont été ensuite utilisés comme sonde hétérologue pour faciliter le clonage des gènes des enzymes chloroplastiques *FAD6* (Hitz et al., 1994), *FAD7* (Iba et al., 1993 ; Yadav et al., 1993) et *FAD8* (Gibson et al., 1994) chez *Arabidopsis* et chez d'autres plantes notamment les oléagineux comme le colza, le soja, le tournesol (Ohrlogge et Browse, 1995).

### 2.4.2 - Désaturases chloroplastiques

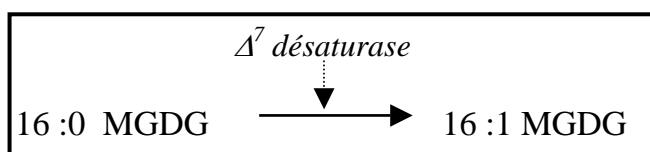
Parmi les désaturases chloroplastiques deux sont hautement spécifiques de leur substrat .

- Le produit du gène *FAD4* est responsable de l'insertion de la double liaison  $\Delta^3$  trans dans le C16 :0 estérifié en position sn-2 du PG il s'agit de la PG  $\Delta^3$  trans désaturase.



Des mutants de *Chlamydomonas reinhardtii* déficients en PG 16 :1tr se sont révélés incapables de réaliser la trimérisation des monomères LHCII et de former des empilements granaires (Dubertret et al., 1994 ; El Maani et al., 1998).

- Le produit du gène *FAD5* ou  $\Delta^7$  désaturase ou encore n-9 désaturase permet la synthèse du  $\Delta^7$  16 :1 sur le MGDG (et éventuellement sur le DGDG).



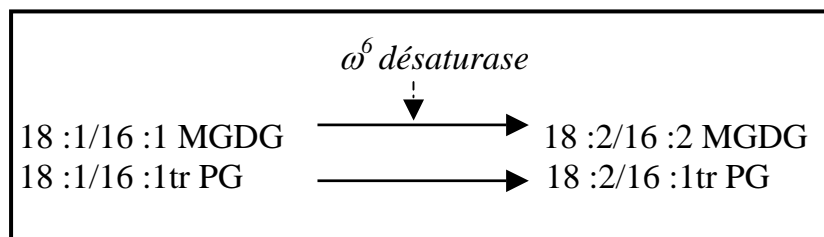
La désaturation du C16 :0 est généralement restreinte à la position sn-2 du MGDG. Cependant dans certains cas, le C16 :0 en position sn-1 du MGDG peut être désaturé (Heinz, 1993).

Chez le mutant *fad5* il y a accumulation du C16 :0 et une absence quasi totale d'acides gras insaturés à 16 carbones (Kunst et al., 1989a).

La diminution de la désaturation du C16 :0 en position sn-2 du MGDG est accompagnée d'une réduction de la proportion de MGDG procaryote dans le mutant et d'une augmentation du MGDG eucaryote. En effet une proportion de C16 :0ACP

qui devrait entrer dans la voie procaryote est convertie en C18 :1ACP et dirigée vers le compartiment extrachloroplastique pour la synthèse des lipides de type eucaryote. Le mutant *fad5* présente une légère réduction de la teneur en chlorophylles mais en apparence il ne se distingue pas du type sauvage du point de vue croissance dans les conditions standard de croissance. Cependant à des températures au dessus de 28°C le mutant croît plus rapidement que le type sauvage ce qui suggère que l'altération de la composition en acides gras augmente la tolérance thermique du mutant (Kunst *et al.*, 1989b).

- Le gène *FAD6* code pour la n-6 désaturase ou  $\omega^6$  désaturase qui désature aussi bien le C16 :1 que le C18 :1. Cette désaturase n'est spécifique ni de la longueur de la chaîne acyl ni de sa position sur le squelette glycérol ni de la tête du lipide.



La mutation *fad6* entraîne une déficience à la fois des acides gras à 16 carbones et à 18 carbones et une augmentation du C16 :1  $\Delta^7$  et du C18 :1  $\Delta^9$ .

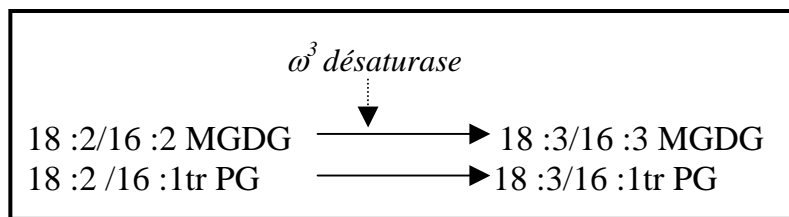
Cette mutation n'affecte pas la composition en acides gras des graines et des racines ce qui montre que ce gène contrôle l'activité de la n-6 désaturase chloroplastique.

L'analyse de la composition en acides gras de la majorité des lipides foliaires indique que aussi bien la position sn-1 que la position sn-2 de tous les lipides du chloroplaste (MGDG, DGDG, SQDG et PG) sont affectés et qu'il n'y a qu'un effet mineur sur le degrés d'insaturation des lipides des membranes extrachloroplastiques.

Dans le mutant *fad6*, il y a diminution de la proportion des lipides chloro-plastiques synthétisés par la voie procaryote et augmentation des lipides chloroplastiques désaturés par la voie eucaryote ce qui suggère un mécanisme régulant le flux des acides gras à travers les deux voies.

Le mutant *fad6* n'est phénotypiquement pas différent du type sauvage quand la température de croissance est 22°C. Cependant quand la température de croissance est basse (5°C), les feuilles du mutant deviennent chlorotiques et la vitesse de croissance est très réduite. La mutation *fad6* qui engendre des lipides chloroplastiques plus saturés rend les plantes sensibles à un abaissement de la température de croissance.

- Les locus *FAD7* et *FAD8* contrôlent les activités des n-3 ou  $\omega^3$  désaturases qui convertissent aussi bien les acides diénoïques à 16 carbones que ceux à 18 carbones en acides triénoïques.



Le gène *FAD7* s'exprime dans les conditions normales de croissance alors que le gène *FAD8* ne le fait que dans des conditions particulières (basses températures).

Les mutants *fad7* montrent une augmentation des niveaux de 16 :2 $^{\Delta 7-10}$  et de 18 :2 $^{\Delta 9-12}$  et une diminution du niveau de 16 :3 $^{\Delta 7-10-13}$  et du 18 :3 $^{\Delta 9-12-15}$  (Browse et al., 1986). L'effet de la mutation *fad7* est pleinement manifesté quand les plantes croissent à des températures supérieures à 28°C. A 18°C, la composition en acides gras des lipides du mutant et du type sauvage est la même ; cette suppression du phénotype mutant à basse température est due à l'induction ou à l'activation du gène *FAD8* (Brockman et al., 1990).

Le mutant *fad7* présente une déficience en désaturation aussi bien des lipides chloroplastiques que des lipides des membranes extrachloroplastiques (Browse et al., 1986). Ceci serait dû à un blocage dans l'exportation des acides gras polyinsaturés des plastes vers le réticulum endoplasmique.

Les désaturases chloroplastiques utilisent la ferrédoxine réduite comme donneur intermédiaire des électrons nécessaires à la réduction de l'oxygène en eau et du NADPH+H<sup>+</sup> (Heinz, 1993) tout comme celle des cyanobactéries (Wada et al., 1993). Des protéines fer-soufre et divers transporteurs d'électrons ont été caractérisés dans l'enveloppe de chloroplastes d'épinard (Jäger-Vottero et al., 1997) ils constituent probablement les éléments d'une chaîne de transfert d'électrons tout à fait originale car dépourvue de cytochromes. Cependant la preuve sans ambiguïtés de la ferrédoxine réduite comme véritable donneur des électrons aux désaturases des acides gras dans les membranes de l'enveloppe fait défaut.

### 2.4.3 - Désaturases extrachloroplastiques

Les désaturases FAD2 ou  $\Delta^{12}$  désaturase et FAD3 ou  $\Delta^{15}$  désaturase codées par les gènes *FAD2* et *FAD3*, désaturent respectivement le C<sub>18:1</sub> et le C<sub>18:2</sub> au niveau du réticulum endoplasmique. Elles requièrent du NADH+ H<sup>+</sup>, du Cytochrome b<sub>5</sub> comme transporteur des électrons et de l'oxygène (Fig. 11).

Ces enzymes sont caractérisées comme étant des PC désaturases (Browse et Somerville, 1991) ; il est cependant possible que ces désaturases utilisent d'autres phospholipides (Wallis et Browse 2002).

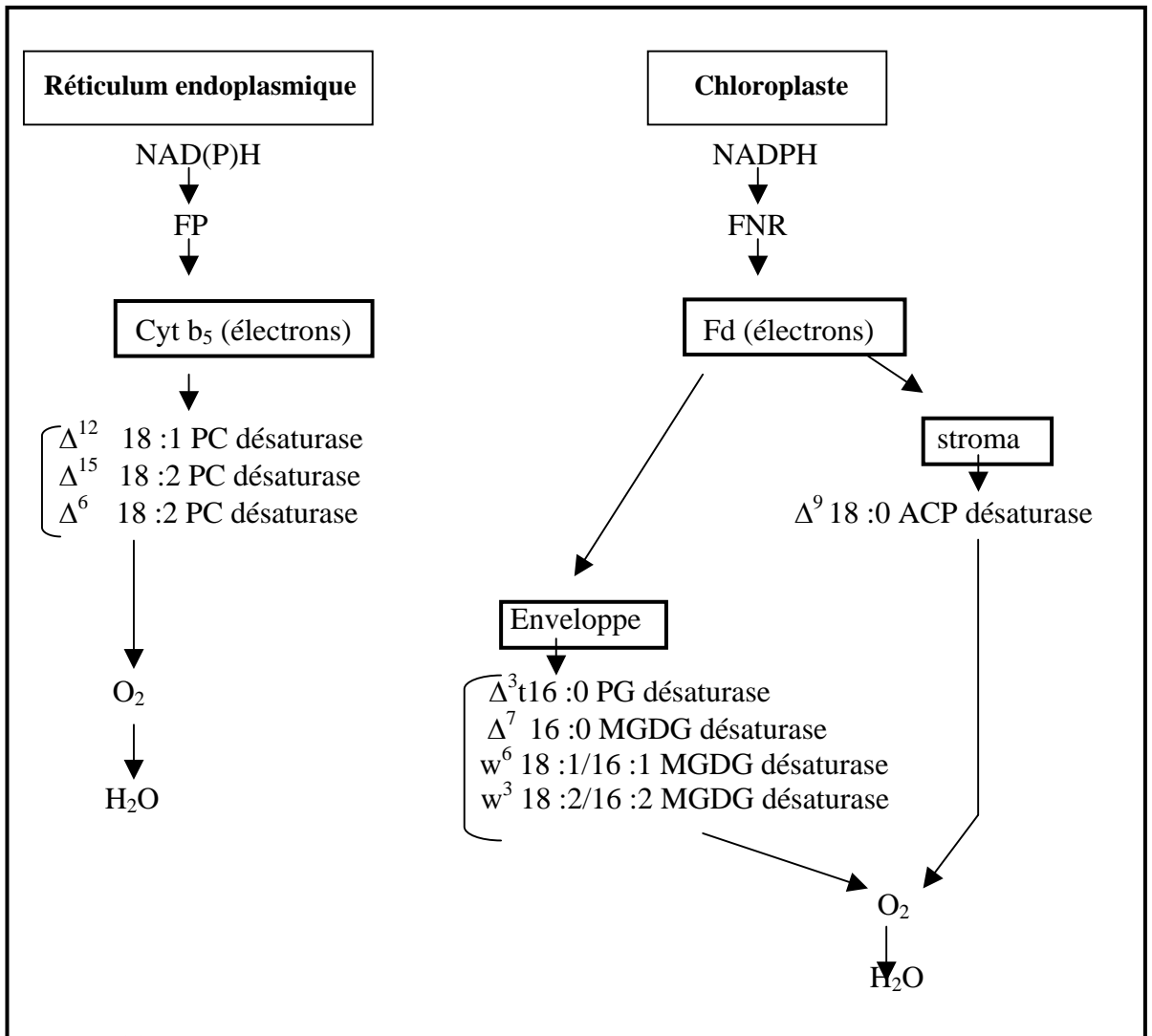
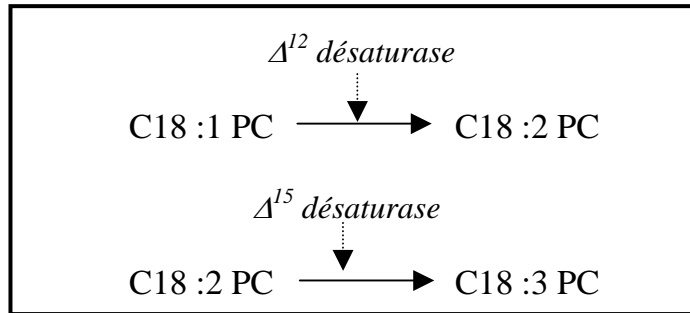


Figure 11 : Schéma hypothétique de désaturation des acides gras par des désaturases solubles ou membranaires. (FP : flavoprotéine, Fd: ferrédoxine, FNR : ferrédoxine NADP oxydo réductase).



La  $\Delta^{12}$  désaturase accepte le 18 :1 en position sn-1 et sn-2 de la PC avec cependant une légère affinité pour la position sn-2 (Murphy et *al.*, 1985 ; Demandre et *al.*, 1986).

Les mutants *fad2* d'*Arabidopsis* sont déficients en 18 :1 désaturase liée au réticulum endoplasmique (Miquel et Browse, 1992). Cette mutation *fad2* peut s'exprimer dans tous les tissus : graines, racines et feuilles.

Les mutants *fad2* poussant à 22°C sont semblables du point de vue croissance et apparence aux plantes sauvages. Quand ils sont transférés au froid (6°C), ces mutants finissent par mourir alors que les sauvages continuent à se développer normalement (Miquel et *al.*, 1993). Ceci montre bien que les acides gras insaturés des membranes sont essentiels au maintien des fonctions cellulaires et à la viabilité des plantes à basses températures.

Des études récentes menées par Caiveau et *al.*, (2001), ont montré que la mutation *fad2* compromet également la fonction mitochondriale.

Le double mutant *fad2-fad6* accumulant de fortes proportions d'acides gras monoinsaturés est fortement chlorosé et rend les plantes hétérotrophes vis à vis du carbone (McConn et Browse, 1998) d'où l'importance des lipides polyinsaturés dans le processus photosynthétique.

- La FAD3 désaturase ou  $\Delta^{15}$  désaturase est responsable de la synthèse du 18 :3 lié à la PC mais aussi aux autres phospholipides des cellules racinaires et foliaires et dans les TAG des graines (Browse et *al.*, 1993). Cette enzyme agit sur les groupes acyls en position sn-1 et sn-2.

La mutation *fad3* entraîne une déficience en 18 :3 <sup>$\Delta^{9,12,15}$</sup>  et une accumulation du 18 :2 <sup>$\Delta^{9,12}$</sup> . Le phénotype de la mutation *fad3* est retrouvé dans les feuilles, les racines et les semences.

Les lipides chloroplastiques sont peu affectés par les mutation *fad2* et *fad3* (Browse et *al.*, 1993) du fait de la présence dans les chloroplastes des isoenzymes 18 :1/16 :1 désaturases et 18 :2/16 :2 désaturases.

Des triples mutants produits par combinaisons de mutations au niveau de trois loci *fad3*, *fad7* et *fad8* ne contiennent ni C18 :3 ni C16 :3. Les plantes ne se distinguent pas du type sauvage au stade végétatif et se développent normalement à 22°C. Ces triples mutants ont cependant révélé que les acides triénoïques dans les

lipides membranaires sont indispensables à la tolérance de l'appareil photosynthétique aux basses températures (Routaboul et *al.*, 2000 ; Orlova et *al.*, 2003) et au stress salin (Sakamoto et Murata, 2002.).

#### **2.4.4 - Flux des acides gras entre les compartiments chloroplastique et extrachloroplastique**

Les plantes supérieures utilisent deux voies pour la synthèse de leur glycérolipides : la voie eucaryote et la voie procaryote.

Chez les plantes en C<sub>16:3</sub> telles l'épinard, l'arabidopsis, le colza, le tabac..., les deux voies coexistent.

Chez les plantes en C<sub>18:3</sub> telles l'orge, le pois, le soja, l'haricot, la voie procaryote ne contribue que faiblement à la synthèse des lipides chloroplastiques (synthèse du PG seulement) et tous les autres lipides chloroplastiques sont entièrement dépendants de la voie eucaryote.

Un flux d'acides gras existe donc entre les deux voies. Ce flux varie entre différentes espèces et parfois au sein d'une même espèce il varie en fonction des conditions externes ou de l'environnement.

Chez les mutants *act1* déficients en glycérol 3P acyl transférase de la voie procaryote, le taux des lipides chloroplastiques est presque normal grâce à l'augmentation du flux d'acides gras provenant de la voie eucaryote (Kunst et *al.*, 1988) ; ce qui démontre des mécanismes de régulation de la biosynthèse des glycérolipides afin d'optimiser les fonctions membranaires.

Chez le mutant *fad6* d'arabidopsis qui présente une réduction des acides gras insaturés fabriqués par la voie procaryote, un flux des acides gras de la voie eucaryote vers le chloroplaste est également observé ce qui traduit un mécanisme régulant le flux des acides gras à travers les deux voies procaryote et eucaryote.

Dans les mutants *fad2-fad3* qui sont incapables de désaturer le 18 :1 en 18 :2 puis le 18 :2 en 18 :3 dans le compartiment extrachloroplastique (réticulum endoplasmique), la proportion de C<sub>16:3</sub> dans les feuilles augmente avec le même pourcentage et l'analyse détaillée de MGDG *fad2* révèle une diminution de 30% des espèces eucaryotes et une augmentation des espèces procaryotes alors que dans le cas des mutations *fad5* (incapables de désaturer le 16 :0 MGDG) et *fad6* (incapable de désaturer le 16 :1 MGDG ou 18 :1 MGDG), un remplacement des espèces procaryotes saturées par des espèces eucaryotes insaturées est observé. Les proportions de MGDG procaryotes ne sont donc pas fixées elles peuvent répondre avec souplesse aux signaux environnementaux.

Les plantes en C<sub>16:3</sub> ont une plus grande flexibilité dans leur métabolisme lipidique : lorsque la désaturation microsomale (réticulum endoplasmique) est diminuée (mutation *fad2- fad3*) les espèces eucaryotes sont remplacées par les espèces procaryotes.

Lorsque la désaturation est insuffisante dans le chloroplaste ( mutants *fad5-fad6*) les espèces procaryotes du MGDG sont remplacées par les espèces eucaryotes.

La cellule végétale révèle donc une capacité d'adaptation de son métabolisme lipidique d'une souplesse remarquable.

Des mutants affectés dans leur métabolisme lipidique compensent la mutation tout en conservant une composition lipidique proche de la normale. Cet ajustement est permis par l'organisation coopérative réticulum/ chloroplaste.

#### 2.4.5 - Autres désaturases

La  $\Delta^6$  désaturase permet la synthèse de l'acide  $\gamma$  linoléique ( $\gamma 18 : 3\Delta^{6,9,12}$ ) ou de l'acide octadécatétraénoïque ( $18 : 4\Delta^{6,9,12,15}$ ) en introduisant une double liaison dans les acides linoléique ou linoléique en position sn-2 de la PC.

La  $\Delta^5$  désaturase catalyse la désaturation d'un acide gras à 20 carbones provenant de l'élongation de l'acide  $\gamma$  linoléique permettant ainsi la synthèse de l'acide arachidonique  $C_{20} : 4\Delta^{5,6,9,12}$  (Fig. 12).

La synthèse de l'acide  $\gamma$  linoléique et de l'acide arachidonique implique une sous classe de désaturases microsomales appelées « front end désaturases » faisant partie de la superfamille des cytochromes b5 fusion désaturases (Napier et al., 1999, 2003 ; Sayanova et al., 2003) ; ces désaturases introduisent des doubles liaisons entre celles déjà existantes et le COOH terminal de la molécule d'acide gras, s'opposant ainsi à la séquence normale de désaturation vers le méthyl terminal. Le premier exemple de désaturase « front end » cloné chez les plantes est celui de la bourrache (*Borrigo officinalis*) qui est l'une des rares plantes à fabriquer l'acide  $\gamma$  linoléique (Sayanova et al., 1997). Récemment, Whitney et al., (2003) ont identifié une  $\Delta^6$  désaturase chez les renonculacées.

Grâce à la combinaison d'approches génétiques et biochimiques, chez *Arabidopsis* des gènes codant pour un certain nombre de nouvelles activités enzymatiques ont été clonés (Miquel et Browse, 1998). Parmi ces enzymes qui sont proches de la  $\Delta^{12}$  désaturase microsomale, sont retrouvées celles qui introduisent une liaison acétylénique, des groupes hydroxy ou époxy en position 12 de l'acide oléique (Van de Loo et al., 1995). Ces rares modifications sont retrouvées chez quelques espèces de plantes seulement. Cependant les lipides formés qui contiennent ces acides gras peuvent être utiles à la chimie industrielle (production du nylon, des peintures, du vernis et du plastique).

#### 2.4.6 - Rôles des acides gras Insaturés

Chez les plantes, les acides gras insaturés 18 :2 et 18 :3 sont essentiels pour le fonctionnement des membranes (McConn et Browse, 1998). Ils constituent également les acides gras insaturés des graines oléagineuses sources de ces acides gras dans l'alimentation humaine, les mammifères ayant perdu les activités  $\Delta^{12}$  et  $\Delta^{15}$  désaturases.

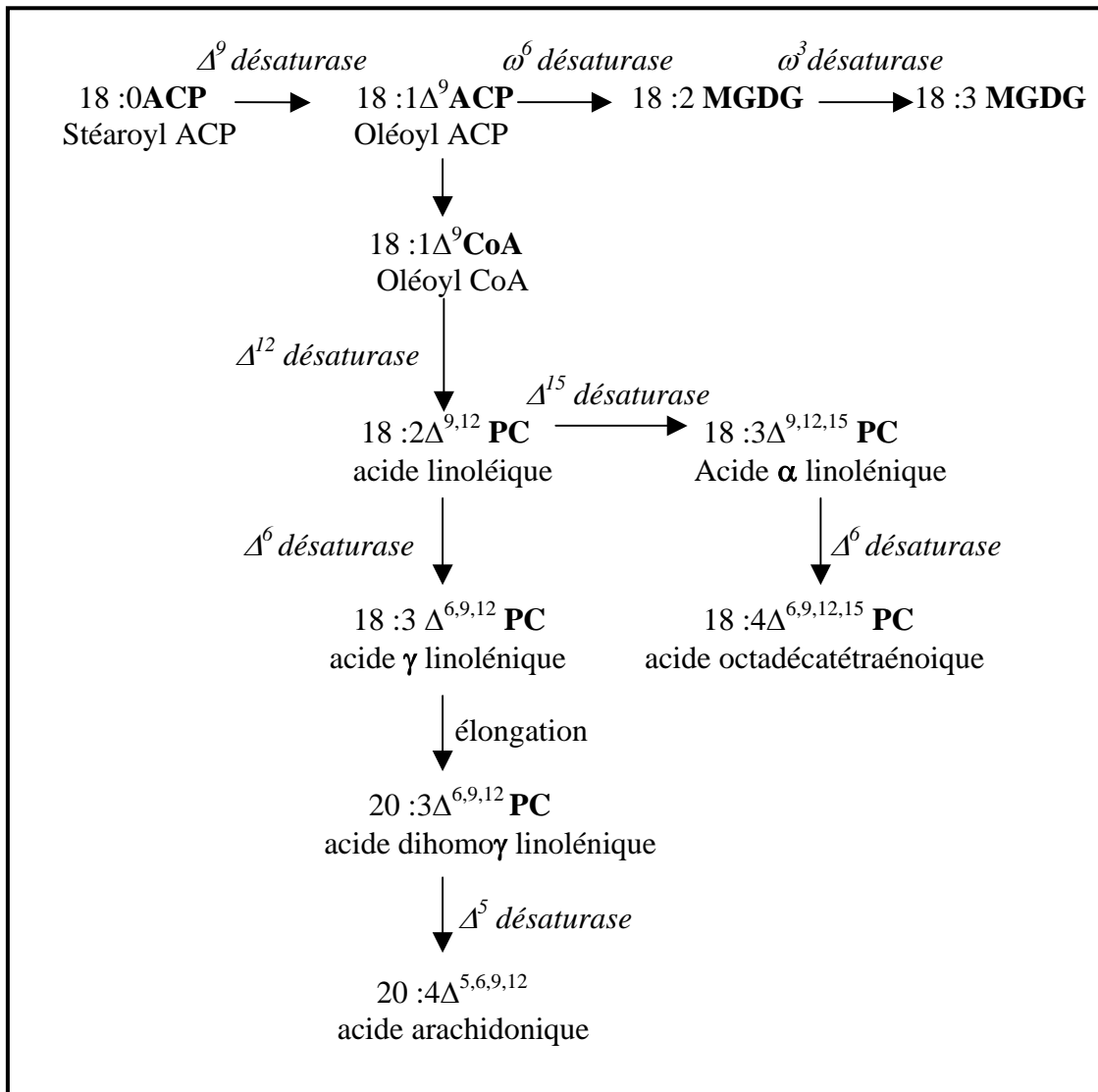


Figure 12 : voies de biosynthèse des acides gras polyinsaturés à 18 carbones chez les végétaux.

Chez les animaux, les acides linoléique et linolénique sont indispensables à l'organisme non seulement en tant qu'éléments structuraux dans les membranes cellulaires, mais aussi en tant que précurseurs d'acides gras polyinsaturés (tels l'acide arachidonique).

L'acide  $\gamma$  linolénique intéresse les industries pharmaceutiques et cosmétiques mais aussi le monde médical car il est précurseur de l'acide arachidonique dont dérivent les prostaglandines, hormones qui interviennent chez les mammifères dans les processus inflammatoires, la régulation de la pression sanguine et la physiologie de la reproduction. Sa synthèse diminue avec l'âge et est réduite en cas de diabète d'où l'intérêt de son apport dans l'alimentation (Horrobin, 1992 ; Neuringer *et al.*, 1988). Les acides gras insaturés sont commercialement très importants car la valeur nutritionnelle des huiles, leur qualité et leur stabilité oxydative sont affectées par le taux d'insaturation de ces acides gras.

L'huile de soja contient 8% d'acide  $\alpha$  linolénique (C18 :3) alors que les autres huiles contiennent moins de 2%. A cause de sa forte teneur en C18 :3, l'huile de soja n'est pas désirable en tant que huile de cuisson (instabilité car elle s'oxyde facilement et elle dégage une mauvaise odeur lors des fritures) ; elle est cependant très appréciée en tant que huile d'assaisonnement.

## **2.5 - Molécules signal dérivées des lipides**

### **2.5.1 – Signalisation lipidique**

Le métabolisme lipidique peut déboucher sur la production de molécules signal spécifiques.

Dans la cellule animale il est établi qu'une partie du phosphatidylinositol ou PI lié à la membrane cytoplasmique joue un rôle important dans le processus de transmission des signaux (par exemple de type hormonal). Le PIP<sub>2</sub> ou phosphatidylinositol 4,5 biphosphate est le plus important des dérivés phosphorylés du phosphatidylinositol connu comme phosphoinositide. Lorsqu'un signal active un récepteur membranaire, une phospholipase C clive le PIP<sub>2</sub> en inositol triphosphate IP<sub>3</sub> et en DAG agissant tous les deux en tant que messagers secondaires intracellulaires.

L'IP<sub>3</sub> induit le relargage des ions Ca<sup>2+</sup> du réticulum endoplasmique provoquant ainsi l'activation des kinases calcium dépendantes alors que les DAG activent les kinases de type C par des mécanismes plus complexes faisant intervenir d'autres phospholipides tels la phosphatidylsérine.

L'action de l'IP<sub>3</sub> sur la libération du Ca<sup>2+</sup> à l'intérieur du cytosol et les processus de régulation cellulaire ont été démontrés dans de nombreux systèmes végétaux notamment les cellules de garde des stomates (Schroeder *et al.*, 2001).

### **2.5.2 - Synthèse de l'acide jasmonique à partir du 18 :3**

L'une des voies actives impliquées dans le métabolisme lipidique des plantes au niveau des membranes de l'enveloppe des plastes est la voie des oxylipines (acide jasmonique) considérées comme des produits de dégradation des lipides

occasionnée par des conditions de stress. En effet, les acides gras poly-insaturés (C18 :2 et C18 :3) provenant des lipides polaires sous des conditions externes variées (lésion, attaque par un pathogène..) sont convertis en hydroperoxydes d'acides gras polyinsaturés ou oxylipines (Blee et Joyard, 1996).

La première étape de synthèse de l'acide jasmonique est la libération du 18 :3 à partir des glycérolipides membranaires par une phospholipase A<sub>2</sub>. Une 13 lipoxygénase et une alléne oxyde synthétase agissent séquentiellement sur l'acide gras libre pour donner l'acide 12,13 époxyoctadécatriénoïque.

Ces oxylipines sont considérées comme une famille de régulateurs de croissance (acide jasmonique) et des composés de défense. L'acide jasmonique est impliqué dans la régulation d'une multitude de processus physiologiques tels la morphogénèse, la sénescence, la défense contre les herbivores et les pathogènes (Wallis et Browse, 2002). A très basse concentration l'acide jasmonique est capable d'induire des gènes spécifiques tels ceux des inhibiteurs des protéinases et des gènes de défense (Gundlach et *al.*, 1992 ; Li et *al.*, 2003).

Les mécanismes régulant la biosynthèse des lipides ne sont pas encore tout à fait bien cernés ; cependant il est clair qu'il s'exerce un contrôle à des étapes variées de la biosynthèse des lipides (modulation des têtes polaires des lipides, du degrés de désaturation, de la longueur de la chaîne d'acides gras et du flux entre les deux voies de biosynthèse des lipides).

L'utilisation de mutants permet d'affiner les connaissances sur l'échange mutuel des lipides entre les systèmes membranaires des plastes et ceux du cytoplasme et de comprendre les mécanismes de la flexibilité de cette coopération sub-cellulaire et sa régulation en réponse aux déficiences et aux conditions externes (Browse et *al.*, 1989 ; Browse et Somerville, 1991 ; Ohlrogge et *al.*, 1991).

### **3 - Les herbicides.**

La synthèse d'un grand nombre de molécules herbicides ou xénobiotiques susceptibles de bloquer le développement de certaines espèces de végétaux indésirables, a contribué à un accroissement spectaculaire du rendement des cultures utiles à l'économie humaine.

Les végétaux traités par les herbicides manifestent un ensemble de transformations qui représentent soit les symptômes visibles d'une action pouvant atteindre toutes les cellules du végétal, soit les manifestations d'un dysfonctionnement concernant seulement certains ensembles cellulaires engendrant par la suite un dérèglement du fonctionnement de l'organisme végétal.

Certains herbicides peuvent être toxiques par contact racinaire tels les dithiocarbamates (Tissut et Séverin, 1984) ou foliaire cas des composés phénoliques (Belbachir et *al.*, 1982) ; ils sont peu ou pas transportés et n'agissent qu'au voisinage de leur point d'application y provoquant l'apparition des nécroses ; ce sont des herbicides de contact.

D'autres herbicides sont systémiques, ils pénètrent dans la plante et y circulent. Le transport est alors apoplastique quand il a lieu de la racine vers les feuilles par le xylème, il s'agit d'herbicides à application racinaire et à action foliaire (triazines, urées, pyridazinones...) ou symplastique quand le transport a lieu par le phloème (amitrole, cyclohexanediones...) (Tissut et Séverin, 1984).

Dans certains cas les herbicides peuvent être transportés par les deux voies c'est le cas des phytohormones de synthèse (Picloram, Dicamba, 2,4 D) (Scalla, 1991).

Les réponses des plantes aux molécules chimiques dépendent de facteurs endogènes (caractères génétiques, anatomie et morphologie de la plante) et exogènes (dose de la molécule herbicide et environnement).

Un herbicide est efficace lorsqu'il détruit sélectivement les « mauvaises herbes » sans affecter la plante cultivée. La recherche de la sélectivité d'action des herbicides a été et demeure une préoccupation permanente des agronomes.

La sélectivité qui résulte d'une sensibilité différentielle à l'herbicide des plantes traitées, peut avoir diverses causes dont la différence dans la pénétration de l'herbicide, la mobilité au sein du végétal, la différence dans les valeurs des concentrations ou doses conduisant à des réactions toxiques ou tératologiques ou encore la moindre affinité de l'herbicide pour les molécules ou protéines cibles. La sélectivité est aussi associée à des différences dans la capacité de telle ou telle espèce à métaboliser ou à détruire le produit absorbé.

Une grande majorité des espèces possèdent un système de détoxification comportant des réactions de conjugaison, d'hydroxylation, de déalkylation ou encore d'oxydation de la molécule herbicide faisant intervenir des monooxygénases CytP<sub>450</sub> pouvant selon le cas, entraver ou favoriser l'activité de la molécule étrangère (Thies et *al.*, 1996). La sélectivité d'un herbicide est fondée sur cette propriété de détoxification par la plante qui n'atteint pas le même niveau d'efficacité chez toutes les espèces (si toutes les plantes répondaient de manière identique, la sélectivité herbicide n'existerait pas)

Grâce à leur métabolisme toutes les plantes peuvent en principe transformer les herbicides organiques. Quand les transformations sont rapides et intenses, la plante résiste à l'herbicide. Cette résistance est très souvent obtenue par la mise en jeu de plusieurs mécanismes convergents tels l'intensité du métabolisme, la faible vulnérabilité de la cible et les systèmes limitant l'absorption et le transport vers la cible.

Les plantes résistantes qui conservent leur intégrité cellulaire en présence de l'herbicide sont celles qui seront capables de développer de manière optimale leur aptitude à la métabolisation du produit.

La résistance d'une plante à un herbicide est également fonction de son état physiologique : stade de développement au moment du traitement, de la nutrition minérale, de sa vigueur et de son état sanitaire.

Le désherbage sélectif peut cependant engendrer des changements importants de la flore adventice des cultures, créant des problèmes écologiques et agricoles nouveaux.

### 3.1 - Action des herbicides au niveau cellulaire

L'étude des cibles cellulaires des herbicides représente un domaine de recherche familier aux physiologistes. La compréhension du mode d'action des herbicides a constitué et constitue un outil dans la recherche du métabolisme des plantes et a facilité leur application dans différentes pratiques agricoles.

L'action des herbicides au niveau cellulaire est complexe et variable ; néanmoins il existe des sites primaires d'action qui représentent les maillons fragiles de l'activité cellulaire dont le blocage entraîne plus ou moins directement la mort de la plante.

Ainsi : les phytohormones de synthèse induisent des troubles du développement ou de la croissance (Scalla, 1991). Les dinitroanilines sont des antimétabolites bloquant les divisions cellulaires (Duke, 1990). Les urées substituées (DCMU) et les triazines inhibent la photosynthèse en bloquant le transfert des électrons au niveau du photosystème II en se liant au site de fixation de la quinone QB sur la protéine D<sub>1</sub> (Krieger-Liszky et Rutherford, 1998) empêchant ainsi la réoxydation de la quinone QA.

Le glyphosate (organophosphoré) qui bloque la biosynthèse des acides aminés aromatiques (Duke, 1990), et les sulfonilurées qui inhibent la biosynthèse des acides aminés à chaîne ramifiée (Mourad et King, 1992) perturbent les synthèses protéiques.

L'aminotriazole et le norflurazon sont des inhibiteurs de la synthèse des caroténoïdes (Sandmann et Albrecht, 1990).

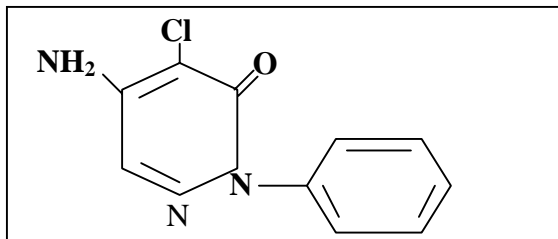
Certains herbicides affectent le métabolisme des lipides foliaires: les cyclohexanediones bloquent l'acétyl CoA carboxylase (Zagnitko et al., 2001), certains pyridazinones substitués tels le BASF 13 338 (St John, 1982) et le norflurazon (Abrous et al., 1998) inhibent la désaturation du C18 :2 en C18 :3 liée aux galactolipides et le San 6706 réduit la désaturation du C16 :0 en C16 :1 lié au PG (St John, 1982).

L'enveloppe des chloroplastes assure non seulement l'intégrité physique de ces organites, mais elle permet aussi les échanges entre le stroma et le reste de la cellule. Elle est également le siège de la synthèse de nombreux composés chloroplastiques tels que les caroténoïdes, le protochlorophyllide, les quinones, les glycolipides (MGDG, DGDG et SQDG) et le phosphatidyl glycérol ou PG (Joyard et al., 1998). Cette enveloppe est la cible de nombreux herbicides dont les pyridazinones (Duke, 1985).

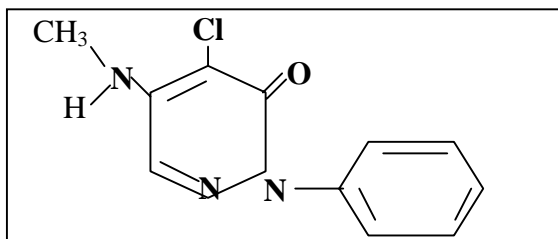
### 3.2 - Les pyridazinones

Les pyridazinones sont très utilisées dans les études de croissance des plantes à différentes températures (Dalla Vecchia et al., 2001), des désaturases intervenant dans la biosynthèse des caroténoïdes (Sandmann et Albrecht, 1990 ; Bramley, 1994 ; Simkin et al., 2000) et des lipides (Di Baccio et al., 2002).

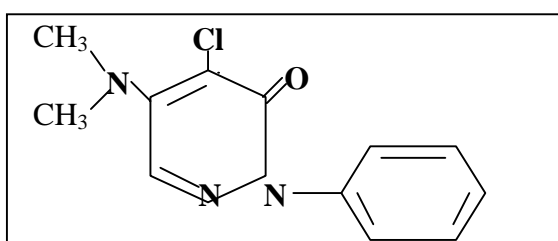
Les pyridazinones (Fig.13) constituent une famille importante regroupant un certain nombre de représentants qui varient selon leur(s) substitution(s):



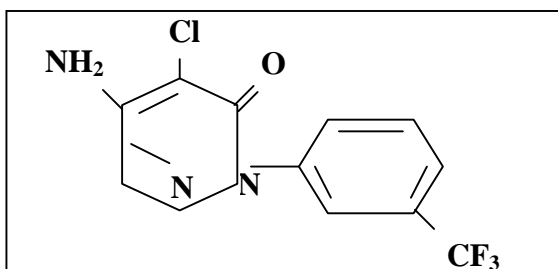
**Pyrazon** ou chloridazon non méthylé non trifluoré.  
4-chloro-5-amino-2-phényl-3-(2H) Pyridazinone.



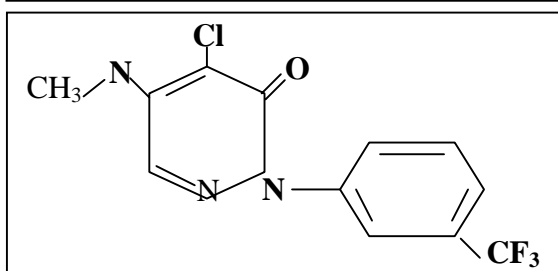
**San 133-410H** : pyridazinone méthylé non trifluoré.  
4-chloro-5-méthyl-amino-2-phényl-3-(2H)  
Pyridazinone.



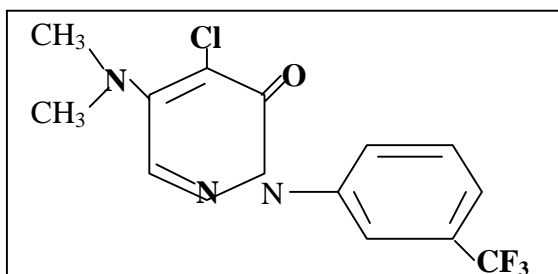
**San 9785 ou BASF 13 338** :pyridazinone diméthylé  
non trifluoré.  
4-chloro-5-diméthyl-amino-2-phényl-3-(2H)  
Pyridazinone.



**San 9774** : pyridazinone trifluoré non méthylé.  
4-chloro-5-amino-2  $\alpha, \alpha, \alpha$ , trifluoro méthyl phényl  
3-(2H) Pyridazinone.



**San 9789 ou norflurazon** : pyridazinone  
trifluoré méthylé.  
4-chloro-5-méthyl-amino-2  $\alpha, \alpha, \alpha$ , trifluoro  
méthyl phényl-3-(2H) Pyridazinone.



**San 6706 ou metflurazon** : pyridazinone trifluoré  
diméthylé.  
4-chloro-5-diméthyl-amino-2  $\alpha, \alpha, \alpha$ , trifluoro  
méthyl phenyl-3-(2H) Pyridazinone.

Figure 14 : Structure chimique de différentes molécules de pyridazinones.

Les mécanismes phytotoxiques des pyridazinones dépendent du degré de méthylation de la fonction amine ( $R_1$ ) et de l'absence ou de la présence d'un groupement trifluorométhyl ( $R_2$ ) sur leur cycle aromatique.

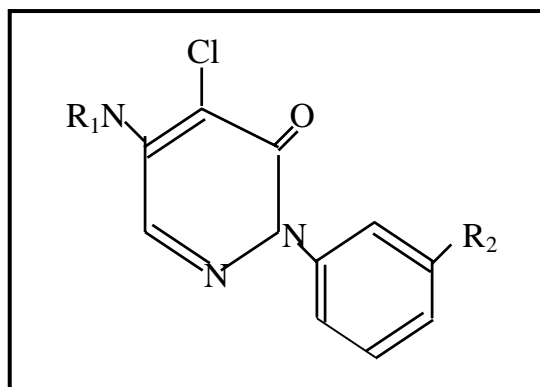


Figure 13 : Structure chimique de la famille des pyridazinones.

### 3.2.1 - Modes d'action des pyridazinones

L'étude des propriétés phytotoxiques entreprise depuis longtemps sur une série de pyridazinones montre que ces molécules peuvent exercer des modes d'action divers :

Une inhibition de la fixation du  $CO_2$  sur le ribulose 1,5 biphosphate et une photodestruction des ribosomes chloroplastiques (Duke, 1985).

Une inhibition du transfert des électrons au niveau du PSII de la chaîne photosynthétique effet analogue à celui de la DCMU, ou un blocage de la réaction de Hill sur les chloroplastes isolés ; les structures les plus actives étant le pyrazon et le metflurazon (Duke, 1985).

Une inhibition de la synthèse des caroténoïdes (Sandman et Böger, 1989) et une altération de la structure et du fonctionnement du chloroplaste (Davies et Harwood, 1983) entraînant le blanchiment des feuilles ou "photobleaching".

Une perturbation de la structure des lipides polaires des chloroplastes, se manifestant au niveau de l'insaturation des acides gras liés aux galactolipides (St John, 1982).

Rajasekharan et Sastry (1987) et Wilkinson (1991) utilisant diverses molécules de pyridazinones substituées ont montré que le mode d'action des pyridazinones dépend de la nature et du degré de substitution (Fig.14). Selon Wilkinson (1991), le groupe aminométhyl en position  $R_1$  du noyau pyridazinone semble indispensable à l'inhibition de la biosynthèse des pigments, mais d'après Scalla (1991), c'est la substitution trifluorométhyl ( $CF_3$ ) sur le noyau aromatique ( $R_2$ ) qui conférerait à la molécule chimique son effet inhibiteur sur la biosynthèse des pigments photosynthétiques. En effet, le San 9785 (ou BASF 13 338) et le San 133-410H qui présentent respectivement deux et un groupement méthyl sur la fonction amine mais qui sont dépourvus du groupement  $CF_3$  n'agissent pas sur la biosynthèse des pigments chloroplastiques ; alors que le norflurazon qui est un puissant inhibiteur de

Tableau II : Modes d'action de certains pyridazinones selon leur degrés de substitutions.

Nom de l'herbicide	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Effets	références
Pyrazon ou Chloridazon	NH <sub>2</sub>	H	<b>Inhibition de la réaction de Hill.</b>	Scalla, 1991
<b>BASF 13-338</b> ou San 9785	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	- <b>Métabolisme lipidique :</b> Inhibition de la désaturation du C18 :2 en C18 :3 liée au MGDG.	StJohn, 1982 ; Wilkinson, 1985
San 133 410H	NHCH <sub>3</sub>	H	- Inhibition de la réaction de Hill.	Scalla, 1991
<b>Norflurazon</b> ou San 9789	NHCH <sub>3</sub>	CF <sub>3</sub>	- <b>Biosynthèse des caroténoïdes :</b> inhibition de la phytoène désaturase.  - Métabolisme lipidique : Inhibition de la désaturation du C18 :2 en C18 :3 liée au MGDG.  -Inhibition de la réaction de Hill.	<b>Wilkinson, 1985</b>  Abrous et <i>al.</i> , 1998.  Scalla, 1991
<b>Metflurazon</b> ou San 6706	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CF <sub>3</sub>	- <b>Biosynthèse des caroténoïdes:</b> inhibition de la phytoène désaturase.  - Métabolisme lipidique : Inhibition de la désaturation du C18 :2 en C18 :3 liée au MGDG .  - Inhibition de la réaction de Hill.	Scalla, 1991
San 9774	NH <sub>2</sub>	CF <sub>3</sub>	- Inhibition de la Sn glycérol 3-P- acyltransférase et de l'acide gras synthétase	Rajasekharan et Sastry, 1987.

la biosynthèse des caroténoïdes présente ce radical trifluorométhyl (CF<sub>3</sub>) sur le noyau aromatique.

Les pyridazinones agissent donc différemment selon la structure chimique et le degré de substitution de la molécule herbicide : la présence de la fonction amine entraîne l'inhibition de la réaction de Hill, celle de la fonction méthyl provoque le blocage de la désaturation des acides gras et la substitution par le trifluorométhyl (CF<sub>3</sub>) permet à la molécule d'agir sur la biosynthèse des pigments.

Néanmoins une même molécule peut agir simultanément et de façon indépendante suivant les divers types de substitution (Tab. II) et affecter divers mécanismes cellulaires à la fois.

✓ Ainsi le pyrazon dont la molécule ne présente que la fonction amine inhibe seulement la réaction de Hill et le transfert des électrons photosynthétiques (Duke, 1985).

✓ Le San 9785 ou BASF 13 338 doté de la fonction amine inhibe également la réaction de Hill et la présence de deux groupements méthyl sur la fonction amine fait qu'il perturbe le métabolisme lipidique en inhibant la désaturation du C18 :2 en C18 :3 liée au MGDG (St John, 1982 ; Wilkinson, 1991).

✓ Le norflurazon et le metflurazon exercent diverses actions du fait qu'ils présentent plusieurs substitutions : ils inhibent la réaction de Hill car ils comportent la fonction amine, ils inhibent la désaturation du C18:2 en C18:3 liée au MGDG du fait de la présence de un ou deux groupements méthyl, et ils inhibent la biosynthèse des caroténoïdes (Wilkinson, 1991 ; Scalla, 1991) car ils contiennent un groupement trifluorométhyl sur le noyau aromatique.

✓ Le San 9744 pyridazinone trifluoré et non méthylé inhibe fortement l'activité de l'acide gras synthétase et celle de la sn glycérol 3-P- acyl-transférase (Rajasekharan et Sastry, 1987).

### **3.2.2 – Action des pyridazinones sur la biosynthèse des caroténoïdes**

Les caroténoïdes sont des composés des membranes photosynthétiques impliqués dans l'organisation et le fonctionnement des plastes. Chez les plantes supérieures, les caroténoïdes sont synthétisés par des complexes multi-enzymatiques codés par le noyau et localisés en partie au niveau des membranes de l'enveloppe des plastes (Joyard et *al.*, 1998).

Les fonctions des caroténoïdes sont déterminés par leur voisinage avec les molécules protéiques et lipidiques.

Dans les membranes des thylakoides, au niveau des antennes collectrices de lumière LHC (Light harvesting complex), les caroténoïdes contribuent avec les chlorophylles à la collecte de l'énergie lumineuse mais aussi à la stabilisation de la phase lipidique (Young et *al.*, 1998).

Cependant l'un des rôles les plus importants de ces pigments réside dans la protection de l'appareil photosynthétique de la photooxydation en éteignant

« quenching » la chlorophylle triplet évitant ainsi la formation de l'oxygène singulet une des formes de molécule réactive d'oxygène (Young, 1991) : la zéaxanthine qui se forme par déépoxydation de la violaxanthine agit en tant qu'antioxydant au niveau du photosystème II empêchant ainsi le stress oxydatif en dissipant l'excès d'énergie sous forme de chaleur (Demmig-Adams et Adams, 1992).

Il est récemment proposé un rôle des caroténoïdes dans la réduction à l'obscurité de l'oxygène chloroplastique par une oxydase terminale via une voie de dissipation de l'oxygène appelée chlororespiration (Bennoun et *al.*, 1998 ; Josse et *al.*, 2000 ; Salguero et *al.*, 2003) ; les électrons allant vers l'oxydase terminale (Fig. 15), proviendraient du PSII ou encore de la désaturation du phytoène tel que suggéré par Bennoun, (2001).

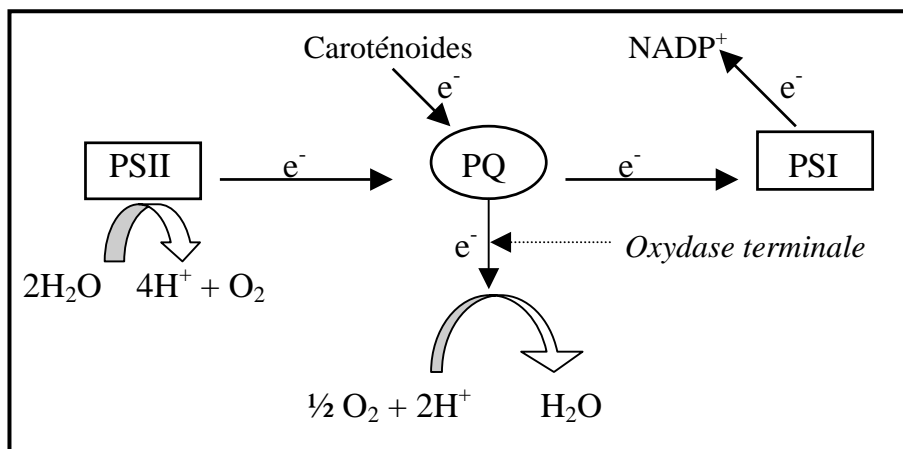


Figure 15 : Schéma montrant le processus de consommation de l'oxygène chloroplastique par la voie chlororespiratoire (Salguero et *al.*, 2003).

Des aspects variés de la toxicité du norflurazon ont été décrits dans de nombreux travaux (Agnolucci et *al.*, 1994, La Rocca et *al.*, 1998 ; Dalla Vecchia et *al.*, 2001). La déficience en caroténoïdes engendre outre la dégradation des chlorophylles, un démantèlement des thylakoides, une destruction des ribosomes 70s (Dalla Vecchia et *al.*, 2001) mais aussi la formation de molécules réactives d'oxygène (oxygène singulet) au niveau de l'antenne collectrice provoquant ainsi un stress oxydatif (Jung et *al.*, 2000 ; 2001). Par ailleurs, Dahlin et Franzen (1997) et Yurina et Kloppstech, (2001) ont montré que le norflurazon inhibe l'importation des protéines par les plastides.

Les pyridazinones substitués (norflurazon et metflurazon) ont pour cible principale l'inhibition de la biosynthèse des caroténoïdes (Wilkinson, 1985 et Bramley, 1994). Le blocage de la formation des caroténoïdes par les pyridazinones a été observé sur des matériaux végétaux divers : cyano-bactéries, algues et plantes supérieures (Sandmann et Albrecht, 1990).

Ces herbicides sont très actifs sur les chloroplastes en formation dont la biosynthèse des pigments est très active. Par contre, les feuilles qui sont vertes au moment du traitement conservent leurs pigments (Scalla, 1991).

Des études menées *in vitro* sur des chromoplastes de pétales de narcisses et des préparations enzymatiques de champignons auxquels des précurseurs marqués ont été fournis (Sandmann et al., 1980) ont montré que la chaîne de biosynthèse des caroténoïdes est bloquée par les pyridazinones après le phytoène (Fig. 16). La cible principale étant donc la phytoène désaturase (Bramley 1994) protéine de l'enveloppe du chloroplaste (Joyard et al., 1991) ; codée par le noyau. Le norflurazon étant une molécule lipophile, il agirait avec un domaine hydrophobique de cette enzyme (Chamovitz et al., 1991).

Des études *in vitro* utilisant des membranes photosynthétiques de cyanobactéries *Synechococcus PCC 7942* ont montré que le norflurazon se lie à la phytoène désaturase de façon non covalente et inhibe son activité catalytique de manière non compétitive avec le phytoène substrat de l'enzyme (Sandmann et al., 1989 ; Böger et Sandmann, 1998).

Il est donc possible que ces deux composés (phytoène et norflurazon) aient des sites de fixation différents sur l'enzyme. Cependant selon Chamovitz et al., (1991) la mutation qui entraîne une résistance au norflurazon provoque aussi une réduction de l'efficacité de la réaction de déshydrogénation chez la lignée mutante ce qui suggère que le site de liaison du norflurazon sur la phytoène désaturase et le site catalytique de déshydrogénation du phytoène sont, soit chevauchants, soit très voisins l'un de l'autre sur la phytoène désaturase.

Les pyridazinones peuvent exercer deux types d'action possibles sur la phytoène désaturase :

- L'herbicide peut mimer l'une des molécules venant après le phytoène dans la voie de biosynthèse et agir en tant que régulateur allostérique. Des études *in vitro* menées sur des membranes d'une algue bleu vert *Aphanocapsa* ont montré que le lycopène est un puissant inhibiteur par feed back (Clarke et al., 1982).
- La seconde possibilité est que l'herbicide se lie avec le ou les sites actifs de la phytoène désaturase. Des études récentes (Breitenbach et al., 2001) ont montré que le norflurazon agit en se liant au site de fixation des cofacteurs (NADP<sup>+</sup>, ou plastoquinone) de la phytoène désaturase.

L'action inhibitrice du norflurazon sur la biosynthèse des caroténoïdes peut être partiellement réversée par le S. éthyl dipropylthiocarbamate ou EPTC (Wilkinson, 1989) ou par l'anhydride naphthalique (Wilkinson 1993). L'anhydride naphthalique agirait en tant qu'antidote de nombreux herbicides en induisant une augmentation de CytP<sub>450</sub> monooxygénase intervenant dans la dégradation des herbicides.

Des études *in vitro* de résistance de la phytoène désaturase à de nombreux herbicides et le séquençage des gènes de la phytoène désaturase (Martinez et Vioque, 1992) ont révélé que cette résistance se manifeste par des modifications du ou des sites d'accrochage de l'herbicide sur la phytoène désaturase.

Dans tous les cas de résistance, le même acide aminé à savoir l'arginine<sup>195</sup> est remplacé soit par la cystéine, la proline ou la sérine, la substitution par la sérine conférant à l'enzyme un haut degré de résistance.

Les caroténoïdes étant précurseurs de l'acide abscissique, le norflurazon en inhibant la biosynthèse des caroténoïdes, réduit également le taux intracellulaire de cette hormone (Scalla, 1991) ce qui suggère une perturbation généralisée de la synthèse des terpènes (Fig. 16).

### **3.2.3 - Action des pyridazinones sur le métabolisme lipidique.**

#### **- Effet sur les lipides membranaires**

L'un des effets marquants des pyridazinones est la modification du métabolisme lipidique en général (Di Baccio et al., 2002) et de la composition en acides gras des lipides membranaires en particulier (St John, 1982). Le norflurazon diminue les lipides totaux, les glycolipides et les phospholipides dans les étiooplastes de feuilles d'orge (Di Baccio et al., 2002).

Rajasekharan et Sastry (1987), ont signalé un effet inhibiteur de divers pyridazinones substitués sur la sn glycérol 3P acyl transférase et l'acide gras synthétase.

#### **- Effet sur la désaturation des acides gras**

Les pyridazinones augmentent la proportion d'acide linoléique et réduisent celle de l'acide linoléique liée aux galactolipides (Willemot et al., 1982, Davies et Harwood, 1983, Norman et St John, 1987).

L'action des pyridazinones dépend cependant des espèces : ainsi, chez les dicotylédones, les plantules de fèves (*Vicia faba*) traitées au metflurazon présentent une forte réduction de leur galactolipides, alors que leur composition en acides gras varie peu ; par contre chez les monocotylédones, dans les plantules d'orge *Hordeum vulgare*, la teneur en galactolipides varie peu, mais le C18:2 lié aux galactolipides s'accumule au détriment du C18:3 (Davies et Harwood, 1983) suite à l'inhibition de la  $\omega^3$  désaturase.

Par ailleurs de nombreux travaux ont montré que le San 6706 en plus de son action inhibitrice sur la désaturation du linoléate chez certaines espèces, réduit également la conversion de l'acide hexadécanoïque ou C16:0 en acide  $\Delta^3$  trans hexadécénoïque ou C16:1t lié au PG (Khan et al., 1979, Davies et Harwood, 1983) ; cette action dépend en fait de l'espèce : ainsi chez l'orge (*Hordeum vulgare*), le san 6706 inhibe à la fois la PG  $\Delta^3$  trans désaturase et la linoléate désaturase ou  $\omega^3$  désaturase liée au MGDG alors que chez la fève (*Vicia faba*), seule la formation du C16:1t PG est significativement affectée (Khan et al., 1979).

Le norflurazon bloque également la  $\Delta^6$  désaturase chez les algues (Cohen et al., 1993).

De tous les pyridazinones substitués, le San 9785 appelé aussi BASF 13338 est celui qui affecte le plus la  $\omega^3$  désaturase (Lem et Williams, 1981 ; St John et *al.*, 1984 ; Wang et Hildebrand, 1987). Des études menées en présence de précurseurs radioactifs et de faibles concentrations de l'herbicide précisent son site d'action à savoir la désaturation du C18:2 en C18:3 liée au MGDG ; ceci confirme le rôle joué par le MGDG dans la désaturation du C18:2 au sein du chloroplaste (Lem et Williams, 1981 et 1983, Murphy et *al.*, 1985).

D'après Lem et Williams (1983), les sites extrachloroplastiques de biosynthèse du C18:3 ne semblent pas influencés par les pyridazinones du moins chez *Vicia faba*. En effet, Norman et St John, (1987), analysant les espèces moléculaires de la PC dans les feuilles d'*Arabidopsis* après traitement au BASF 13338 ont montré que ce dernier n'affecte pas la composition en acides gras de ce phospholipide. Cependant il a été montré dans les racines de blé que le San 9785 induit une variation du rapport C18:2/C18:3 dans les PC et PE ce qui laisse suggérer que la voie de désaturation extraplastidiale du C18:2 peut être affectée (St John, 1982).

Les mécanismes de l'inhibition de la désaturation du linoléate par les pyridazinones ne sont pas encore bien compris. Le San 9785 a peu d'effet sur la synthèse du linoléate dans les chloroplastes isolés (Willemot et *al.*, 1982) ce qui suggère que soit l'herbicide agit sur les protéines avant leur intégration dans les membranes du chloroplaste, soit la protéine cible est déjà en place dans l'organite (d'où le non effet sur chloroplaste déjà formé) soit il doit être métabolisé dans le cytosol avant de devenir fonctionnel.

D'après Brockman et *al.*, (1990) l'inhibition de la désaturation du linoléate par le San 9785 ne se produit pas en présence de cycloheximide inhibiteur de la synthèse des protéines dans le cytosol. Ceci indique que la synthèse de ces protéines (désaturase) est requise pour l'action de l'herbicide. Selon ce même auteur, la diminution du C18 :3 sous l'effet du BASF 13 338 serait due à une réduction d'un polypeptide spécifique lequel polypeptide ( $\omega^3$  désaturase) est également réduit chez un mutant d'*Arabidopsis fad7* qui présente une diminution génétique du niveau de C18 :3

Par ailleurs Dahlin et Franzen (1997) ont montré que les pyridazinones entravent l'importation de protéines chloroplastiques synthétisées dans le cytosol. Ces observations suggèrent que l'herbicide agit sur des protéines précurseurs dont font partie les désaturases soit en bloquant leur importation soit en empêchant leur intégration dans les membranes.

L'action des pyridazinones sur les désaturases des lipides peut donc avoir plusieurs origines : l'inhibition des activités désaturases et/ ou augmentation de la dégradation des désaturases par cet herbicide ou encore réduction de l'expression des gènes codant pour ces enzymes.

Les pyridazinones (dont le norflurazon) semblent donc avoir une action spécifique sur la  $\omega^3$  désaturase chloroplastique qui utilise aussi bien les espèces procaryotes que eucaryotes du MGDG en tant que substrat de désaturation (Ohlrogge et Browse, 1995).

L'effet des pyridazinones sur les lipides est un effet direct et non pas un phénomène secondaire dû à l'inhibition de la biosynthèse des caroténoïdes ou à la photodestruction des plastes: les modifications lipidiques sont démontrables après seulement 15 minutes de traitement avec le San 9785. Elles sont également démontrables pendant l'endurcissement au froid, qui en principe s'accompagne d'un enrichissement des lipides polaires en acide linoléique: ces deux phénomènes sont simultanément inhibés par les pyridazinones (Scalla, 1991).

Les enzymes impliquées dans la formation des acides gras polyinsaturés des plastes (n-6 et n-3 désaturases) ont été identifiées au niveau de l'enveloppe des plastes (Ferro et *al.*, 2003).

Or la désaturation des acides gras est dans son ensemble une réaction de déshydrogénation extrêmement similaire à la déshydrogénation du phytoène inhibée par le norflurazon (Sandmann et *al.*, 1989) au niveau de l'enveloppe chloroplastique. Donc tout porte à croire que les désaturases liées à l'enveloppe des plastes représentent le site d'action majeur des pyridazinones.

Selon Harwood (1991a), l'inhibition de la synthèse de l'acide linoléique par les pyridazinones n'est pas en elle-même toxique pour le végétal mais elle peut rendre le végétal traité sensible ou vulnérable aux autres facteurs de l'environnement en particulier le froid.

La figure 16, résume les voies de biosynthèse des caroténoïdes et des acides gras et montre les sites d'action du norflurazon.

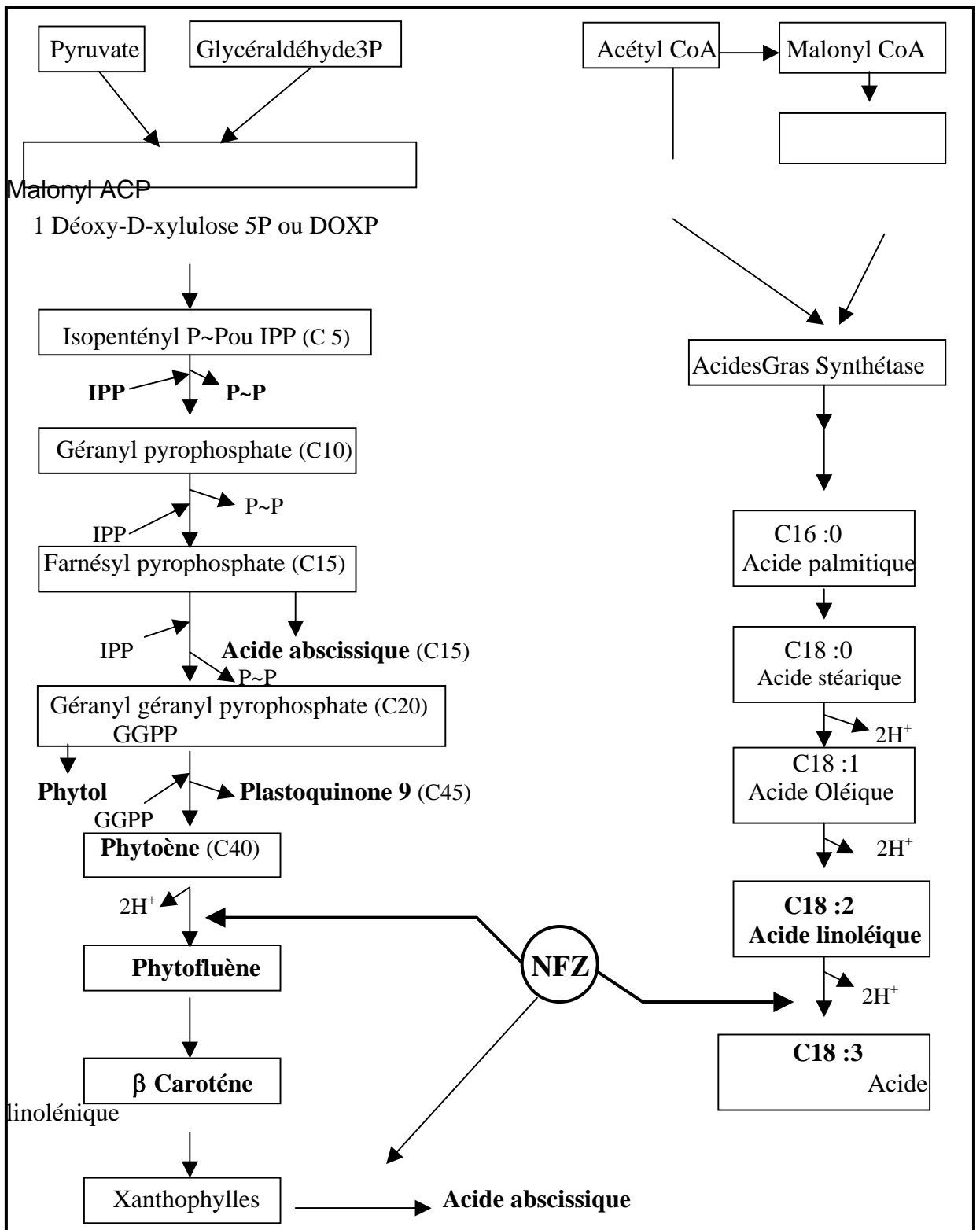


Figure 16 : Schéma de biosynthèse des caroténoïdes (Lichtenthaler, 1999), des autres isoprénoides et des acides gras : Sites potentiels d'action du Norflurazon.

# Matériel et Méthodes

## **1 - Herbicide et matériel végétal utilisés**

### **1.1- Herbicide utilisé**

Le norflurazon (San 9789) de nom commercial « zorial » est d'origine suisse Sandoz (Novartis Agro). Il appartient à la famille des pyridazinones. Sa formule chimique est le 4-chloro-5-méthyl-amino 2  $\alpha,\alpha,\alpha$  trifluoro-méthyl phényl 3-(2H) pyridazinone et sa masse moléculaire est de 303,7g. Il se présente sous forme d'un solide cristallin de couleur blanche ou d'une poudre marron ; sa solubilité dans l'eau est de 28 mg.l<sup>-1</sup> à 23°C.

Il est utilisé dans le désherbage de la vigne, du cotonnier, du soja, de l'arachide, de la canne à sucre, des céréales et d'un certain nombre d'arbres fruitiers (abricotier, pêcher, poirier, pommier et prunier; il est efficace sur les graminées et un certain nombre de dicotylédones annuelles et bisannuelles (Beste et Humbert, 1989).

L'herbicide préparé en solution aqueuse est appliqué en pré-semis au niveau du sol avant la mise en terre des graines ou en pré-émergence avant la levée des plantules. Il pénètre par les racines puis il est véhiculé par les vaisseaux du bois (herbicide systémique) jusqu'au niveau des feuilles où il agit ; c'est un herbicide d'application racinaire à action foliaire. Il est généralement utilisé à raison de 2000 g.ha<sup>-1</sup> (Dossier d'homologation INPV 1991).

### **1.2 - Matériel végétal**

Le travail effectué a porté sur des plantules de soja *Glycine max* L. Le soja, est une légumineuse herbacée annuelle originaire du continent asiatique (Chine) dont la culture industrielle s'est beaucoup étendue aux USA et au Brésil. Elle fait partie de l'ordre des Fabales, de la famille des papilionacées ou Fabacées. C'est le végétal le plus cultivé en vue de la production de graines riches en protéines et assez riches en lipides. C'est aussi l'un des végétaux qui a donné lieu à des études scientifiques et techniques très étendues.

En Algérie, la première expérimentation sur le soja fut réalisée en 1894 par le docteur L. Trabut à l'ancienne Ecole d'Agriculture de Rouiba. Les essais furent poursuivis par la suite à la Station Botanique de Maison-Carrée (El Harrach). De nombreux essais d'introduction du Soja furent entrepris dans différentes régions à l'Ouest d'Alger (Chlef et Khemis Miliana en conditions irriguées) et à l'Est (El khroub en conditions sèches). Ces nombreux essais d'introduction ont été motivés par les nombreux avantages que présente la culture de cette plante pour l'alimentation de l'homme, du bétail, pour l'industrie, la pharmacie, le cosmétique.

#### **1.2.1 – Origine des graines et mise en culture**

Les graines de soja *Glycine max* L. variété Weber nous ont été fournies par Rustica semences (Mondonville France).

Les semences ont été calibrées et la classe de poids la plus représentative a été retenue. Les graines endommagées ou malformées ont été éliminées afin de réduire au maximum la variabilité du matériel végétal lors de son utilisation.

Après stérilisation à l'eau de Javel (hypochlorite de sodium) pendant 10 minutes puis plusieurs rinçages à l'eau distillée, les graines sont mises à imbiber pendant 3 heures dans l'eau.

### **1.2.2 - Mode de traitement**

Le norflurazon étant un herbicide de pré-semis (ou de pré-émergence), les graines de soja imbibées sont mises à germer dans des bacs ou des terrines dont la terre a été arrosée avec de l'eau pour les témoins et avec la solution de norflurazon à différentes concentrations ( $10^{-6}$ M,  $10^{-5}$ M et  $10^{-4}$ M) pour les essais. Les bacs sont couverts par un plastique pour maintenir une humidité saturante. Au bout de trois à quatre jours, le plastique est enlevé et la croissance des plantules est suivie en serre jusqu'à l'apparition des feuilles dans les conditions contrôlées : photopériode 16h/8h jour/ nuit, thermopériode 20°C/18°C jour/ nuit, humidité relative 60%/ 55% jour/ nuit ; une lumière artificielle additionnelle (Lampes Philips SON-7 AGRO 400 W) est déclenchée lorsque la luminosité externe est inférieure à 7 Klux et un pare soleil protège les plantes lorsque la luminosité extérieure dépasse 40 Klux.

L'expérimentation a été réalisée sur des plantules âgées de deux à trois semaines (stade premières et deuxième feuilles).

## **2 – Techniques expérimentales**

### **2.1- Obtention de la fraction microsomale**

Le terme microsomes très employé dans les expériences de fractionnement cellulaires désigne une fraction composite constituée de membranes qui tombent par centrifugation différentielle à 100 000xg. Cette fraction microsomale contient essentiellement les fragments du réticulum endo-plasmique et du plasmalemme.

Les feuilles des plantules de soja témoins et celles des plantules traitées sont rincées puis broyées rapidement dans un broyeur à 4°C dans un milieu de broyage (le volume est le double de la masse de matière végétale utilisée) dont la composition est la suivante : saccharose (500 mM), KCl (10 mM), MgCl<sub>2</sub> (1 mM), BSA (1%) (celle-ci sert à complexer les acides gras libres activateurs des lipases susceptibles d'altérer les structures membranaires). Le tout est solubilisé dans du tampon Tris/HCl 100 mM à pH 8. Du chlorhydrate de cystéine (4 mM) (substance réductrice qui diminue la concentration en composés oxydants pouvant se former au moment de la rupture de la cellule) est ajouté au milieu d'extraction au dernier moment.

Après filtration sur plusieurs épaisseurs de gaze et une double épaisseur de miracloth, le filtrat est centrifugé à 10 000xg pendant 20 min. Le surnageant est récupéré puis recentrifugé à 100 000xg pendant 60 min.

Le culot contenant la fraction microsomale est repris dans du tampon Tris/HCl 50mM, pH 8. La suspension microsomale est homogénéisée à l'aide d'un potter puis elle est répartie par petits volumes dans des tubes eppendorf. Les fractions microsomales sont congelées rapidement dans l'azote liquide puis sont conservées à -80°C. Elles serviront à l'étude *in vitro* de la CDP-choline phosphotransférase et de la lysoPC acyltransférase.

## **2.2 - Utilisation des précurseurs radioactifs des lipides**

### **2.2.1 - Choix des précurseurs**

L'acétate [ $1-^{14}\text{C}$ ] de sodium ( $2.1 \text{ GBq.mmol}^{-1}$ ) est fourni par le C.E.A. C'est le précurseur le plus souvent utilisé pour suivre la biosynthèse des lipides. Cependant en plus de sa participation à la biosynthèse *de novo* des acides gras, il peut s'engager dans d'autres voies métaboliques.

L'acide [ $1-^{14}\text{C}$ ] oléique ( $2.04 \text{ GBq.mmol}^{-1}$ ) est fourni par Amersham (Angleterre). Il permet d'étudier des réactions plus spécifiques du métabolisme lipidique plus précisément la désaturation de l'acide oléique en acide linoléique et la transformation de ce dernier en acide linoléique. Il est fourni à la plante sous forme de sel d'ammonium préparé selon Citharel et *al.*, (1983) : de l'éther éthylique ammoniacal est obtenu en faisant barboter pendant une minute de l'ammoniac gazeux dans l'éther éthylique. A 4ml d'éther éthylique sont ajoutés 600 $\mu\text{l}$  d'acide [ $1-^{14}\text{C}$ ] oléique ; après séchage sous azote, le mélange est repris dans un volume défini (0,5 ml) de tampon Tris-HCl pH 8.

### **2.2.2 - Marquage *in vivo* des lipides des feuilles de soja**

Les précurseurs radioactifs en solution sont déposés sur les feuilles des plantules témoins et des plantules stressées sous forme de microgouttes à l'aide d'une micro-seringue (Hamilton). Après des temps différents de marquage (6 heures, 24 heures et 48 heures pour le [ $1-^{14}\text{C}$ ] acétate et 2 heures, 6 heures, 12 heures et 24 heures pour le [ $1-^{14}\text{C}$ ] oléate), les feuilles marquées sont prélevées, lavées abondamment à l'eau distillée puis utilisées pour l'extraction des lipides.

## **2.3 - Extraction des lipides**

### **2.3.1 - A partir des feuilles**

L'extraction est réalisée selon la méthode de Bligh et Dyer (1959). Les feuilles (1g) sont fixées dans 10ml d'eau bouillante pendant 3 à 5 minutes ce qui permet de dénaturer les phospholipases. Après refroidissement, les tissus sont broyés dans 10 ml de méthanol (rupture des liaisons lipoprotéiques) puis dans 10ml de chloroforme (solvant dans lequel sont solubilisés les lipides).

Après addition du reste d'eau ayant préalablement servi à la fixation, le mélange est soumis à une centrifugation pendant 15 minutes à 3000 rpm. Deux phases distinctes sont obtenues : une phase supérieure contenant l'eau et le méthanol qui sera éliminée et une phase inférieure chloroformique qui renferme les lipides ; celle-ci est récupérée à l'aide d'une pipette pasteur puis évaporée à sec sous azote. Les lipides sont repris dans un volume défini de chloroforme (500  $\mu\text{l}$  à 1 ml) ou dans un mélange toluène/éthanol (4/1- v/v) puis conservés au froid.

### **2.3.2 - A partir des espèces moléculaires**

Les lipides collectés à la sortie de la chaîne HPLC sont extraits selon la méthode de Bligh et Dyer (1959) ; 2 ml de chloroforme et 2 ml d'eau sont ajoutés à 2 ml d'échantillon lipidique récupéré. Après centrifugation pendant 10 min. à 2 000xg la

phase inférieure chloroformique contenant les lipides est récupérée et évaporée sous azote ; les lipides sont alors repris dans un volume défini de chloroforme (100 µl).

## **2.4 - Analyse des lipides**

### **2.4.1 - Séparation des catégories lipidiques.**

#### **2.4.1.1 - Par chromatographie sur couche mince**

L'extrait lipidique est déposé au bas d'une plaque de gel de silice de 0,25 mm d'épaisseur (Merck) (à 2cm du bas ) et évaporé sous azote.

La séparation des différents lipides est réalisée en les faisant migrer dans deux systèmes solvants migrant dans le même sens dans une cuve hermétiquement fermée saturée de vapeurs de solvants.

La première migration a lieu dans le système solvants Lepage (1967) composé de: chloroforme/acétone/acide acétique/méthanol/eau (50/20/10/10/5 v/v/v/v/v). Cette migration permet la séparation des lipides polaires et est arrêtée lorsque le système solvant arrive à 13 cm du dépôt de l'extrait lipidique. La plaque est bien séchée avant d'être plongée dans le second système de solvants qui correspond au système Mangold (1961-1964) composé de : éther de pétrole/ éther éthylique/ acide acétique (70/30/0,4 v/v/v) qui permet la séparation des lipides neutres.

A la fin de la deuxième migration, la plaque est de nouveau séchée et les différents spots correspondant aux différents lipides sont révélés par une légère exposition à des vapeurs d'iode ou bien par pulvérisation à la primuline (0,1 g.l<sup>-1</sup> dans un mélange acétone/ eau 80/20 v/v), puis observés sous lumière ultra-violette (UV) (Fig.17 A).

#### **2.4.1.2 - Par chromatographie liquide à haute performance ou HPLC**

La chaîne HPLC (Waters, Milford, Ma, USA), comprend un injecteur, deux pompes (modèle 510) commandées par un contrôleur de gradient (modèle 680). L'extrait lipidique, filtré à travers une membrane de 0,5 µm de dimension de pore est évaporé à sec sous azote puis repris dans un volume donné de chloroforme (100µl). La séparation des catégories lipidiques s'effectue sur une colonne de silice (10 µm porasil) semi préparative de 7,8 x 300 mm par un gradient linéaire de polarité. Le gradient est préparé à partir de deux solvants A et B. Le solvant A est composé d'un mélange d'isopropanol/ hexane (4/3 v/v) et le solvant B d'isopropanol/ hexane/ eau (8/6/1,5 v/v/v). Le débit est constant à 1,5 ml.mn<sup>-1</sup> ( Demandre et *al.*, 1985).

L'extrait lipidique est d'abord élué pendant 2 minutes par le solvant A, puis pendant 20 minutes selon un gradient linéaire qui débite en premier 100% de solvant A pour finir à 100% de solvant B. Les lipides séparés et détectés à 250 nm (Fig.17 B).sont collectés à la sortie de la chaîne HPLC.

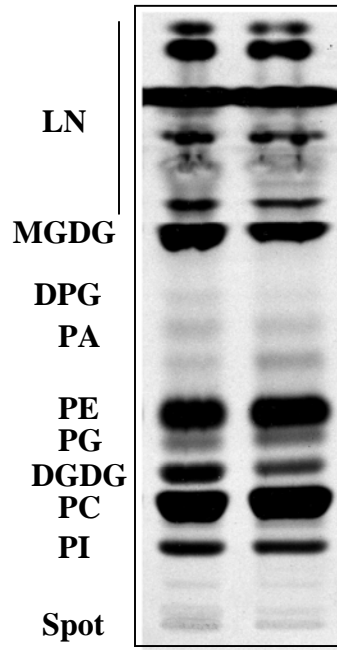


Figure 17 : Séparation des classes lipidiques des feuilles de soja :  
A : Par chromatographie sur couche mince

### 2.4.2 - Séparation des espèces moléculaires des catégories lipidiques

Les classes lipidiques obtenues par HPLC sont filtrées puis injectées dans une colonne contenant une phase hydrophobe de silice (en phase reverse) 5  $\mu\text{m}$  greffée de chaînes en C18 (3,9 x 300mm Waters). Elles sont éluées par un solvant polaire qui est un mélange de méthanol/acétonitrile/eau (90,5/7/2,5 v/v/v) auquel sont ajoutés 2,9  $\text{g.l}^{-1}$  de chlorure de choline. Le débit du solvant est de 1,2  $\text{ml.min}^{-1}$ . Les espèces moléculaires sont détectées en masse et collectées à la sortie de la chaîne HPLC (Fig.18).

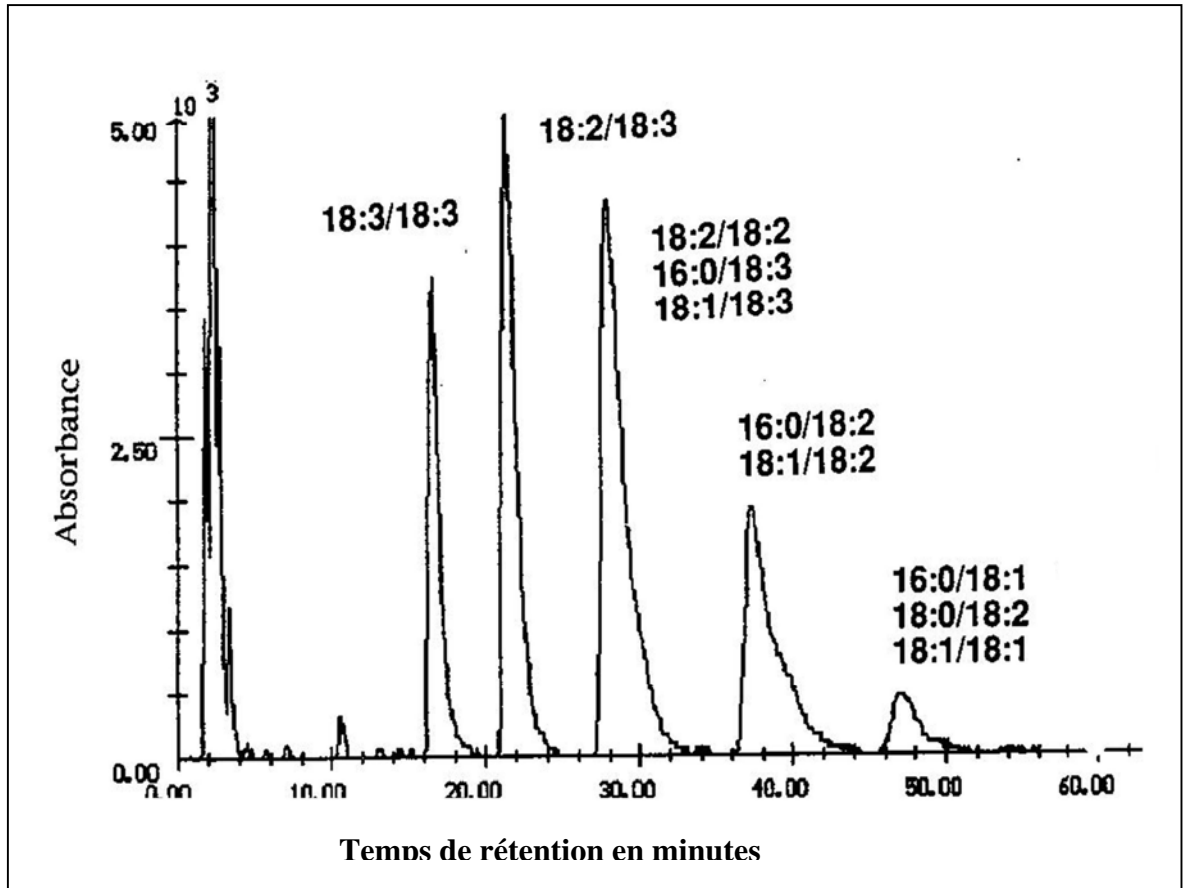


Figure 18 : Séparation des espèces moléculaires de la phosphatidylcholine par HPLC

Elles sont réextraites selon la méthode de Bligh et Dyer, (1959) ; cette nouvelle extraction permet d'éliminer le chlorure de choline qui perturbe la réaction de méthylation.

L'identification et la quantification de ces espèces moléculaires se fait par analyse des esters méthyliques de leurs acides gras constitutifs par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire.

La séparation des espèces moléculaires est fonction du degré d'insaturation et de la longueur de la chaîne carbonée des acides gras composant l'espèce moléculaire. Une espèce moléculaire très insaturée sera éluée en premier ; pour un même nombre de doubles liaisons, l'espèce contenant un acide gras à 16 carbones sera éluée avant celle contenant deux acides gras à 18 carbones.

### **2.4.3 - Méthylation des acides gras**

La méthylation des acides gras de l'extrait lipidique total, des catégories lipidiques et des espèces moléculaires se fait en présence d'un témoin interne le C<sub>17:0</sub> ou acide heptadécanoïque qui permet d'effectuer une analyse quantitative des acides gras présents dans le mélange.

#### **✓ Des lipides totaux**

Les lipides totaux sont méthylés selon la méthode de (Metcalfé et *al.*, 1966). A une partie aliquote des lipides totaux (50 µl) est ajoutée une quantité connue d'acide heptadécanoïque (C<sub>17:0</sub>). L'addition de 4 ml de soude méthanolique 0,5 N permet de saponifier les acides gras. Les tubes fermés hermétiquement sont agités puis placés au bain marie à 65°C pendant 15 minutes. Après refroidissement, les acides gras sont méthylés par addition de 3 ml de méthanol-BF<sub>3</sub> (trifluorure de Bore à 14% dans le méthanol). Les tubes sont agités puis placés au bain marie à 65°C pendant 15 minutes ; Après refroidissement, les esters méthyliques sont extraits par addition de 3 ml de pentane et 1 ml d'eau distillée.

La phase supérieure pentanique est prélevée et évaporée sous azote. Les esters méthyliques sont stockés dans un volume connu de méthanol (100µl).

#### **✓ Des catégories lipidiques**

Les acides gras des catégories lipidiques sont méthylés selon la technique de Metcalfé et *al.*, (1966).

Les spots correspondants aux différentes catégories lipidiques séparées sur couche mince sont grattés et mis en présence d'une quantité connue de témoin interne (C<sub>17:0</sub>) et de 3ml de méthanol-BF<sub>3</sub> (trifluorure de Bore à 14% dans le méthanol) ; après agitation, les tubes bouchés hermétiquement sont placés au Bain-Marie à 55°C pendant 15 minutes. Après refroidissement, 3 ml de pentane et 0,5 ml d'eau distillée sont ajoutés. Après agitation puis décantation, la phase supérieure contenant les esters méthyliques est recueillie et concentrée sous azote. Les esters méthyliques sont stockés dans une quantité connue de méthanol (100 µl) puis analysés par chromatographie en phase gazeuse.

### ✓ Des espèces moléculaires

Les acides gras des espèces moléculaires sont méthylés selon la technique de Carreau et Dubacq (1978). A une partie aliquote de la fraction lipidique évaporée à sec sous azote sont ajoutés une quantité connue de témoin interne et 0,2 ml de méthylate de sodium à 1%. Après agitation, les tubes bouchés sont placés pendant 5 minutes au Bain-Marie à 55°C. Après refroidissement, le même volume (0,2 ml) de méthanol chlorhydrique 1,1N est ajouté. Les tubes sont de nouveau placés au Bain-Marie à 55°C pendant 5 minutes. Le méthanol chlorhydrique permet de méthyler les acides gras libres, les acides gras acylés étant méthylés dès l'addition du méthylate de sodium.

L'extraction des esters méthyliques se fait après refroidissement par addition de 2 ml de pentane et 1ml d'eau distillée. La phase supérieure pentanique est prélevée et évaporée sous azote. Les esters méthyliques sont stockés dans du méthanol (100 µl) puis analysés par chromatographie en phase gazeuse.

#### **2.5 - Analyse des esters méthyliques des acides gras par chromatographie en phase gazeuse**

Les esters méthyliques sont séparés dans un chromatographe en phase gazeuse (Varian 3300) muni d'un détecteur à ionisation de flamme et équipé d'une colonne capillaire de 50 m de long et 0,32 mm de diamètre dont la phase stationnaire est composée de carbowax et la phase mobile est représentée par de l'hélium. La température de la colonne est fixée à 180°C. La phase stationnaire polaire permet la séparation des esters méthyliques des acides gras selon la longueur de leur chaîne carbonée d'une part et selon leur degrés d'insaturation d'autre part. La surface des pics des esters méthyliques est donnée par un intégrateur relié au chromatographe. Le C<sub>17:0</sub> ajouté lors de la méthylation des acides gras permet de calculer les quantités des différents acides gras en admettant que le détecteur présente le même coefficient de réponse pour toutes les chaînes aliphatiques en C<sub>16</sub> et en C<sub>18</sub> (Fig.19 A).

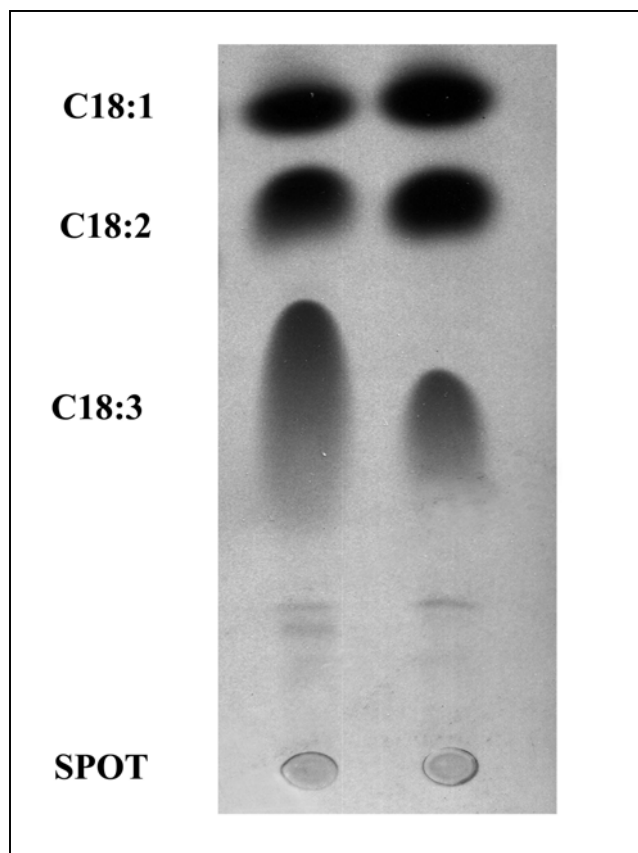
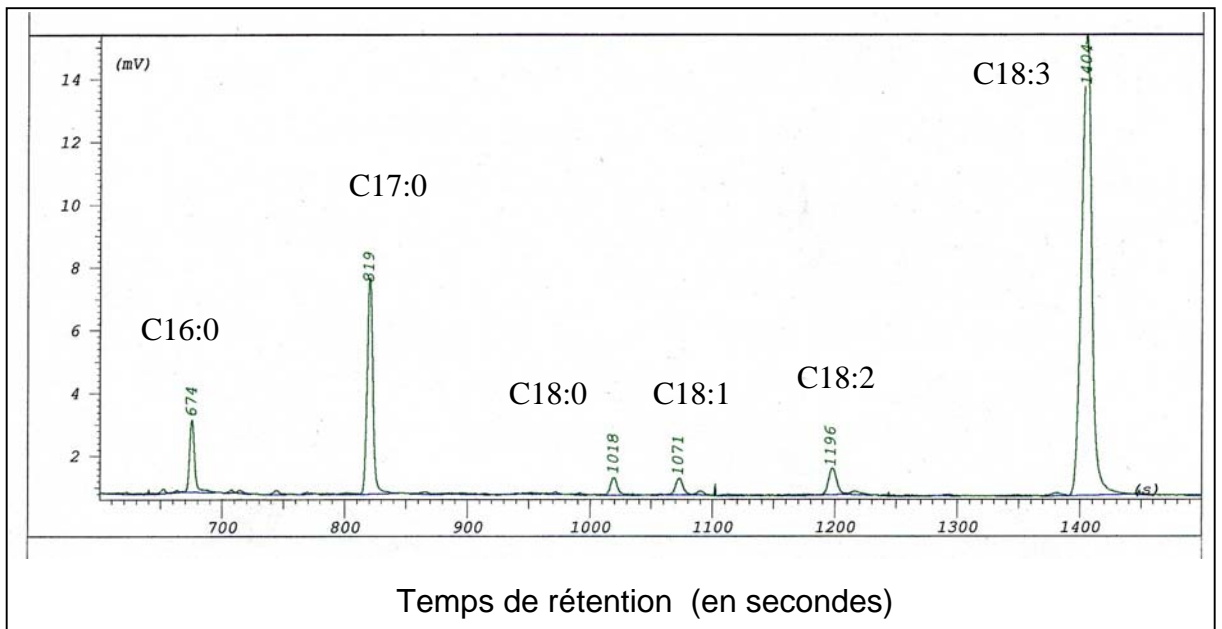


Figure 19 : Séparation des esters méthyliques des acides gras par chromatographie en phase gazeuse (A) ou sur plaque de nitrate d'argent (B).

## **2.6 - Mesure de la Radioactivité**

### **2.6.1 - Au niveau de la fraction lipidique totale**

La radioactivité est déterminée par comptage d'une partie aliquote de l'extrait lipidique (10 à 20 µl) en présence de 10 ml d'un mélange scintillant composé de PPO (2.5.diphényl oxazole et de diméthyl POPOP (paraphénylène 2,2'bis méthyl 4, phényl 5 oxazole) dans du toluène (125 g.2.5g .L<sup>-1</sup>) ou de Permafluor dans du toluène (40 ml.L<sup>-1</sup>). La radioactivité des échantillons est comptée à l'aide d'un appareil à scintillation liquide (Intertechnique type SL 3000).

### **2.6.2 - Au niveau des classes lipidiques**

Après chromatographie sur couche mince, les plaques de gel de silice sont placées en contact avec des films sensibles (Kodak) à l'obscurité pendant des temps allant de 3 jours à une semaine. Après développement des films, des taches sombres apparaissent sur ces derniers ; ces taches permettent de situer les spots radioactifs des lipides de la plaque.

La radioactivité des spots est déterminée soit à l'aide du compteur à scintillation liquide (après grattage des spots et mise en contact de la silice récupérée avec 10 ml de liquide scintillant), soit à l'aide d'un phosphor Imager.

### **2.6.3 - Au niveau des esters méthyliques des acides gras radioactifs**

#### **✓ Par radiochromatographie en phase gazeuse**

La radioactivité des esters méthyliques des lipides totaux ou des catégories lipidiques est mesurée par radiochromatographie en phase gazeuse.

La radiochromatographie en phase gazeuse fournit d'une part l'analyse pondérale des acides gras contenu dans un extrait ou dans l'éluat d'un spot de lipides, d'autre part la répartition de la radioactivité entre les différents acides gras. A la sortie de la colonne du chromatographe le gaz vecteur des esters méthyliques d'acides gras est divisé en deux : un dixième du flux est dirigé vers un détecteur à ionisation de flamme ce qui permet l'analyse pondérale des acides gras, les neuf dixièmes restants du courant gazeux vont vers un four à combustion. Les vapeurs d'acides gras sont totalement oxydées et un compteur proportionnel mesure la radioactivité du gaz carbonique résultant de la combustion des acides gras. L'appareil fournit ainsi un double enregistrement : un chromatogramme de masse d'une part et un chromato-gramme de radioactivité d'autre part.

L'appareil utilisé est un Girdel 300 couplé à un compteur de radioactivité. Il est équipé d'une colonne capillaire carbowax de 25 m de long et 0,5 mm de diamètre ; le four est chauffé à 170° ; le gaz vecteur est l'hélium.

✓ **Par chromatographie sur couche mince imprégnée de nitrate d'argent**

Lorsque la radioactivité est faible, les esters méthyliques sont séparés par chromatographie sur couche mince imprégnée de nitrate d'argent à 8% (80 g de nitrate d'argent dans 1 litre d'éthanol à 80%) et séchée pendant 1 heure à 100°C. Le solvant de migration est celui préconisé par Mangold (1964), composé de éther de pétrole/éther éthylique/acide acétique (70/30/0,4,v/v/v). Le nitrate d'argent se fixe sur les acides gras polyinsaturés et les empêche de migrer, les acides gras sont séparés suivant la longueur de la chaîne et suivant le nombre de doubles liaisons ; l'acide linoléique est celui qui migre le moins (Fig.19 B) et les acides gras saturés palmitiques et stéarique ne sont généralement pas séparés.

Les acides gras sont révélés par la 2-7 dichloro-fluoresceine (0,2% dans l'éthanol) sous rayons ultra violets. Le chromatogramme est mis en contact avec un film (Kodak). Après révélation du film, la radioactivité des taches d'acides gras est déterminée soit par comptage par scintillation liquide (après grattage des taches correspondant aux esters méthyliques) soit à l'aide du phosphorImager.

**2.7 – Mesure d'activités enzymatiques « *in vitro* »**

Deux activités liées au métabolisme de la PC ont été mesurées : l'activité CDP-Choline phosphotransférase et l'activité lysoPC acyltransférase.

**2.7.1 – Activité CDP Choline Phosphotransférase**

La CDP Choline phosphotransférase ou CDP-choline :1,2 diacylglycérol choline phosphate transférase, E.C.2.7.8.2. est mesurée selon la méthode décrite par Jolliot et *al.*, (1982).

La CDP-[méthyl 1-<sup>14</sup>C] choline (1.92 GBq .mmol<sup>-1</sup>) utilisée est fournie par la société NEN.

Une suspension microsomale (correspondant à une quantité de 300 µg de protéines microsomales) est incubée dans du tampon Tris/HCl 50 mM pH 8.0 contenant du DTT 100 mM et du MgCl<sub>2</sub> 25 mM et 10 µl de CDP-[méthyl 1-<sup>14</sup>C] choline diluée (30 000 cpm). Le volume d'incubation est de 100 µl. L'incubation est effectuée à 30°C pendant 20 min. La réaction enzymatique est arrêtée par addition de 2 ml de méthanol bouillant.

Les lipides sont extraits après refroidissement selon la méthode de Bligh et Dyer (1959) puis déposés sur une plaque de silice. Après migration dans le système Lepage (1967), la radioactivité associée à la PC est mesurée par scintillation liquide et l'activité de la CDPcholine phosphotransférase est déterminée par le nombre de nmoles de PC radioactives formées par unité de temps et par mg de protéines.

**2.7.2 - Activité lysoPC acyl transférase**

La lysoPC acyltransférase ou acylCoA lysotransférase catalyse l'acylation d'un acylCoA sur la lysoPC pour donner de la PC.

L'acylCoA utilisé est de l'oléoyl [1-<sup>14</sup>C] CoA (55mCi.mmol<sup>-1</sup>) fourni par Amersham.

Environ 300 µg de protéines de la fraction microsomale sont incubés en présence de 5 nmoles d'oléoyl [ $1-^{14}\text{C}$ ] CoA dans du tampon phosphate 100 mM (pH 7.2) et du  $\text{MgCl}_2$  24 mM. L'incubation s'effectue à 25°C dans un volume final de 500µl. La réaction enzymatique est arrêtée par addition de 2 ml de méthanol bouillant. Les lipides sont extraits après refroidissement selon la méthode de Bligh et Dyer (1959). La PC est séparée par chromatographie sur couche mince dans le système Lepage (1967), le spot correspondant à la PC est gratté et la radioactivité est détectée par scintillation liquide.

L'activité de la lysoPC acyltransférase est mesurée par le nombre de nmoles de PC radioactives formées par unité de temps et par mg de protéines.

## 2.8 - Extraction et dosage des pigments foliaires : caroténoïdes et chlorophylles

Les pigments des feuilles des plantules témoins et prétraitées au norflurazon sont extraits dans l'acétone à 80%. L'extrait pigmentaire est filtré et l'absorbance du filtrat est lue à 663 nm et 647 nm pour les chlorophylles et à 470 nm pour les caroténoïdes.

Les teneurs en chlorophylles et en caroténoïdes sont déterminées selon les équations de Lichtenthaler (1987).

$$\begin{aligned} \text{Chl}_a &= 12,25 \cdot \text{DO}_{663 \text{ nm}} - 2,79 \cdot \text{DO}_{647 \text{ nm}} && \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \\ \text{Chl}_b &= 21,50 \cdot \text{DO}_{647 \text{ nm}} - 5,10 \cdot \text{DO}_{663 \text{ nm}} && \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \\ \text{Chl}_{a+b} &= 7,15 \cdot \text{DO}_{663 \text{ nm}} + 18,71 \cdot \text{DO}_{647 \text{ nm}} && \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \end{aligned}$$

$$\text{Caroténoïdes} = \frac{1000 \text{ DO}_{470 \text{ nm}} - 1,82 \text{ Chl}_a - 85,02 \text{ Chl}_b}{198} \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$$

## 2.9 - Dosage des protéines

Le dosage des protéines contenues dans les fractions microsomales est effectué selon la méthode de Bradford (1976).

## 2.10 - Expression des résultats

Les résultats pondéraux traduisant les analyses quantitatives sont ramenés à une masse donnée de matière végétale fraîche (feuilles).

- La quantité de chaque acide gras est calculée par comparaison de la surface de son pic avec celle du témoin interne ( $\text{C}_{17:0}$ ) selon la relation :

$$M = \frac{\text{Sa}}{\text{St}} \times \frac{\text{Vt}}{\text{Vm}} \times \text{V} \times \frac{1}{\text{P}}$$

M : masse de l'acide gras. $\text{g}^{-1}$  MVF

Sa : surface du pic de l'acide gras

St : surface du pic de l'étalon interne

V : volume de chloroforme dans lequel ont été repris les lipides totaux

Vm : volume d'extrait lipidique prélevé pour la méthylation

Vt : volume de C<sub>17</sub> ajouté

P : masse de l'échantillon végétal (feuilles) utilisée pour l'extraction des lipides.

- Les proportions relatives des acides gras ou des différentes catégories lipidiques sont exprimées en pourcentage du total.

- Les activités de biosynthèse sont exprimées soit en nmoles de précurseur incorporé par g de matière végétale fraîche (*in vivo*) ou par mg de protéines microsomales (*in vitro*) soit en pourcentage de la radioactivité totale.

- Quantification des espèces moléculaires

La quantité de chaque espèce moléculaire est déterminée par la formule suivante :

$$\text{Espèce moléculaire en nmoles} = \frac{S \times Q}{SC_{17:0} \times M \times n}$$

S = surface du pic de l'acide gras x.

Q = quantité en nanogrammes (ng) du témoin interne C<sub>17:0</sub> ajoutée.

SC<sub>17:0</sub> = surface du pic du témoin interne.

M = masse moléculaire de l'acide gras x.

n = nombre d'acides gras présents dans l'espèce moléculaire.

Les résultats peuvent aussi être exprimés en pourcentage de la quantité globale des espèces moléculaires du lipide étudié.

## 2.11 – Etude de l'expression des gènes FAD7 et FAD3 des feuilles de soja

Le but de ce travail est d'étudier l'expression de deux gènes *FAD3* et *FAD7* codant pour les désaturases liées aux lipides respectivement au niveau des membranes du réticulum endoplasmique et des membranes chloroplastiques et permettant la désaturation de l'acide linoléique en acide linoléique dans les feuilles de plantules de soja.

L'étude de l'expression d'un gène nécessite la disponibilité d'une sonde homologe. Il est procédé d'abord à la préparation de l'ADN (ou de l'ARN) de l'espèce considérée qui est ensuite utilisé comme matrice sur laquelle sont réalisées des amplifications par PCR (Polymerase Chain Reaction)

L'amplification est réalisée grâce à des DNA polymérases thermostables isolées à partir de microorganismes se développant dans des milieux soumis à des hautes températures : la Taq polymérase isolée de *Thermophilus aquaticus*.

### 2.11.1 - Extraction de l'ADN total de feuilles de soja

De nombreux protocoles ont été mis au point pour l'extraction de l'ADN végétal. Un accent est mis sur la composition des tampons d'extraction qui permettent soit la complexation de l'ADN ce qui le soustrait rapidement à l'action des enzymes de dégradation, soit une précipitation en masse des protéines et des polysaccharides cellulaires, l'ADN restant alors dans le surnageant après centrifugation.

L'ADN des feuilles de soja est extrait selon la méthode de Dellaporta *et al.*, (1983) qui consiste à éliminer la plus grande partie des protéines et des polysaccharides lesquels forment un complexe insoluble en présence de SDS et de potassium (1.2 M final).

Les feuilles de soja (environ 200 mg) sont broyées dans l'azote liquide jusqu'à obtention d'une poudre à laquelle sont ajoutés 400 µl de tampon d'extraction (Tris 100 mM pH 8, EDTA 50 mM, NaCl 500 mM, β mercaptoéthanol 10 mM). Le mélange est placé dans des tubes Eppendorf de 2 ml. Après addition de 26 µl de SDS 20% et agitation vigoureuse, les tubes sont placés pendant 10 minutes à 65°C puis refroidis dans la glace. Les protéines et les polysaccharides sont précipités après addition de 133 µl d'acétate de potassium 5 M, homogénéisation et incubation pendant 20 minutes dans la glace.

Après centrifugation pendant 15 minutes à 13 000 rpm à 4°C, le surnageant contenant l'ADN total est recueilli. L'ADN est précipité par addition de 270 µl d'isopropanol pendant 15 à 30 minutes à -20°C).

Après centrifugation pendant 15 minutes à 15 000 rpm à 4°C puis décantation, le culot d'ADN est rincé avec 1 ml d'éthanol à 70% puis séché et enfin repris dans du tampon d'éluion ( 50 µl de Tris 10 mM pH 8, Na<sub>4</sub>EDTA 1 mM) ou dans l'eau stérile.

L'ADN est ensuite dosé au spectrophotomètre UV-visible (1 unité DO<sub>260nm</sub> équivaut à 50µg d'ADN ml<sup>-1</sup>) et les échantillons sont stockés à - 20°C.

### 2.11.2 - Extraction des ARNs foliaires

Les ARNs sont extraits selon la méthode Trizol (TRIZol<sup>®</sup> Reagent, GIBCO BRL-Invitrogen) d'après le protocole fourni par le fabricant.

Les feuilles de plantules de soja (environ 200 mg) témoins et traitées sont prélevées et conservées à -80°C. Elles sont ensuite broyées dans l'azote liquide dans un mortier. 1 ml de trizol (réactif contenant du phénol permettant de dissocier les complexes nucléoprotéiques et de la guanidine hydrochloride qui protège les ARNs en inactivant les ribonucléases) est ajouté à la poudre obtenue. Le mélange liquide est transféré dans un tube Eppendorff de 2 ml à l'aide d'une spatule autoclavée.

Après agitation, le mélange est laissé au repos pendant 10 minutes à température ambiante puis 300 µl de chloroforme sont ajoutés. Le tout est agité pendant 15 secondes puis laissé au repos pendant 5 minutes. Après centrifugation pendant 15 minutes à 15 000 rpm (centrifugeuse de paillasse) à 4°C, la phase supérieure aqueuse contenant les ARNs est récupérée dans un autre tube Eppendorf. et l'interphase et la phase organique contenant les protéines et les molécules d'ADN sont éliminées.

L'addition de 600 µl d'isopropanol précipite les ARNs. Après 10 minutes à température ambiante, le mélange est centrifugé pendant 10 minutes à 11000 rpm à 4°C (centrifugeuse de paillasse). Les culots sont lavés avec 1 ml d'éthanol à 75%. Après agitation, ils sont centrifugés dans les mêmes conditions. Ils sont alors séchés puis repris dans 25 à 50 µl d'eau distillée stérile selon leur taille.

Les ARNs sont dosés au spectrophotomètre à 260nm (1 unité  $DO_{260nm}$  équivalant à une concentration de 40 µg d'ARN.ml<sup>-1</sup>) puis conservés à -20°C.

### **2.11.2.1- Analyse des ARNs totaux par Northern Blot**

A un volume d'ARNs correspondant à 10 µg sont ajoutés 1 volume de tampon de dénaturation réalisé dans du MOPS 2X et 0,5 volume de tampon de charge réalisé dans du MOPS 1X. Les ARNs sont dénaturés 5 à 7 minutes au Bain Marie à 65°C puis placés immédiatement dans la glace afin d'éviter toute renaturation. L'étape de dénaturation est importante car elle permet de séparer les éventuels appariements qui peuvent se produire entre les brins d'ARNs.

Les ARNs sont ensuite séparés selon leur taille par électrophorèse dans un gel d'agarose dénaturant à 1.2% en présence de formaldéhyde : pour un gel de 100ml, 1,2 g d'agarose sont mis dans 10 ml de tampon MOPS 10X autoclavé et 85 ml d'eau distillée stérile.

L'agarose dans le tampon est fondue à 100°C au micro-ondes en évitant l'ébullition. Elle est ensuite refroidie jusqu'à environ 65°C. 1 µl de BÉt (bromure d'éthidium stock à 10mg/ml) et 5 ml de formaldéhyde sont ajoutés juste avant de couler le gel.

L'électrophorèse se déroule dans du tampon MOPS 1X pendant 1 h à 100 V.

Après migration, le gel est rincé sous agitation dans plusieurs bains successifs d'eau distillée (afin d'éliminer l'excès de BÉt et de formaldéhyde) et photographié sous UV grâce à la fluorescence du BÉt complexé aux ARNs.

Le transfert des ARNs sur membrane de nylon (membrane positive Appligène Oncor) est réalisé par capillarité à l'aide d'un pont de tampon 10 SSC selon la technique décrite par Thomas (1980).

Le gel est déposé sur du papier Whatman 3MM placé en pont entre deux cuves contenant du tampon SSC 10X. La membrane de nylon est d'abord immergée dans l'eau distillée puis déposée sur le gel. L'ensemble est couvert par plusieurs couches de papier Whatman (4 à 5) et du papier mouchoir (un paquet). Un poids est posé sur l'ensemble pour optimiser l'absorption et le transfert des ARNs se fait par capillarité pendant une nuit grâce au flux du tampon SSC 10X.

Le lendemain, la membrane est visualisée sous UV afin de s'assurer du transfert des ARNs et photographiée. Les ARNs sont fixés de manière irréversible sur cette dernière par cuisson pendant 1 à 2 heures à l'étuve à 80°C ou par « cross-linking » pendant 30 secondes à 1 minute sous UV.

(appareil UV Stratalinker stratagène). Les ARNs fixés sur la membrane sont ensuite utilisés dans les réactions d'hybridation avec les sondes d'ADNc radiomarquées.

### 2.11.3 - Amplification par PCR des gènes *FAD3* et *FAD7* de soja

La PCR ou réaction de polymérisation en chaîne est une technique enzymatique de synthèse *in vitro* d'acide nucléique par laquelle un segment d'ADN (ou d'ARN) peut être spécifiquement amplifié (Mullis et *al.*, 1986). Cette technique implique l'utilisation de 2 amorces nucléotidiques spécifiques ou primers encadrant la région à amplifier. Ces deux amorces s'hybrident avec chacune des extrémités simple brin de la séquence à amplifier. L'une des séquence est directe elle correspond au brin codant, l'autre est réverse et correspond au brin non codant.

Cette technique est mise en œuvre grâce à l'utilisation de la Taq polymérase (isolée à partir de *Thermophilus aquaticus*) thermostable résistant à des températures très élevées nécessaires à la dénaturation de l'ADN double brin.

Le cycle de PCR comporte trois étapes principales (Fig. 20) : une phase de dénaturation de l'ADN à 94°C, une phase d'hybridation ADN/oligo-nucléotides à une température définie pour chaque couple d'oligonucléotides et une phase d'élongation de la séquence à 72°C à partir des extrémités 3'OH des oligonucléotides catalysée par la Taq polymérase en présence des dNTP.

Une région des gènes *FAD3* et *FAD7* de soja *Glycine max* codant respectivement pour les désaturases cytosolique et chloroplastique est amplifiée par PCR en utilisant des oligonucléotides choisis dans une zone conservée des mRNAs des deux désaturases.

- *FAD3* n° d'accension: L22964 (Yadav et *al.*, 1993) Séquence directe : 5'CATTGCTGGGTGAAGGAC 3' (pourcentage de GC : 55%).

- *FAD7* n° d'accension : L22965 (Yadav et *al.*, 1993) Séquence directe : 5'CATTGYTGGGTCAAGAATCC 3'(pourcentage de GC : 47%).

La séquence réverse 3'ATTCTCCATCCATGRTAWGG 5' est commune aux deux désaturase (pourcentage de GC : 47%).

La température d'hybridation utilisée est de 55°C

Le milieu réactionnel (100µl) contient environ 500 ng d'ADN foliaire, 1µM de chaque amorce nucléotidique , 1mM d'un mélange de 4 dNTP, 1/10 de volume de tampon Taq polymérase (10X), 15 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 U d'enzyme Taq DNA polymérase (Taq et tampon Taq commercialisés par Appligène), le mélange réactionnel est complété à 100 µl par de l'eau stérile. Un contrôle négatif (volume réactionnel sans matrice) est réalisé.

Lorsque plusieurs réactions doivent être réalisées avec différents couples d'oligo-nucléotides et une matrice (ou un couple d'oligonucléotides et différentes matrices), un mix pour (n+1) réactions est réalisé avec les dNTPs , le tampon 10x, la matrice ou le couple d'oligo- nucléotides commun à toutes les réactions, la polymérase et l'eau. Le mix est réparti dans les (n+1) tubes à vis et complété soit avec les matrices ou le couple d'amorces. Une goutte d'huile minérale est déposée sur chaque mélange réactionnel afin d'éviter l'évaporation.

Les différentes étapes de la PCR sont les suivantes :

- 3 minutes à 92°C (dénaturation permettant la séparation des deux brins de l'ADN matrice et inhibition des DNAses éventuelles), 35 à 40 cycles comprenant 1 minute à 92°C (dénaturation thermique 1 minute 30 à la température d'hybridation des amorces  $T_m = [2 (A+ T) + 4 ( G+ C)] - 4^\circ\text{C}$  pour des amorces de 15 à 20

nucléotides, 2 minutes à 72°C (élongation) et 8 minutes à 72°C (terminaison des synthèses).

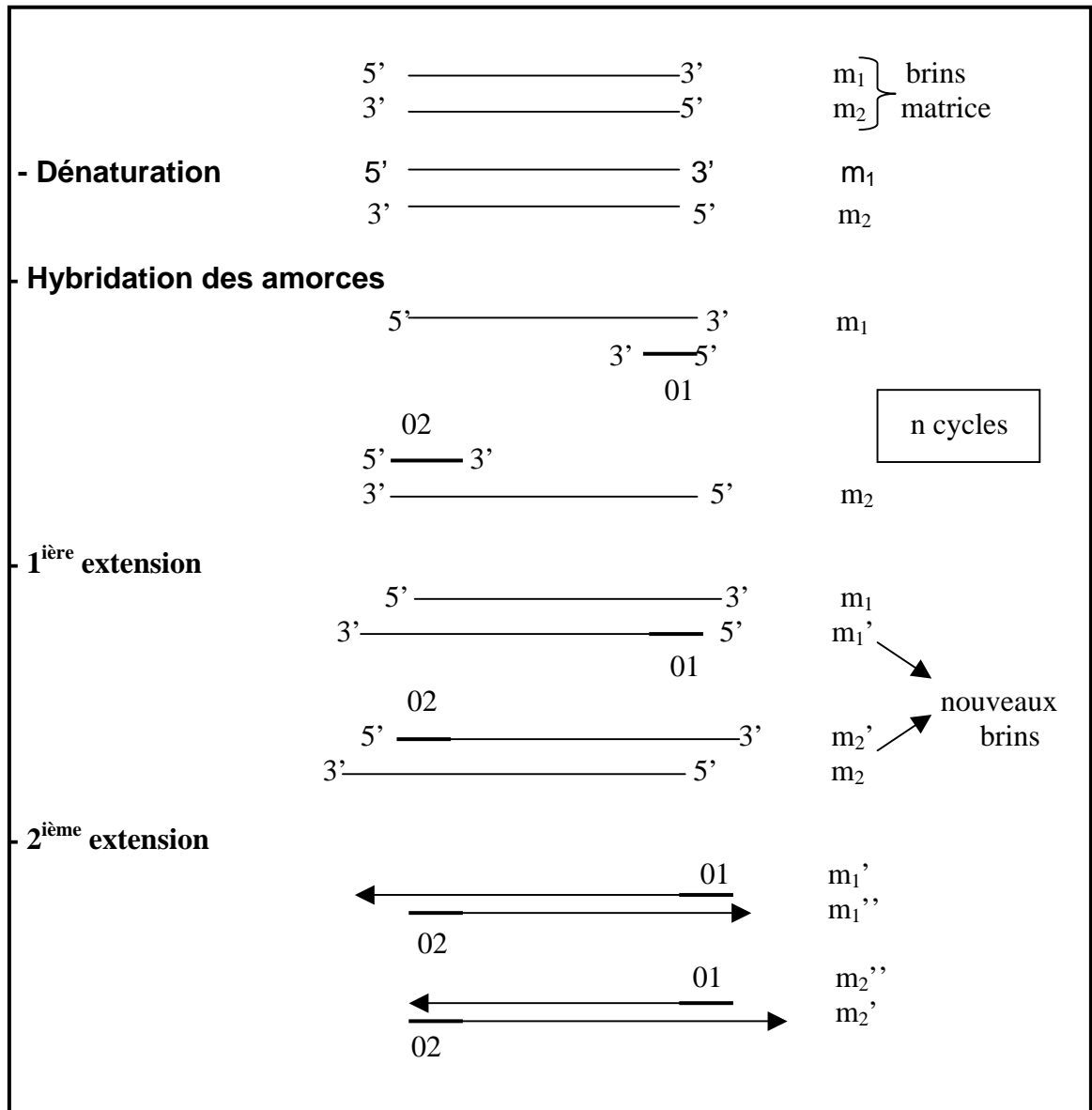


Figure 20 : Schéma du principe d'amplification par PCR d'une partie d'un gène à partir d'amorces.

Après amplification, une fraction aliquot de la réaction (10  $\mu$ l) auxquels sont ajoutés 3  $\mu$ l de tampon de charge ( $\text{Na}_4\text{EDTA}$  0,1M, Ficoll 15%, bleu de bromophénol 0,2%), est déposée sur gel d'agarose horizontal à 0.8% préparé dans du tampon Borate TBE en présence de bromure d'éthidium 0,1  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ) puis soumis à une électrophorèse (100-120 volts) dans le même tampon.

Après migration, le produit de l'amplification est visualisé sous UV (Fig. 21), le complexe ADN-BEt présentant une hyperchromicité à 254-260nm.

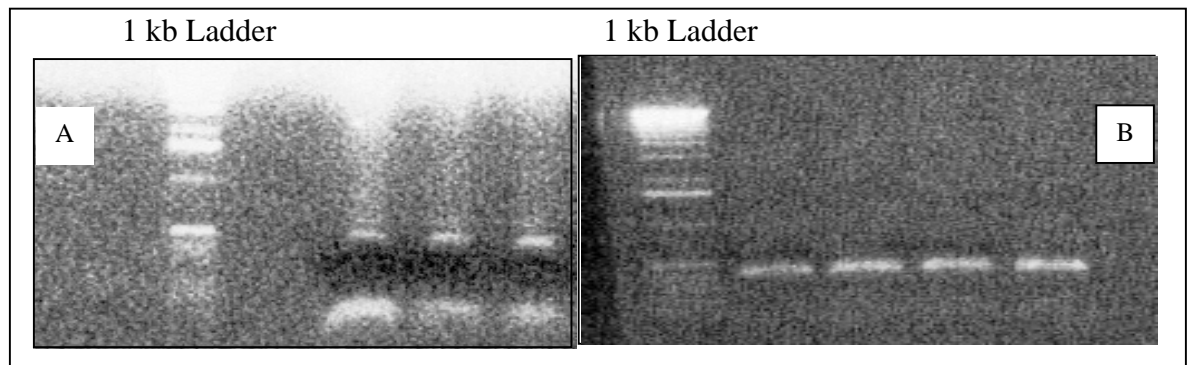


Figure 21 : Electrophorèse sur gel d'agarose des fragments des gènes *FAD7* (A) et *FAD3* (B) des feuilles de soja amplifiés par PCR. Les deux fragments ont sensiblement la même taille (environ 400pb).

Les bandes d'ADN amplifié (dans la zone correspondant à la séquence recherchée) sont découpées rapidement à l'aide d'un scalpel. L'ADN est alors élué à partir de l'agarose après adsorption sur matrice de silice (kit QIAEX II) qui permet de récupérer des fragments d'ADN dont la taille est comprise entre 100 pb et 10 kb. Le fragment d'agarose subit une dépolymérisation en présence d'iodure de sodium. L'ADN libéré se fixe sur une matrice de silice en conditions de haute force ionique. Après plusieurs lavages/centrifugations (à basse vitesse) destinés à éliminer l'agarose, les billes de silice sont rincées avec un tampon de faible force ionique, ce qui permet de décrocher l'ADN qui est alors utilisé pour un clonage ou pour la réalisation d'une sonde.

### 2.11.3.1- Extraction de l'ADN du gel d'agarose : Kit QIAEXII Agarose Gel Extraction (Qiagen).

Ce protocole permet d'extraire des fragments d'ADN à partir de gels d'agarose dans le tampon borate TBE.

La bande agarose contenant l'ADN d'intérêt est découpée délicatement à l'aide d'un scalpel est placée dans des tubes de 2 ml puis pesée afin de déterminer le volume de QX1 à utiliser. (Pour 100 mg de gel il faut 300 µl de tampon QX1) puis 10 µl de QIAEXII (résine) sont ajoutés dans les tubes. L'agarose est alors solubilisée pendant 10 minutes à 50°C (agitation toutes les 2 minutes pour garder le QIAEX II en suspension) , la coloration du mélange devient alors jaunâtre.

L'échantillon est centrifugé pendant 30 secondes 10 000 rpm (centrifugeuse de paillasse). Le culot est lavé avec 500 µl de tampon QX1. Après une centrifugation de 30 secondes, le surnageant est éliminé à l'aide d'une pipette et toutes traces d'agarose sont enlevées.

Le culot est lavé 2 fois avec 500 µl de tampon PE (tampon de lavage). Après agitation et centrifugation de 30 secondes, le surnageant est éliminé et avec lui sont éliminées toutes traces de sel.

Le culot de DNA est séché (10-15 minutes), il devient blanc. Le DNA est alors élué dans 20 µl de tampon d'éluion (Tris HCl 10 mM) ou dans l'eau. Après agitation, repos de 5 minutes à température ambiante et centrifugation pendant 30 secondes, le surnageant est délicatement récupéré dans un tube et conservé à -20°C.

La solution DNA est testée sur gel d'agarose afin de déterminer le volume de solution à utiliser pour le clonage (volume correspondant à 100ng environ).

#### **2.11.4 – Clonage des fragments PCR**

Cloner une séquence d'ADN consiste à l'introduire dans un organisme hôte. La multiplication en un très grand nombre d'exemplaires de l'hôte permet l'amplification de la séquence introduite.

La séquence d'ADN est d'abord insérée dans un « vecteur » (molécule circulaire en général de petite taille (plasmide) et se répliquant de manière autonome.

Le clonage consiste donc à insérer un fragment d'ADN d'intérêt (insert) dans un vecteur de clonage comportant un marqueur de sélection (résistance à un antibiotique) puis à transformer des bactéries rendues « compétentes » (c'est à dire rendues aptes à recevoir ou à incorporer l'ADN exogène).

##### **2.11.4 1 - Vecteur de clonage (Utilisation du kit Sure clone)**

Le vecteur utilisé est le pUC18. Il possède un gène de résistance à l'ampicilline et un site de clonage polylinker multiple situé dans le gène lacZ permettant la sélection des bactéries transformées porteuses d'un plasmide recombinant. Le polylinker, hydrolysé par une des enzymes de restriction peut recevoir une séquence d'ADN liée par recombinaison.

La technique «Sure Clone » consiste à insérer un fragment d'ADN ayant des extrémités « franches » (blunt ends) dans un vecteur linéarisé par SmaI et déphosphorylé à l'aide du kit « Sure Clone TM Ligation Kit (Pharmacia). Les plasmides obtenus sont ensuite transformés dans les bactéries compétentes puis après cultures des bactéries et extraction de l'ADN plasmidique, la séquence de l'ADN inséré est vérifiée par séquençage.

Une quantité déterminée de produit PCR est mise en présence d'un fragment Klenow de la DNA polymérase I qui rend les extrémités des fragments ADN franches. Ces fragments PCR sont phosphorylés par la T<sub>4</sub> polynucléotide kinase.

Le milieu de Blunting/Kinasing(20 µl) : comprend environ 100 ng de produit PCR, 1µl de fragment Klenow, 1µl de polynucléotide kinase, 2µl de tampon blunting/kinasing 10X et de l'eau stérile (quantité suffisante pour 20µl).

Après agitation puis brève centrifugation (30 secondes, centrifugeuse de paillasse), le mélange est incubé pendant 30 minutes à 37°C.

Après addition de 20 µl de phénol/chloroforme (v/v), agitation et centrifugation pendant 1 minute, la phase aqueuse supérieure est récupérée puis purifiée sur colonne MicroSpin (sépharyl<sup>R</sup> s-200).

Une quantité déterminée du produit PCR (60 à 100ng) est alors introduite dans un vecteur aux extrémités franches.

### 2.11.4.2 - Ligation

L'ADN à cloner et le vecteur sont mis en présence dans un milieu contenant le milieu de ligation, du DTT (dithiothreitol, antioxydant maintenant l'enzyme sous forme réduite) et la ligase T<sub>4</sub>.

Le milieu réactionnel comprend le produit blunting/kinasing (2µl), le vecteur (pUC 18, 50 ng déphosphorylé), le tampon de ligation 2X (10µl), la solution DTT (1µl), la T<sub>4</sub> DNA ligase (1µl) et de l'eau stérile (qsp 20µl).

Le mélange est agité puis centrifugé brièvement. La ligation est réalisée pendant 1 à 2 heures à 16°C. Les produits sont ensuite conservés à -20°C.

### 2.11.4.3 - Transformation des bactéries

La technique utilisée est celle de Chung *et al.*, (1989). Le principe consiste à rendre perméable la paroi bactérienne (mise en compétence) afin de permettre l'adsorption puis la pénétration de molécules d'ADN dans les cellules hôtes (en général une molécule/cellule).

Les bactéries (souche E coli NM 522 conservées dans du glycérol à -20°C) sont mises en préculture dans des tubes contenant 2 ml de milieu LB (Luria Bertani). La croissance est effectuée à 37°C sous agitation continue pendant toute une nuit (la solution devient opaque).

Les bactéries sont ensuite cultivées sous agitation dans un grand volume de milieu de culture (100 à 500 ml de milieu LB). Quand la densité bactérienne atteint environ  $2.5 \cdot 10^8$  bactéries/ml (0.6 DO<sub>600</sub>), les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000 rpm pendant 5mn à 4°C puis remises en suspension dans 1/10 du volume initial de tampon TSB froid et enfin incubées 10 mn dans la glace avant la transformation.

Les cellules sont aliquotées par fractions de 100 µl à 200 µl dans des tubes Eppendorf stériles et additionnées au mélange de ligation (25 à 50 ng d'ADN dans 5µl).

L'adsorption de l'ADN sur les bactéries se fait pendant 15 à 20 mn dans la glace. Les bactéries transformées sont alors étalées stérilement sur boîtes de pétri contenant du milieu LB gélosé additionné d'ampicilline 100 µg.ml<sup>-1</sup>.

Juste avant l'étalement des bactéries, 40 µl d'X-Gal (5-bromo-4-chloro-3 β galactopyranoside 8mM substrat que la β galactosidase métabolise en un dérivé bleu) et 4 µl d'IPTG (isopropyl β-D thiogalacto-pyranoside 3mM inducteur non métabolisable de la β galactosidase) sont ajoutés ce qui permet ainsi une sélection dite « blanc-bleue » des bactéries transformées avec un plasmide contenant l'insert. Les bactéries sont alors mises à pousser toute une nuit à 37°C.

### 2.11.4.4 - Criblage des colonies bactériennes recombinantes : sélection des colonies blanches/bleues

Le système blanc/bleu permet de repérer parmi les bactéries transformées celles comportant potentiellement l'insertion que l'on a cherché à cloner.

Le principe de la sélection des bactéries blanc-bleu est basé sur la complémentation entre deux parties du gène *LacZ* de la β galactosidase, l'une appartenant à la bactérie hôte et l'autre au vecteur. Le plasmide possède le gène amp<sup>r</sup> qui permet la

sélection par la résistance à l'ampicilline, ainsi que le promoteur du gène *lacZ* suivi d'une séquence modifiée comprenant le polylinker ou site de clonages multiples et la région N terminale du gène *lacZ* codant pour les premiers acides aminés de la  $\beta$  galactosidase. Le polylinker hydrolysé par une des enzymes de restriction, peut recevoir une séquence d'ADN liée par recombinaison. Lorsque la séquence du gène *lacZ* n'est pas interrompue, la galactosidase est synthétisée et elle hydrolyse en présence d'IPTG le substrat (X-GAL) qui donne à la bactérie une couleur bleue. L'insertion d'un fragment en l'un quelconque des sites de clonage du polylinker interrompt la phase ouverte de lecture du gène *lacZ*; l'expression du gène est interrompue et la bactérie ne peut plus hydrolyser le X-GAL en un dérivé bleu. Les bactéries porteuses d'un plasmide recombinant (comportant une insertion) forment alors sur milieu ampicilline additionné d'X-Gal et d'IPTG, des colonies blanches. Celles ci contenant potentiellement le fragment que l'on a cherché à cloner sont ensuite testées par PCR

#### **2.11.4.5 - PCR sur colonies bactériennes**

Un mix pour (n +1) colonies à tester est préparé. Le milieu contient tous les composants de la réaction et dans ce cas l'ADN est remplacé par les colonies bactériennes (blanches).

Les oligonucléotides sont spécifiques du fragment à cloner car la séquence est connue. (dans le cas contraire on peut utiliser les amorces T<sub>7</sub> et reverse du vecteur qui permettent d'amplifier l'insert quelle que soit sa nature.

Le mix est réparti dans les (n + 1) tubes, puis chaque tube estensemencé par les bactéries à l'aide d'un cure dent piqué dans chaque colonie blanche.

1/5 des produits PCR est analysé sur gel d'agarose à 0.8% (Fig. 22) en présence d'un marqueur de poids moléculaire (1 kb Ladder, BRL ou Smart Ladder).

Les clones positifs contenant un insert de la taille attendue sont alors mis à pousser individuellement dans du milieu LB additionné d'ampicilline à une concentration finale de 100  $\mu$ g/ml à 37°C pendant toute une nuit sous agitation énergique. Après dosage au spectrophotomètre, les bactéries sont récupérées par centrifugation 10 min à 4000 rpm à 4°C.

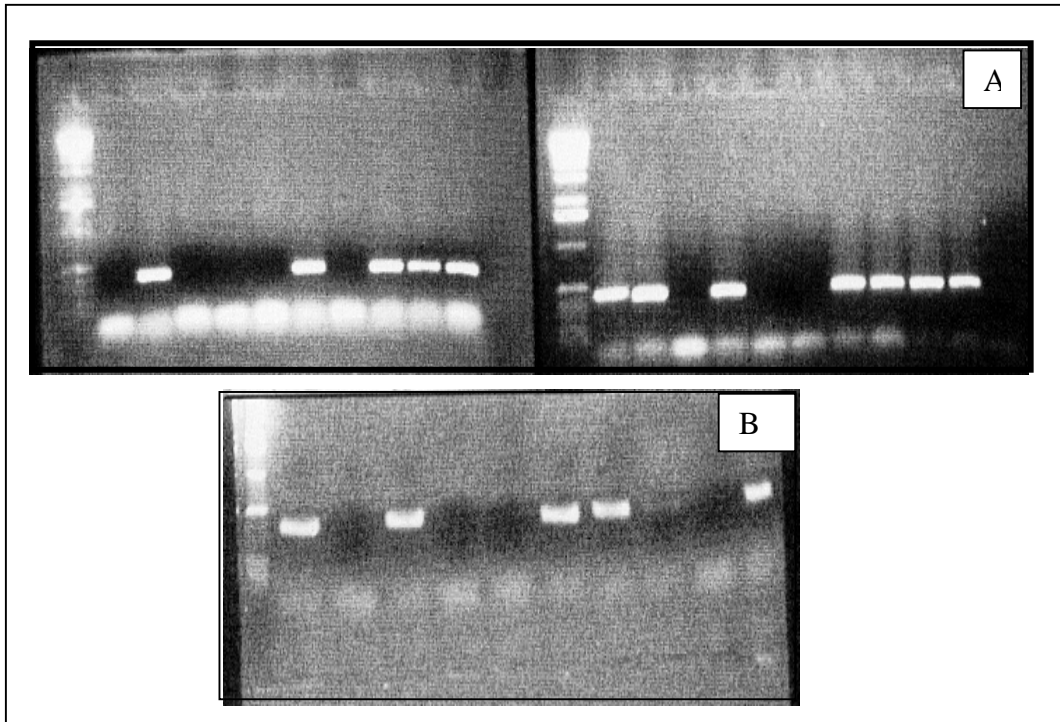


Figure 22 : Electrophorèse sur gel des produits PCR sur colonies bactériennes transformées et contenant l'insert du gène *FAD7* (A) ou l'insert du gène *FAD3* (B) des feuilles de soja.

#### 2.11.4.6 - Extraction de l'ADN plasmidique

L'ADN plasmidique est extrait soit selon la méthode de lyse alcaline soit en utilisant un kit QIAGEN.

##### o Méthode de lyse alcaline

Le principe de lyse alcaline (technique de Birnboim et Doly, 1979) consiste à éliminer l'ADN chromosomique et les protéines bactériennes par dénaturation alcaline suivie d'une brusque neutralisation. L'ADN chromosomique et les protéines forment alors un complexe insoluble qui est éliminé par simple centrifugation. L'ADN plasmidique de petite taille est protégé par sa structure superenroulée et il se renature instantanément lors de la neutralisation.

L'ADN est préparé à partir d'un petit volume de culture (minipréparation de 5 à 10 ml) ou à partir d'un grand volume de culture (maxipréparation de 100 ml ou plus). Les bactéries sont mises en culture sous agitation dans 100 ml de milieu LB additionné d'ampicilline pendant toute une nuit.

Après centrifugation pendant 10 minutes à 3000 rpm à 4°C, le culot bactérien est remis en suspension dans 1 volume (5 ml) de tampon TEG contenant du lysozyme (4 mg.ml<sup>-1</sup> lysant la paroi bactérienne) et incubé 5 minutes dans la glace.

Les ADN chromosomique et plasmidique sont dénaturés par addition de 2 volumes (10 ml) de solution de lyse alcaline (NaOH 0,2N, SDS 1%), les tubes sont doucement renversés (plusieurs fois) et mis à incuber 5 à 10 minutes dans la glace. Le milieu est neutralisé avec 1.5 volume (7,5 ml) de solution de neutralisation (acétate de sodium 3 M pH 4.8), mélangé doucement par inversion du tube (afin d'éviter la fragmentation de l'ADN chromosomique) et incubé 5 minutes dans la

glace : l'ADN plasmidique se renature , l'ADN chromosomique précipite sous l'effet de la forte salinité sous forme d'un complexe nucléoprotéique insoluble).

Après centrifugation 10 minutes à 10 000 rpm (4°C rotor JA20 Beckman), le surnageant qui contient les molécules d'ADN plasmidique est récupéré, les protéines et l'ADN chromosomique dénaturé se retrouvant dans le culot.

L'ADN plasmidique est précipité par addition de 2.5 volumes d'isopropanol (22.5 ml) et incubation pendant 15 minutes à température ambiante.

Après centrifugation pendant 15 minutes, 15 000 rpm à 4°C, rotor JA20 Beckman, le culot est rincé à l'éthanol 70% (200 µl) et séché légèrement puis repris dans du tampon d'éluion (1 ml additionnée de 10 µl de mélange RNases A et T<sub>1</sub>) ou dans de l'eau distillée stérile.

#### ○ Purification de l'ADN plasmidique

Dans le cas de la maxipréparation, l'ADN plasmidique est purifié sur gradient de chlorure de césium (centrifugation isopycnique) suivant la technique de Sambrook et *al.*, (1989) qui permet de préparer des stocks d'ADN très purs et très concentrés.

Les méthodes de purification de L'ADN plasmidique exploitent la petite taille des plasmides et leur forme circulaire superenroulée. La séparation entre ADN plasmidique et fragments d'ADN chromosomiques se fait sur la base de la différence de leur densité apparente en présence d'un agent intercalant, le bromure d'éthidium.

- A 1 ml d'ADN plasmidique (contenant les RNases A et T<sub>1</sub>) sont ajoutés 50µl de sarcosinate de sodium à 2% qui précipite les protéines et 50 µl de BET. Le tube est doucement inversé à plusieurs reprises puis soumis pendant 5 minutes à une centrifugation (centrifugeuse de paillasse - vitesse maximum). Au surnageant sont ajoutés 1.75 g de chlorure de césium (CsCl). La solution ADN-CsCl-BET est transférée dans un tube Quick Seal et complétée à 2 ml avec du tampon d'éluion ou de l'eau.

Le tube est scellé et soumis à une centrifugation de 90 000 rpm (environ 300 000g) pendant 3 heures et 30 minutes à 18°C (rotor vertical TLV 100, Beckman TLV 100). Après centrifugation, le haut du tube est percé avec une aiguille, et la bande fluorescente sous UV (contenant l'ADN- BET) est prélevée en perçant le tube avec une seringue (aiguille 18G).

Le BET est éliminé par extraction à l'isopropanol saturé avec une solution de NaCl 5M jusqu'à obtention d'une phase aqueuse incolore.

La phase aqueuse est diluée par addition de 3 volumes d'eau auxquels sont ajoutés 2.5 volumes d'éthanol pur. Après une centrifugation de 15 minutes à 11000g à 4°C, le culot d'ADN est repris dans 100 à 200 µl de tampon d'éluion et conservé à -20°C.

#### ○ Utilisation d'un kit QIAGEN.

Il s'agit de techniques de substitution plus simples utilisant les colonnes QIAGEN permettant de purifier l'ADN plasmidique en trois étapes : absorption du lysat cellulaire, élimination des impuretés par lavage et éluion de l'ADN plasmidique.

Une culture bactérienne (minipréparation) est réalisée sous agitation pendant une nuit à 37°C dans 2 ml de milieu LB additionné d'ampicilline (100 µg.ml<sup>-1</sup>).

Les bactéries sont soumises à une centrifugation pendant 5 minutes à 9500 rpm, 4°C. Le culot bactérien est repris dans 250 µl de tampon P<sub>1</sub> (tampon de resuspension). Après solubilisation, le mélange est transféré dans des tubes Eppendorf dans lesquels sont ajoutés 250 µl de tampon P<sub>2</sub> (tampon de lyse contenant du NaOH/SDS, le sel dénature les ADN chromosomique et plasmidique ainsi que les protéines, et le SDS solubilise les lipides et les protéines des membranes cellulaires lysant ainsi les bactéries). Les tubes sont renversés doucement (4 à 6 fois).

Après addition de 350 µl de tampon N<sub>3</sub> (tampon de neutralisation) et agitation immédiate et douce par inversion des tubes (4 à 6 fois), le mélange est centrifugé 10 minutes à 10 000 rpm, le surnageant est récupéré et déposé à l'aide d'une micropipette sur une colonne (QIAprep spin) placée sur un tube collecteur de 2 ml. Après une rapide centrifugation (30 à 60 secondes), le produit de filtration est jeté et la colonne est lavée avec 500 µl de tampon PB. Après une centrifugation de 30 à 60 secondes, le contenu du tube est jeté. Le tube avec colonne à sec est centrifugé rapidement pour éliminer toute trace de tampon. La colonne est rincée avec 750 µl de tampon PE (tampon de rinçage) et après une centrifugation de 30 à 60 secondes, le liquide de rinçage est jeté. Après une centrifugation à sec, les colonnes sont placées dans des tubes Eppendorf propres et le DNA est élué en ajoutant 50 µl de tampon Tris-HCl 10 mM pH 8.5 (ou de l'eau) sur le centre de la colonne puis récupéré après une centrifugation pendant 1 minute. L'ADN QIAGEN est dosé au spectrophotomètre UV-visible afin de déterminer le volume à utiliser pour le séquençage, mais aussi le volume nécessaire pour une amplification par PCR.

### 2.11.5 – Séquençage

Les clones obtenus sont soumis à un séquençage automatique Applied Biosystems 373 A (Kit Big Dye, primer Universel).

Le séquençage est réalisé sur de l'ADN matrice à double brin dans un thermocycleur Perkin Elmer.

Le séquençage consiste à analyser la séquence des bases azotées (A,G,C,T) dans un ADN. La méthode utilisée est celle décrite par Sanger et *al.*, (1977), qui utilise les 4 nucléotides modifiés les didésoxynucléotides (ddNTP) chacun marqué avec un groupement fluorescent de couleur différente ou fluorophore.

Les ddNTPs agissent comme des terminateurs de chaîne pour produire un démaillage de molécules générées par l'extension polymérase d'une amorce ; ils sont dilués avec des dNTPs de façon à ce que la polymérisation puisse s'effectuer sur une certaine longueur, mais elle s'arrête lorsque un ddNTP est intégré (l'absence de OH en position 3' du ddNTP empêche la liaison avec de nouveaux nucléotides).

Une fois la réaction de polymérisation terminée, l'ensemble est séparé par électrophorèse et chaque type de molécule est détectée grâce au marqueur fluorescent excité par un laser.

La taille des molécules détectées et leur type de fluorescence permet alors de reconstituer l'ensemble de la séquence du fragment.

La réaction est menée dans un tube contenant les didésoxynucléotides ou ddNTPs Le volume réactionnel qui est de 20 µl comporte 2µl de mélange ddNTPs et dNTPS, 3µl de tampon de dilution 5X (Tris/HCl 400 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 9),

l'enzyme Taq, 3,2 pmol d'amorces (universal primer direct et reverse), et de l'ADN matrice dont la quantité dépend de la nature (simple brin : 50 à 100 ng, double brin :200 à 500 ng ou produit PCR : 30 à 90 ng) et de la taille de l'ADN à séquencer.

La polymérisation est réalisée sur 25 cycles de 10 secondes à 96°C, 5 secondes à 50°C et 4 minutes à 60°C.

Lorsque la réaction de polymérisation est terminée, l'ADN est précipité par 3 volumes d'éthanol à 95%. Après incubation 15 minutes à l'obscurité, le mélange est centrifugé 15 minutes à 15 000rpm à 4°C. Le culot est lavé dans 100µl d'éthanol à 70% puis repris dans du formamide avant dépôt sur un gel de polyacrilamide 6% (dans de l'urée 8 M).

Les séquences d'ADN déterminées sont insérées dans la base de données (EMBL ou GenBank). Les fragments clonés sont identifiés par le logiciel BLASTn.

### **2.11.6.- Préparation d'une sonde radio-marquée (marquage aléatoire)**

Réaliser une sonde, consiste à introduire dans une molécule (ADN ou ARN), l'un de ses composants (nucléotide) chimiquement modifié de manière à rendre détectable la molécule dans laquelle il est incorporé.

Dans le cas d'un produit PCR, un atome de phosphore radioactif ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP) est introduit par la technique de random priming (recopiage aléatoire).

L'ADN double brin servant de matrice est dénaturé permettant ainsi l'hybridation d'amorces nucléotidiques sur les deux brins de la matrice. La synthèse des brins complémentaires est réalisée en présence du fragment de Klenow de l'ADN polymérase I, de  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP (3000 Ci/mmol, 111 TBq/mmol) et des trois autres nucléotides froids (Nonaprimer kit Appligène).

L'ADN à marquer (environ 50 ng-100ng) est dénaturé 10 minutes à 100°C. Après centrifugation pendant 20 secondes, sont ajoutés 3 µl de tampon de réaction contenant les amorces, 3 µl d'un mélange de nucléotides en proportions égales (dATP, dTTP et dGTP), 3 µl de  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP (3 000Ci/mmol) et 1µl de fragment klenow de la DNA polymérase.

Les brins d'ADN complémentaires sont synthétisés pendant 45 minutes à 37°C. La réaction est bloquée par ajout de 500 µl de tampon d'hybridation. La sonde peut ensuite être conservée à -20°C.

### **2.11.7 - Hybridation**

La membrane de nylon (contenant le transfert d'ARNs) est préhybridée pendant 3 heures minimum avec du tampon d'hybridation dans le but de saturer les sites potentiels de fixation aspécifique de la sonde sur la membrane. La membrane est ensuite mise en contact de la sonde radioactive d'ADN dénaturée à 100°C pendant 10 minutes) ; la réaction d'hybridation dure toute une nuit à 42°C sous agitation.

Le lendemain, la membrane est rincée un certain nombre de fois sous agitation dans des solutions salines et à des températures croissantes (conditions de stringence décroissante) afin d'éliminer la sonde en excès fixée au niveau de sites aspécifiques : 15 minutes dans une solution SSC 1X, SDS 0.1% à 42°C, 15 minutes

dans la même solution à 60°C et 15 minutes dans une solution SSC (0.2x), 0.1% SDS à 60°C.

La membrane est ensuite légèrement séchée sur du papier Whatman 3M, placée entre deux films plastiques dans une cassette, puis mise en contact avec un film autoradiographique (Amersham, UK). La cassette est placée à -80°C pour une durée qui peut varier de quelques heures à quelques jours en fonction de l'intensité du signal. Les films sont ensuite développés de manière automatisée (appareil hyperprocessor, Amersham).

La figure 23, résume les principales étapes de la démarche expérimentale suivie pour l'étude de l'expression des gènes *FAD3* et *FAD7* dans les feuilles de soja.

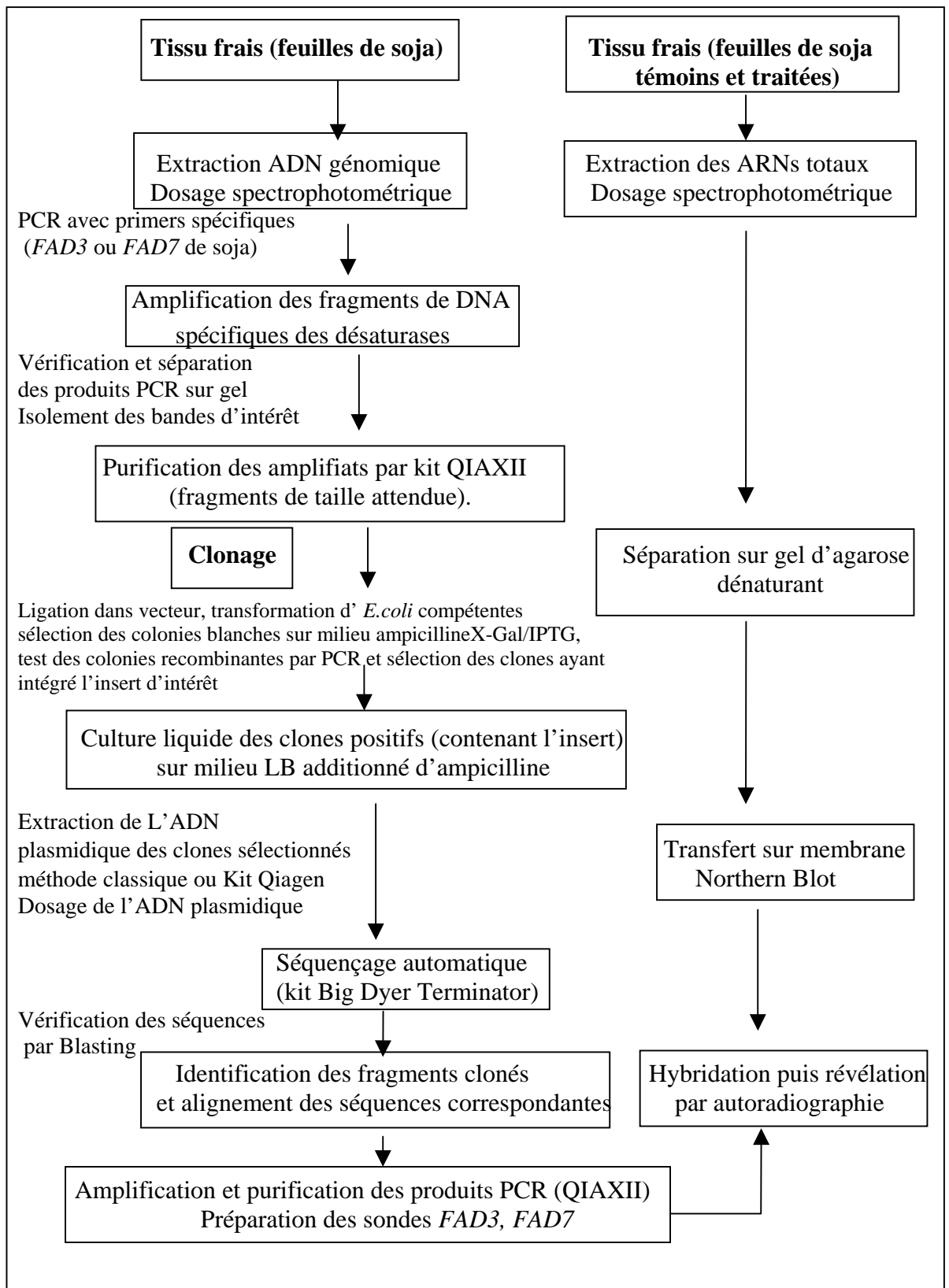


Figure 23 : Protocole suivi pour l'étude de l'expression de deux gènes des désaturases lipidiques *FAD3* et *FAD7* dans les feuilles de plantules de soja témoins et traitées par le norflurazon.

# Les Lipides des Feuilles de Soja : Composition, Biosynthèse et Désaturation

## 1 - Composition en lipides membranaires des feuilles de soja

Pour pouvoir bien cerner l'impact du norflurazon sur le métabolisme lipidique des feuilles de soja *Glycine max* L., nous avons commencé par étudier la composition, la biosynthèse et la désaturation des lipides foliaires du soja. En plus de l'analyse des acides gras des lipides totaux et de ceux des catégories lipidiques, nous avons réalisé une analyse fine des espèces moléculaires des lipides polaires pour déterminer les espèces moléculaires substrats potentiels des désaturases des feuilles de soja.

### 1.1 - Composition en acides gras des lipides totaux

L'analyse des acides gras des lipides des feuilles de plantules de soja (Fig. 24), montre l'absence de l'acide hexadécatriénoïque (C16:3) du fait que le soja est une plante de type C<sub>18:3</sub>. L'acide gras prédominant est l'acide linoléique qui représente 57,7% des acides gras totaux., les acides linoléique et oléique sont retrouvés à des proportions respectives de 10,6% et 5% des acides gras totaux. Les acides gras saturés, acide palmitique et acide stéarique sont respectivement de l'ordre de 15,4% et 9%.

L'indice de doubles liaisons (IDL) correspondant au nombre de doubles liaisons pour 100 molécules d'acides gras est de 201.6.

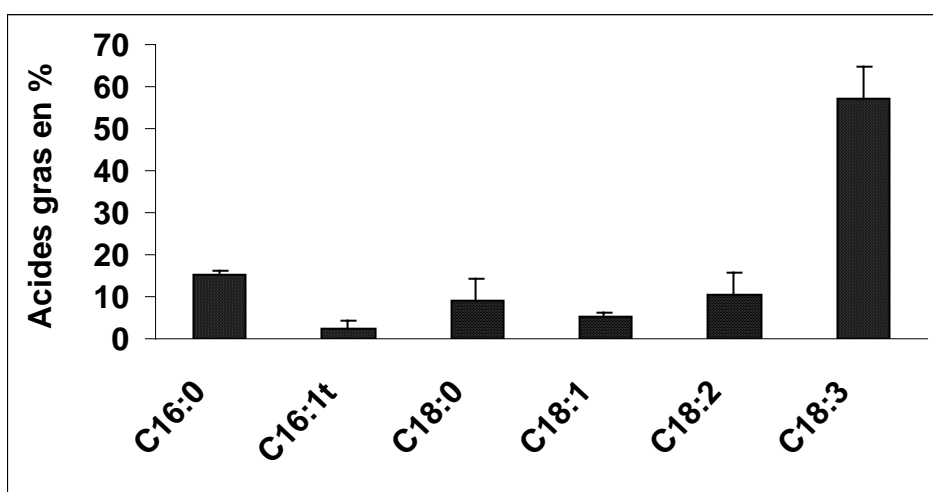


Figure 24 : Composition en acides gras totaux des feuilles de plantules de soja.

### 1.2 - Distribution des différentes classes lipidiques

L'analyse par chromatographie sur couche mince a permis de mettre en évidence les différentes catégories lipidiques présentes dans les feuilles de soja. La figure 25, montre la distribution de ces diverses catégories lipidiques.

Dans le compartiment chloroplastique, les galactolipides sont les lipides les plus importants, ils représentent 52% des lipides foliaires et 87% des lipides chloroplastiques. Le MGDG, qui est le lipide majoritaire, constitue 31% des lipides totaux. Il est suivi du DGDG qui représente 20% des lipides totaux. Le PG, seul phospholipide chloroplastique ne représente que 7% des lipides totaux.

Dans le compartiment extrachloroplastique, la catégorie lipidique la plus importante est la PC qui représente 14.5% des lipides totaux. PE, PI et PA sont en faibles proportions : 2.3%, 3.6% et 1.4% respectivement.

Les lipides neutres représentent 19.9% des lipides totaux. Ils peuvent provenir des réserves lipidiques des cellules (formant des gouttelettes dispersées dans le cytoplasme ou le chloroplaste) ou des biomembranes.

Cette composition en classes lipidiques témoigne de l'importance des galactolipides dans les tissus photosynthétiques.

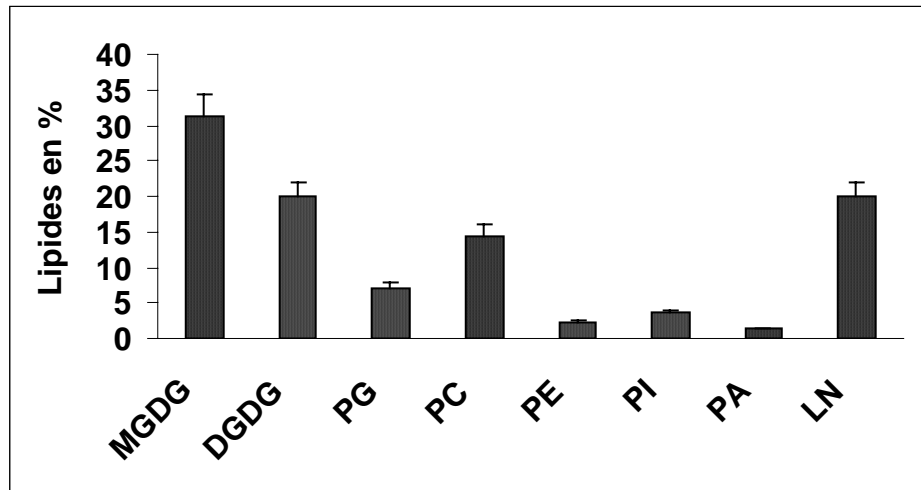


Figure 25 : Composition en classes lipidiques des feuilles de plantules de soja.

### 1.3 - Acides gras des différentes classes lipidiques

#### 1.3.1 - Lipides des membranes chloroplastiques

Dans les galactolipides (Tab. III), l'acide gras majoritaire est l'acide linoléique qui représente 91.3% des acides gras dans le MGDG et 81.1% dans le DGDG; l'acide palmitique est plus important dans le DGDG : 12.5% contre 3.2% seulement dans le MGDG. Les acides stéarique, oléique et linoléique ne sont que très faiblement représentés dans les deux classes lipidiques.

Les indices de doubles liaisons dans le MGDG et le DGDG sont respectivement de 279.9 et 248 ce qui témoigne d'une plus grande insaturation du MGDG.

Dans le PG, l'acide gras le plus abondant (35.7%) est un acide gras inhabituel : l'acide transhexadécénoïque ou C16:1t estérifiant la position sn-2 de ce lipide ; il est suivi de près de l'acide palmitique (35%), puis viennent dans l'ordre décroissant les acides stéarique (10%), linoléique (8.2%), oléique (7%) et linoléique (4.5%).

Des trois lipides chloroplastiques analysés, le PG est le lipide le plus saturé avec un indice de double liaison de 76.5.

Tableau III : Composition en acides gras des catégories lipidiques des feuilles de plantules de soja. ( Acides gras en % des acides gras totaux).

	<b>C16:0</b>	<b>C16:1t</b>	<b>C18:0</b>	<b>C18:1</b>	<b>C18:2</b>	<b>C18:3</b>	<b>IDL</b>
<b>MGDG</b>	03.2 ± 0.5		02.3 ± 0.6	00.2 ± 0.0	02.8 ± 0.6	91.3 ± 1.3	279.7
<b>DGDG</b>	12.5 ± 0.6		03.5 ± 0.3	00.7 ± 0.3	02.0 ± 0.1	81.1 ± 1.2	248.0
<b>PG</b>	34.6 ± 0.6	35.7 ± 2.1	09.9 ± 1.5	06.9 ± 0.9	04.5 ± 0.3	08.3 ± 1.0	76.5
<b>PC</b>	22.4 ± 0.3		07.9 ± 0.9	02.8 ± 0.4	30.9 ± 1.4	35.9 ± 1.8	172.3
<b>PE</b>	33.3 ± 2.8		20.8 ± 1.1	02.8 ± 0.3	28.8 ± 3.9	14.0 ± 1.4	102.4
<b>PI</b>	39.1 ± 3.6		25.6 ± 1.4	02.5 ± 0.8	15.0 ± 1.0	16.6 ± 1.6	82.3

### 1.3.2 – Lipides des membranes extrachloroplastiques

La composition en acides gras des lipides extrachloroplastiques est rapportée dans le tableau III.

Dans la PC, les acides gras les plus abondants sont les acides linoléique (36%), linoléique (31%) et palmitique (22%); les acides stéarique et oléique ne sont représentés qu'en faibles proportions (7.9% et 2.8% respectivement).

Au niveau de la PE, l'acide palmitique est l'acide gras majoritaire (33%), il est suivi des acides linoléique (29%), stéarique (21%) et linoléique (14%); l'acide oléique ne constitue que 3% des acides gras de la PE.

Dans le PI, l'acide palmitique est prédominant (39%) ; viennent ensuite dans l'ordre les acides stéarique (25.6%), linoléique (16.6%), linoléique (15%) et oléique (2.5%).

Le calcul des indices de doubles liaisons des phospholipides extrachloroplastiques montre que la PC est le phospholipide le plus insaturé (172.3) elle est suivie de la PE (102.4) puis du PI (82.3).

De tous les lipides des feuilles de soja, les galactolipides sont largement plus insaturés que les phospholipides, et parmi les phospholipides, les PI et PG sont les plus saturés.

## 1.4 - Composition en espèces moléculaires des lipides polaires

### 1.4.1 – lipides des membranes chloroplastiques

L'analyse par HPLC a permis la séparation et la collecte des lipides polaires des feuilles de soja..

Les espèces moléculaires des classes lipidiques MGDG, DGDG, PG, PC et PE ont été séparées par HPLC suivant la longueur de la chaîne et le nombre de doubles liaisons.

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse des acides gras constitutifs des espèces moléculaires de ces classes lipidiques a révélé des différences dans leur composition.

Dans les galactolipides (Tab. IV), l'espèce moléculaire 18:3/18:3 (dilinoléoyl) se trouve en fortes proportions (91.8% pour le MGDG et 69% pour le DGDG); elle est suivie de l'espèce 16:0/18:3 (palmitoyl/linoléoyl) (4.4% dans le MGDG et 20% dans le DGDG); les autres espèces moléculaires ne sont que faiblement représentées il s'agit des espèces moléculaires 18:2/18:2 (dilinoléoyl) qui représente 3.2% dans le MGDG et 0.4% dans le DGDG, 18:0/18:3 (stéaroyl/linoléoyl) en proportion négligeable dans le MGDG et représentant 5.8% dans le DGDG. Les espèces moléculaires 18:1/18:3 (oléoyl/linoléoyl), 18:1/18:2 (oléoyl/linoléoyl) et 16:0/18:2 (palmitoyl/linoléoyl) sont absentes dans le MGDG et présentes à des taux très faibles dans le DGDG (entre 0.1% et 0.9%).

Tableau IV : Composition en espèces moléculaires des galactolipides des feuilles de plantules de soja. (nmoles %).

<b>Espèces Moléculaires</b>	<b>MGDG</b>	<b>DGDG</b>
18:3/18:3	<b>91.8</b>	<b>69.1</b>
18:2/18:3	0.3	2.9
18:1/18:3	-	0.7
18:0/18:3	0.1	5.8
16:0/18:3	4.4	<b>19.8</b>
18:2/18:2	3.2	0.4
18:1/18:2	-	0.1
16:0/18:2	-	0.9

Notons que le MGDG qui présente une plus forte proportion de l'espèce moléculaire 18:3/18:3 (92%) est plus insaturé que le DGDG (69%) qui par ailleurs affiche 20% de l'espèce moléculaire 16:0/18:3.

Le PG, phospholipide chloroplastique de type procaryote comprend des espèces moléculaires différentes de celles des autres lipides chloroplastiques avec soit de l'acide palmitique (C16:0) en position sn-2 soit de l'acide trans hexadécénoïque (C16:1t).

Il présente six espèces moléculaires (Tab. V), correspondant aux 18:3/16:0 (linoléoyl/palmitoyl), 18:3/16:1t (linoléoyl/transhexadécénoyl), 18:2/16:0 (linoléoyl/palmitoyl), 18:2/16:1t (linoléoyl/trans hexadécénoyl), 18:1/16:0 (oléoyl/palmitoyl) et 18:1/16:1t (oléoyl/trans hexadécénoyl).

Les espèces moléculaires les plus représentées sont celles à résidu oléoyl qui représentent 60% des espèces moléculaires du PG, elles sont suivies des espèces moléculaires à résidu linoléoyl formant 30% du PG total. Viennent en dernière position les espèces moléculaires à résidu linoléoyl qui représentent 10% des espèces moléculaires totales du PG.

Il est à remarquer un certain équilibre entre les proportions d'espèces moléculaires saturées avec du C16:0 en position sn2 du glycérol et les espèces moléculaires monoinsaturées avec du C16:1t.

Tableau V: Composition en espèces moléculaires du PG des feuilles de plantules de soja. (nmoles %).

<b>Espèces Moléculaires</b>	<b>PG</b>
<b>18 :3/16 :0</b>	14.5
<b>18 :3/16 :1t</b>	15.2
<b>18 :2/16 :0</b>	7.2
<b>18 :2/16 :1t</b>	3.5
<b>18 :1/16 :0</b>	30.4
<b>18 :1/16 :1t</b>	29.1

Les proportions élevées des espèces moléculaires à résidus oléoyl (18 :1/16 :0 et 18 :1/16 :1t) représentent 60% des espèces moléculaires totales du PG) font du PG un lipide relativement saturé.

#### **1.4.2 – Lipides des membranes extrachloroplastiques**

Dans la PC (Tab. VI), huit espèces moléculaires ont été identifiées ; l'espèce moléculaire majeure est l'espèce 18:2/18:3 qui représente près de 91% des espèces moléculaires totales.

L'espèce la plus insaturée 18 :3/18 :3 est en très faible proportion (0.6%). Les espèces moléculaires 16 :0/18 :3 et 16 :0/18 :2 contenant de l'acide palmitique en position sn-1 du glycérol constituent 4% et les espèces moléculaires à résidu oléoyl (18 :1/18 :3 et 18 :1/18 :2) ne figurent qu'à un taux de 1% des espèces moléculaires de PC. Les produits initiaux de biosynthèse à savoir 18 :1/18 :1 ou 16 :0/18 :1 sont absents ce qui indique que la désaturation de ces derniers en espèces moléculaires plus insaturées a été précoce.

Au niveau de la PE (Tab. VI), parmi les six espèces moléculaires identifiées, quatre sont largement représentées il s'agit des espèces moléculaires 16:0/18:3 (33,5%), 18:2/18:2 (29%) 16:0/18:2 (14.5%) et 18:3/18:3 (13.6%). Les espèces moléculaires 18 :2/18 :3 et 18 :1/18 :3 sont en faibles proportions (5,8% et 3,4%) respectivement.

Tableau VI : Composition en espèces moléculaires des PC et PE des feuilles de plantules de soja. (nmoles %).

Espèces Moléculaires	PC	PE
<b>18 :3/18 :3</b>	0.6	13.6
<b>18 :2/18 :3</b>	<b>91.2</b>	5.8
<b>18 :1/18 :3</b>	0.4	3.4
<b>18 :0/18 :3</b>	0.3	-
<b>16 :0/18 :3</b>	1.9	33.5
<b>18 :2/18 :2</b>	3.0	29.0
<b>18 :1/18 :2</b>	0.4	-
<b>16 :0/18 :2</b>	1.9	14.5

L'ensemble de nos résultats portant sur la composition en lipides, en acides gras et en espèces moléculaires des classes lipidiques des feuilles de soja montre que :

- L'acide linoléique est très abondant dans les galactolipides (il représente 91% des acides gras du MGDG et 81% des acides gras du DGDG) alors qu'il est moins représenté dans les phospholipides.

- L'acide linoléique est peu abondant dans les lipides chloroplastiques alors qu'il est en proportions relativement élevées dans les lipides extrachloro-plastiques.

- Le taux d'acide oléique est faible dans toutes les classes lipidiques.

- l'acide palmitique est moyennement représenté dans les différentes classes lipidiques à l'exception du MGDG où il ne figure qu'à un taux de 3,2% .

- L'acide trans hexadécénoïque n'est présent que dans le PG chloroplastique.

- L'acide stéarique est en faibles proportions dans toutes les classes lipidiques sauf dans les PE et PI où il est à des taux respectifs de 20,5% et 25,6%.

- L'indice de doubles liaisons est très élevé dans les galactolipides (279.7 et 248 respectivement dans les MGDG et DGDG), ils sont suivis par la PC et la PE (172.3 et 102.4) puis par le PI (82.3) et enfin le PG (76). De tous les lipides étudiés, les PG et PI sont les lipides les moins insaturés.

Dans les feuilles de soja, seul le PG présente des espèces moléculaires de type procaryote. Les galactolipides à l'instar de la PC et du PE sont constitués d'espèces moléculaires de type eucaryote.

Dans les galactolipides, les espèces moléculaires les plus insaturées 18 :3/18 :3 sont largement majoritaires (92% dans le MGDG et 69% dans le DGDG). Des deux galactolipides le DGDG est le plus saturé car non seulement la proportion de 18 :3/18 :3 est plus faible que celle du MGDG mais en plus il présente 20 % de l'espèce moléculaire 16 :0/18 :3. Ces résultats sont en accord avec de nombreux travaux rapportés dans la littérature dont ceux de Serghini-Caïd *et al.*, (1988) sur les feuilles de pois.

La séparation des espèces moléculaires de la PC et du MGDG indique que la PC présente plus d'espèces moléculaires (huit espèces moléculaires contre cinq dans le MGDG), cette différence entre PC et MGDG est que dans la PC, la désaturation est incomplète d'où la diversité de ses espèces moléculaires.

## 2 - Biosynthèse *de novo* des lipides dans les feuilles de soja

La biosynthèse *de novo* des lipides a été suivie en fournissant du [1-<sup>14</sup>C] acétate de sodium (déposé sous forme de microgouttes) à des feuilles de plantules de soja.

L'acétate est le précurseur de tous les acides gras des cellules eucaryotes et procaryotes. Le [1-<sup>14</sup>C] acétate est de ce fait un précurseur de choix pour l'étude de la biosynthèse *de novo* des acides gras et donc des lipides.

Nous avons suivi l'incorporation de la radioactivité dans les lipides des feuilles après 6 heures, 24 heures et 48 heures de marquage.

### 2.1 - Incorporation du [1-<sup>14</sup>C] acétate dans les lipides foliaires.

Dès les six (6) premières heures de marquage (Fig. 26 A), les lipides totaux incorporent 29% de radioactivité soit 5.9 μmol.g<sup>-1</sup>MVF. L'incorporation est soutenue jusqu'à 24 heures de marquage avec un rythme légèrement ralenti pour atteindre un maximum (54% ) de radioactivité incorporée (soit 11.3 μmol.g<sup>-1</sup> MVF). Au delà la radioactivité des lipides décline et le taux de [1-<sup>14</sup>C] acétate incorporé n'est plus que de 42% après 48 heures de marquage (soit 8.9 μmol.g<sup>-1</sup> MVF).

La diminution du taux de radioactivité observée après 24 heures correspondrait probablement à une amorce de la dégradation des lipides marqués et à un renouvellement de leurs acides gras constitutifs (turn over).

Nous constatons qu'après 24 heures de marquage, environ 54% du précurseur radioactif se sont intégrés dans les lipides totaux, le reste étant probablement engagé dans d'autres voies métaboliques.

### 2.2 - Incorporation du [1-<sup>14</sup>C] acétate dans les classes lipidiques.

Dès 6 heures de marquage, les lipides polaires incorporent 80% de la radioactivité totale (4.7 μmol.g<sup>-1</sup>MVF), le taux de radioactivité augmente après 24 heures de dépôt du précurseur radioactif atteignant 89% de radioactivité incorporée (10 μmol.g<sup>-1</sup>MVF).

Après 48 heures de marquage le pourcentage de radioactivité incorporé dans les lipides polaires diminue à 78% (7 μmol.g<sup>-1</sup>MVF) (Fig. 26 A).

Les lipides neutres incorporent 20% de radioactivité après 6 heures de dépôt du précurseur radioactif. Ce taux de radioactivité incorporée est maintenu pendant toute la durée du marquage (Fig. 26 A).

La cinétique d'incorporation du [1-<sup>14</sup>C] acétate dans les différentes classes lipidiques (Fig. 26B et C), montre que, dès 6 heures, la PC est la catégorie lipidique la plus marquée (2.6 μmol.g<sup>-1</sup> MVF), sa radioactivité est presque doublée après 24 heures de marquage puis elle décline après 48 heures tout en restant la plus élevée comparativement aux autres classes lipidiques.

Elle est suivie du PG qui affiche une radioactivité maximale (1.66 μmol.g<sup>-1</sup> MVF) après 24 heures de marquage.

Le MGDG qui est relativement peu radioactif (0.42 μmol.g<sup>-1</sup> MVF) après 6 heures de marquage voit sa radioactivité augmenter en fonction du temps de marquage devenant le lipide chloroplastique le plus radioactif (1.45 μmol.g<sup>-1</sup> MVF) après 48 heures de marquage.

Les DGDG, PE et PI qui sont les lipides les moins radioactifs pour tous les temps de marquage ne montrent pas de grands changements dans leur niveau de radioactivité entre le début et la fin du temps de marquage.

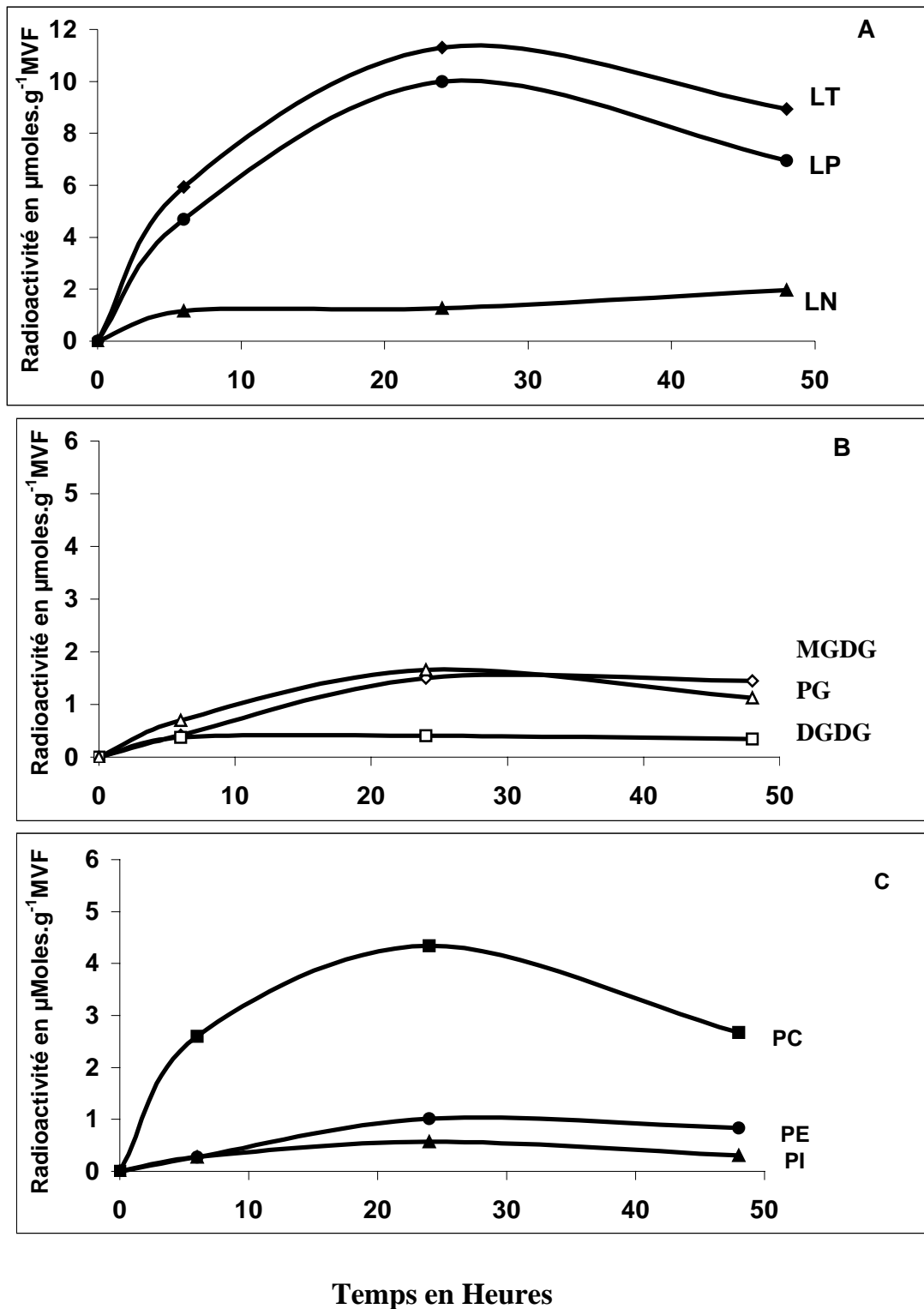


Figure 26 : Cinétique d'incorporation du [1-14C] acétate dans les différents lipides foliaires des plantules de soja. (Radioactivité en  $\mu\text{moles.g}^{-1}\text{MVF}$ ).

En valeur relative (Tab. VII), dans le compartiment chloroplastique, dès 6 heures de marquage, le PG est le lipide le plus marqué (environ 12 % de la radioactivité totale), il est suivi du MGDG (8% de radioactivité incorporée) puis du DGDG (6.6%). Les PG et MGDG radioactifs sont à un taux maximal après 24 heures de marquage avec toujours le PG le plus marqué (15.3%) suivi du MGDG (14%) ; la proportion de DGDG radioactif diminue par contre.

Entre 24 heures et 48 heures, la radioactivité augmente dans le MGDG qui devient le lipide radioactif le plus représenté des lipides du chloroplastes (16.6%), il est suivi du PG (12.8%) puis du DGDG dont le taux de radioactivité est le plus faible 3.8% de la radioactivité des lipides totaux.

Le SQDG est très faiblement marqué pour tous les temps de marquage (les résultats ne sont pas pris en compte).

Tableau VII : Distribution de la radioactivité (en pourcentage de la radioactivité des lipides totaux) dans les classes lipidiques des feuilles de soja.

			Lipides Chloroplastiques			Lipides extrachloroplastiques		
Temps	LP	LN	MGDG	DGDG	PG	PC	PE	PI
6 h	80.0	20.0	7.7	6.6	11.8	43.5	4.6	4.6
24 h	88.7	11.3	13.9	3.7	15.3	39.9	9.4	5.2
48 h	77.9	22.1	16.6	3.8	12.8	30.5	9.5	3.6

Dans le compartiment extrachloroplastique (Tab.VII), la PC est la catégorie lipidique radioactive la plus importante et ceci pour tous les temps de marquage . En effet après 6 heures de marquage, elle incorpore près de la moitié de la radioactivité des lipides totaux (44%). L'incorporation de la radioactivité dans ce lipide diminue légèrement après 24 heures de marquage soit 39.9% de radioactivité incorporée. La diminution se poursuit jusqu'à 48 heures de marquage où le taux de radioactivité incorporée n'est plus que de 30.5% de la radioactivité des lipides totaux.

PE qui est relativement faiblement marqué après 6 heures (4.6% de radioactivité), voit son pourcentage de radioactivité doubler après 48 heures de marquage.

Dans le PI, il n'y a pas de grand changement dans le niveau de radioactivité incorporée entre le début et la fin du marquage.

La cinétique de marquage des lipides polaires PC et MGDG ( Fig. 27), montre que quand la radioactivité dans la PC diminue, celle du MGDG augmente ce qui suggère un transfert de la radioactivité de la PC du compartiment extrachloroplastique vers le MGDG dans le compartiment chloroplastique. Ceci appuie l'hypothèse selon laquelle la PC intervient dans la synthèse des galactolipides de type eucaryotique (Trémolières et *al.*, 1980 ; Roughan et Slack, 1984, Norman et St John, 1986).

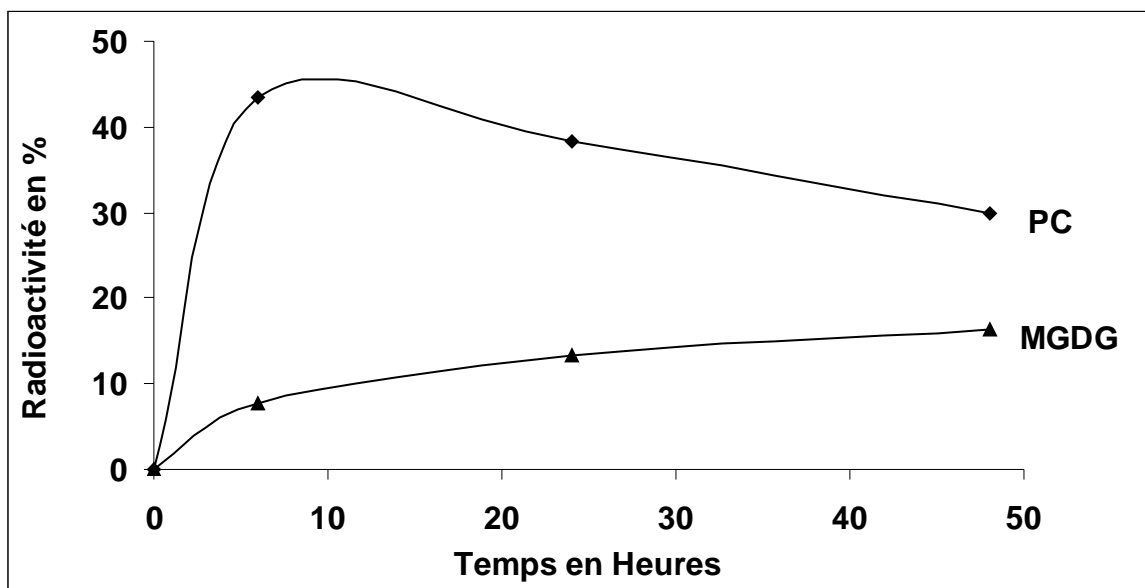


Figure 27 : Cinétique d'incorporation du [1-<sup>14</sup>C] acétate dans la PC et le MGDG des feuilles de soja. (Radioactivité en % de la radioactivité des lipides totaux).

## 2.3 - Incorporation du [1-<sup>14</sup>C] acétate dans les acides gras

### 2. 3.1 - des lipides totaux.

Après 6 heures de marquage, l'acide palmitique, a incorporé 32% de radioactivité, au delà, le taux d'acide palmitique radioactif diminue, alors que celui de l'acide trans hexadécénoïque augmente lentement. L'acide stéarique est peu marqué et ceci pour tous les temps de marquage étudiés (Tab. VIII) ; il est rapidement désaturé en acide oléique.

Concernant les acides gras insaturés à 18 atomes de carbone, dans l'acide oléique, la radioactivité qui est relativement bien représentée après 6 heures de marquage (18,4%), décline jusqu'à atteindre près de 5% à 48 heures. La diminution de l'acide oléique radioactif est due à sa désaturation en acide linoléique puis en acide linoléique.

L'acide linoléique qui est fortement marqué après 6 heures de marquage (40%) présente une certaine réduction de son taux de radioactivité après 24 heures au delà il y a reprise de l'incorporation de la radioactivité. Dans l'acide linoléique, le taux de radioactivité augmente lentement avec cependant un léger déclin à 48 heures.

Tableau VIII : Cinétique d'incorporation (en %) du [1-<sup>14</sup>C] acétate dans les acides gras totaux des feuilles de plantules de soja.

Acides Gras	6 h	24 h	48 h
<b>C16 :0</b>	32.2	22.4	23.3
<b>C16 :1t</b>	4.8	6.2	6.0
<b>C18 :0</b>	6.0	4.9	4.4
<b>C18 :1</b>	18.4	11.7	4.7
<b>C18 :2</b>	33.9	24.5	36.6
<b>C18 :3</b>	4.7	29.9	25.0
<b>Σ C16</b>	37.0	28.6	29.3
<b>Σ C18</b>	63.0	71.4	70.7

La somme des acides gras radioactifs à 16 carbones diminue légèrement après 6 heures de dépôt du précurseur alors que celle des acides gras à 18 carbones augmente pendant toute la durée du marquage (Tab. VIII), ce qui traduit une activation de la synthèse des acides gras à 18 carbones et donc de la palmitoyl élongase.

### 2.3.2 - Des classes lipidiques

Le précurseur radioactif fourni se retrouve dans les acides gras estérifiés aux différents lipides. Il est donc important de suivre la distribution de la radioactivité dans les acides gras des différentes classes lipidiques et de voir au sein de chaque catégorie lipidique la désaturation des acides gras mono ou di-insaturés en acides gras plus insaturés.

#### 2.3.2.1 - MGDG

Dans le MGDG (Fig. 28), l'acide palmitique est relativement bien marqué entre 6 heures et 24 heures de marquage (14%) ; au delà, la radioactivité de cet acide gras diminue pour n'être plus que de 8% après 48 heures de marquage.

L'acide stéarique est faiblement marqué à 6 heures (9.8% de la radioactivité du MGDG), son taux de radioactivité est réduit de moitié à 24 heures et 48 heures de marquage. Il en est de même pour l'acide oléique qui affiche 14% de radioactivité après 6 heures de marquage puis plus que 5.5% après 48 heures de dépôt du précurseur radioactif.

L'acide linoléique qui présente un maximum de radioactivité après 6 heures de marquage (39%) voit sa radioactivité décliner : le taux de 18 :2 radioactif est réduit de plus de la moitié après 48 heures de marquage. En revanche, dans l'acide linoléique la radioactivité qui est relativement élevée après 6 heures (22%) ne cesse d'augmenter, atteignant 66% après 48 heures de marquage.

La cinétique de marquage des acides gras insaturés à 18 carbones constitutifs du MGDG montre que dès les temps courts, l'acide oléique représente un taux de radioactivité non négligeable et que les acides linoléique et linoléique sont en proportions élevées. Par ailleurs l'évolution de ces acides gras radioactifs met en

évidence une relation claire de précurseur à produit entre le 18 :2 MGDG et le 18 :3 MGDG.

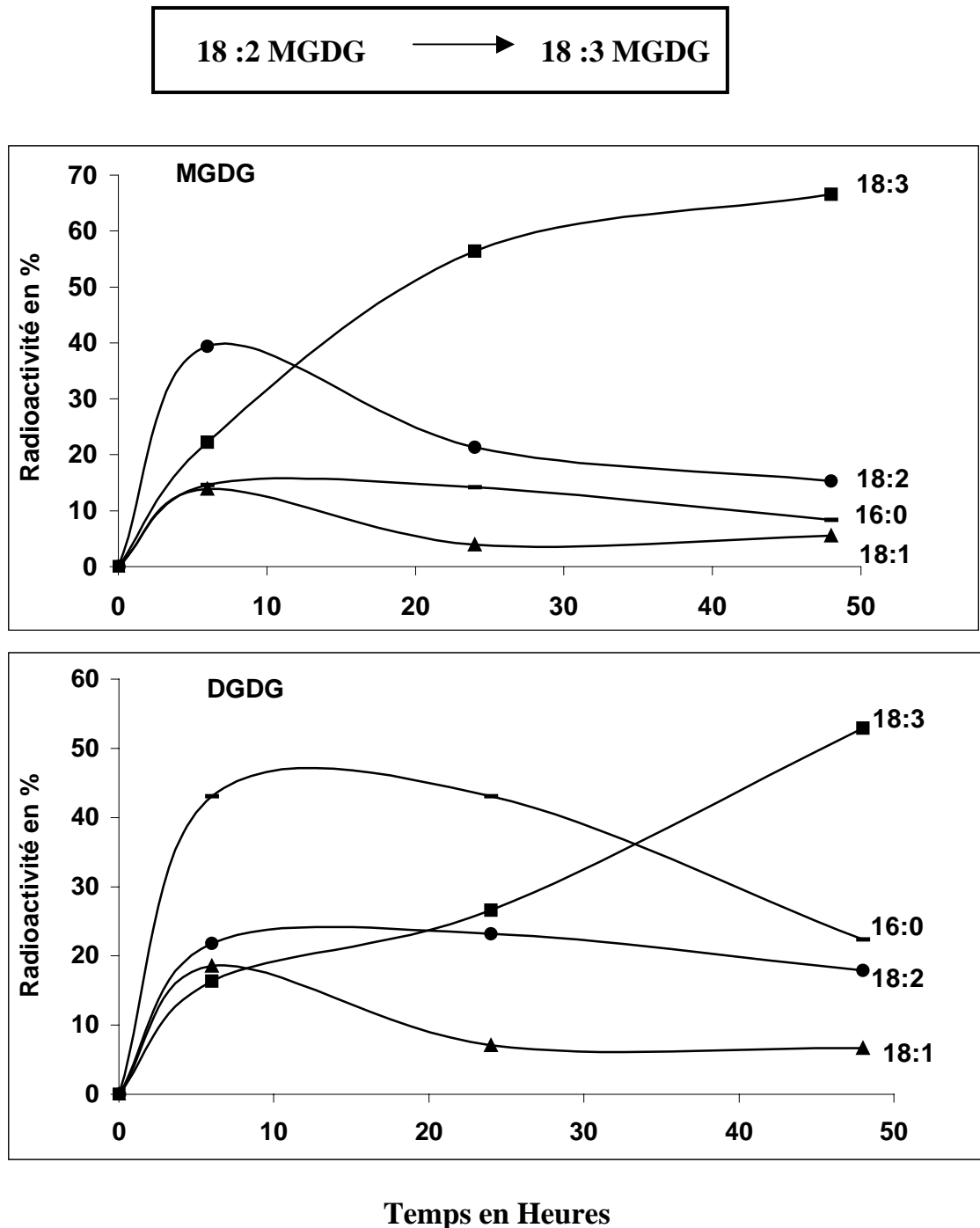


Figure 28 : Cinétique d'incorporation du [1-14C] acétate dans les acides gras du MGDG et du DGDG des feuilles de soja. (Radioactivité incorporée en %).

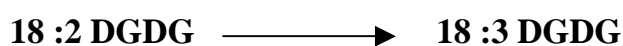
### 2.3.2.2 - DGDG

Dans le DGDG, l'acide palmitique est relativement bien marqué jusqu'à 24 heures de marquage (43%) par la suite la radioactivité dans cet acide gras est réduite presque de moitié.

L'acide oléique présente un maximum de radioactivité après 6 heures de marquage (18.6% de la radioactivité du DGDG), au delà sa radioactivité diminue et elle n'est plus que de 6.7% après 48 heures de marquage.

Le taux d'acide linoléique radioactif est relativement élevé jusqu'à 24 heures (23.2 %) mais par la suite sa radioactivité est réduite contrairement à l'acide linoléique dont la radioactivité qui est assez faible à 6 heures de marquage (16.4 %) est plus que triplée (53%) après 48 heures de marquage.

Cette cinétique de marquage des acides gras à 18 carbones ((Fig. 28) montre une relation de précurseur à produit entre l'acide linoléique et l'acide linoléique liés au DGDG et suggère que le DGDG à l'instar du MGDG est un substrat de la désaturation de l'acide linoléique en acide linoléique.



Le profil d'évolution de la radioactivité dans les acides gras à 18 carbones du DGDG ressemble à celui des acides gras du MGDG.

Le DGDG se forme à partir de la dismutation de deux molécules de MGDG (Joyard et *al.*, 1998). Cependant certaines molécules de MGDG à l'origine du DGDG seraient faiblement insaturées et le DGDG constituerait alors le substrat de la désaturation du C18 :2 en C18 :3.

### 2.3.2.3 - PG

Dans le PG (Fig. 29), l'acide palmitique acylé au PG affiche le plus fort taux de radioactivité pendant toute la durée du marquage (entre 41% et 47%). L'acide  $\Delta^3$  transhexadécénoïque qui est peu marqué après 6 heures (12% de radioactivité) voit sa radioactivité augmenter avec le temps de marquage atteignant 27.7% de radioactivité après 48 heures de marquage.

Concernant les acides gras à 18 carbones, la radioactivité dans les acides stéarique, oléique et linoléique est assez élevée après 6 heures de marquage, au delà elle diminue en fonction du temps de marquage. Dans l'acide linoléique par contre le taux de radioactivité qui est faible après 6 heures de marquage augmente en fonction du temps.

La cinétique de marquage des acides gras insaturés à 18 carbones montre une relation de précurseur à produit entre le C18 :2 et le C18 :3 liés au PG.

L'indice de désaturation de l'acide palmitique en acide  $\Delta^3$  transhexadécé-noïque peut être estimé par le rapport du taux de C16 :0 radioactif par rapport à celui du C16 :1t. L'indice de désaturation de l'oléate et du linoléate peut être estimé par les rapports des niveaux de radioactivité du C18 :2 et C18 :3 par rapport au C18 :1 et du C18 :3 par rapport au C18 :2 ( Williams et *al.*, 1992).

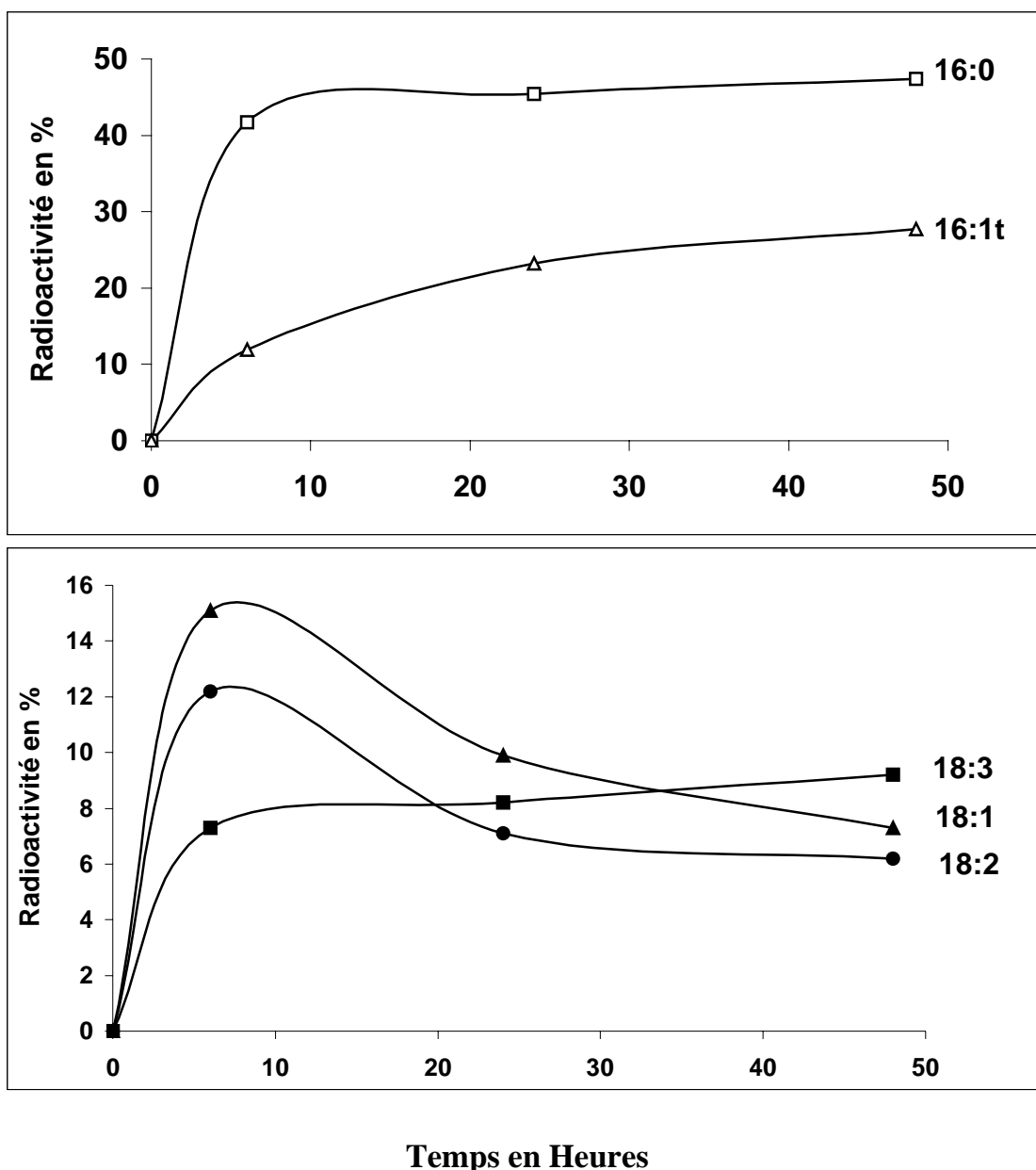


Figure 29 : Cinétique d'incorporation du [1-14C] acétate dans les acides gras du PG chloroplastique des feuilles de soja. (Radioactivité incorporée en %).

L'indice de désaturation du C16 :0 lié au PG (Tab. IX) augmente en fonction du temps de marquage ce qui traduit une activité de désaturation du C16 :0 lié au PG en C16 :1tr catalysée par la  $\Delta^3$  trans désaturase.

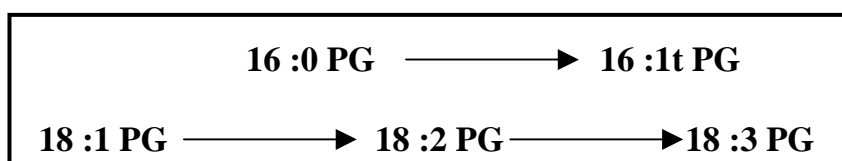
L'indice de désaturation des acides oléique et linoléique augmente en fonction du temps de marquage. Dans le PG, l'acide oléique semble désaturé en acide linoléique lui même désaturé en acide linoléique.

Tableau IX : Indice de désaturation des acides gras à 16 carbones et à 18 carbones dans le PG après marquage au [1-<sup>14</sup>C] acétate.

Indice de désaturation	6 h	24 h	48 h
<u>16 :1t</u> 16 :0	28.5	51.1	58.4
<u>18 :2+18 :3</u> 18 :1	1.29	1.54	2.15
<u>18 :3</u> 18 :2	0.59	1.15	1.39

Le PG chloroplastique présente du C18 en position sn-1 et du C16 en position sn-2. La présence de C18 :2 et de C18 :3 au sein de ce phospholipide signifie qu'il est le siège des désaturations permettant la formation de ces derniers.

Il est donc le substrat de deux types d'activités désaturases : une spécifique du PG et de la position sn-2 correspondant à la  $\Delta^3$  trans désaturase et l'autre correspondant aux n-6 et n-3 désaturases chloroplastiques permettant la synthèse du C18 :2 et du C18 :3 respectivement.



#### 2.3.2.4 - PC

Dans PC (Fig. 30A), l'acide palmitique présente un pourcentage de radioactivité soutenu pour tous les temps de marquage soit en moyenne 23%.

L'acide stéarique est faiblement radioactif pendant toute la durée du marquage.

Concernant les acides gras insaturés à 18 carbones, en début de cinétique de marquage (6 heures), l'acide oléique est l'acide gras qui contient le plus de radioactivité soit 44% ce qui signifie une rapide acylation de cet acide gras sur la molécule de PC. Par la suite le taux d'oléate radioactif décroît fortement atteignant 5.3% après 48 heures de marquage accusant ainsi une baisse de 88% de son taux maximum de radioactivité.

Le taux de radioactivité détecté dans l'acide linoléique est de 22 % dès 6 heures de marquage, il est plus que doublé entre 6 heures et 24 heures (en effet il passe à 51.6%) puis il diminue légèrement à 48 heures (49.7%) tout en étant l'acide gras le plus radioactif.

L'acide linoléique est très faiblement radioactif après 6 heures (4% de radioactivité seulement), il voit son taux de radioactivité tripler après 48 heures de marquage (il passe de 4% après 6 heures de marquage à 11.6 % après 48 heures) ; le niveau

d'acide linoléique dans la PC est cependant près de cinq fois plus faible que celui de l'acide linoléique.

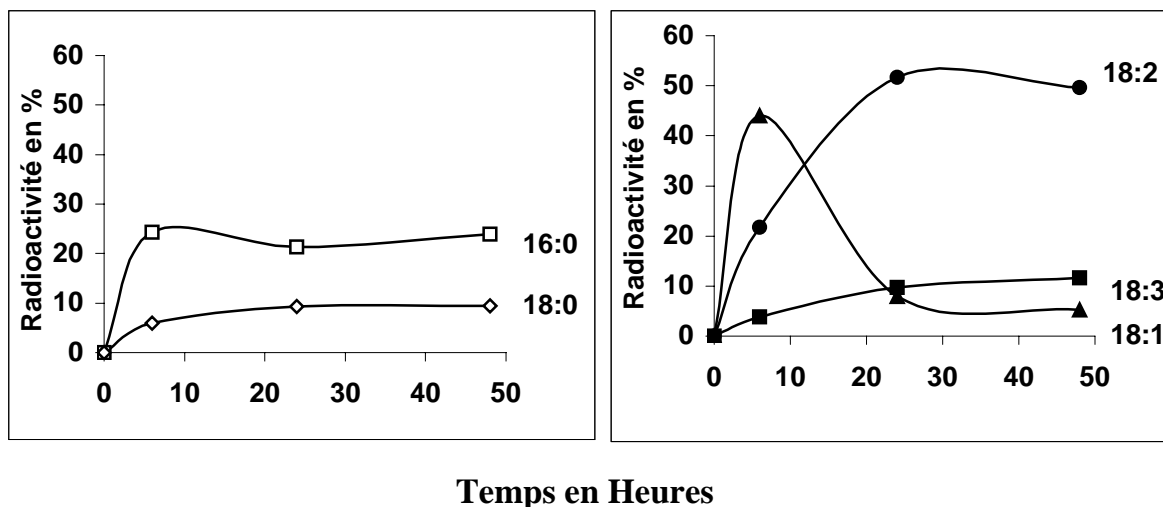
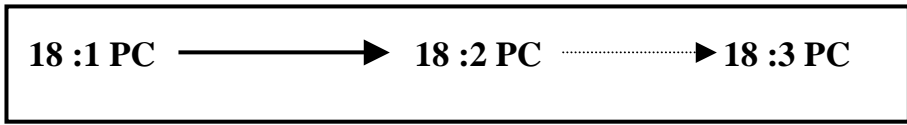


Figure 30A : Cinétique d'incorporation du [1-14C] acétate dans les acides gras de la PC. (Radioactivité incorporée en %).

Les résultats de la répartition de la radioactivité dans les acides gras insaturés liés à la PC en fonction du temps indiquent une désaturation séquentielle de l'acide oléique en acide linoléique lequel à son tour est désaturé en acide linoléique. Cependant la relation de précurseur à produit n'est vraiment nette qu'entre les acides oléique et linoléique .



### 2.3.2.5 - PE

Dans PE (Fig. 30B), l'acide palmitique est relativement bien marqué après 6 heures (21%) et le taux de radioactivité dans cet acide gras augmente lentement jusqu'à 48 heures atteignant 37.4%. Dans l'acide stéarique le taux de radioactivité ne varie pratiquement pas avec le temps (12% en moyenne). L'acide oléique présente le plus faible taux de radioactivité pour tous les temps de marquage (7%); l'acide linoléique est l'acide gras ayant incorporé le plus de radioactivité au niveau de PE ; en effet dès 6 heures de marquage, il affiche 42 % de radioactivité, son taux de radioactivité augmente légèrement à 24 heures puis décroît à 33.6% tout en étant l'acide gras le plus radioactif des acides gras à 18 carbones. Dans l'acide linoléique, le taux de radioactivité qui est de 16.6% après 6 heures de marquage diminue en fonction du temps.

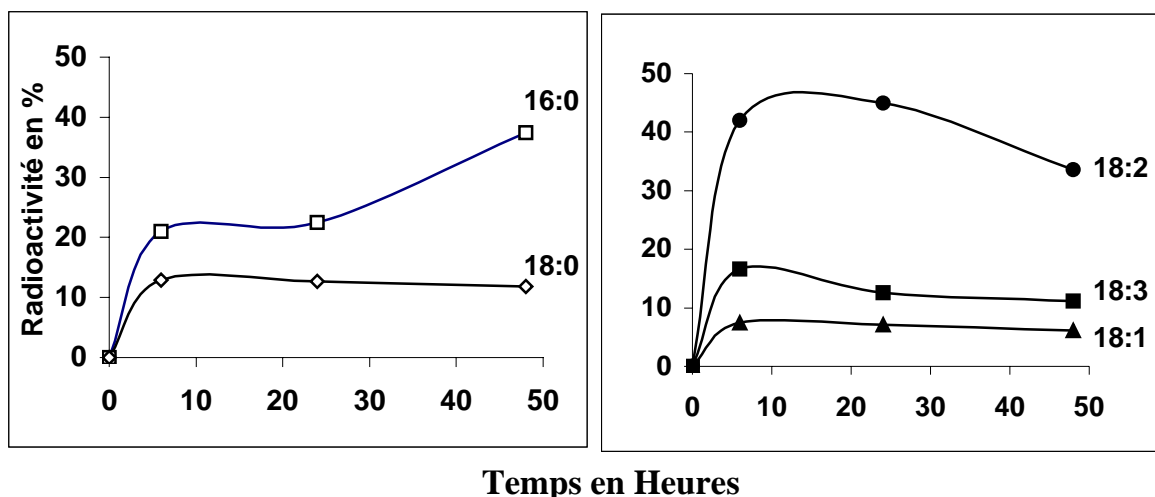


Figure 30B : Cinétique d'incorporation du [1-<sup>14</sup>C] acétate dans les acides gras de la PE. (Radioactivité incorporée en %).

Contrairement à la PC où la désaturation de l'acide oléique en acide linoléique est nette, dans la PE, il n'est constaté aucune relation de précurseurs à produits entre les acides gras à 18 carbones

### 2.3.3 - Indices de désaturation de l'oléate et du linoléate liés au MGDG et à PC

L'indice de désaturation de l'oléate et du linoléate liés au MGDG (Tab. X), montre que l'activité de désaturation de l'oléate augmente en fonction du temps : elle passe de 4.42 après 6 heures de marquage à 20.4 après 24 heures. Au delà elle décline légèrement ; celle de la linoléoyl désaturase augmente également en fonction du temps de marquage, elle passe de 0.56 à 6 heures de marquage à 4.37 après 48 heures de marquage.

Tableau X : Indice de désaturation lié au MGDG et à PC après marquage au [1-<sup>14</sup>C] acétate.

Indice de désaturation	MGDG			PC		
	6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h
Oléoyl désaturase : $\frac{18:2+18:3}{18:1}$	4.42	20.4	14.85	0.58	8.0	11.6
Linoléoyl désaturase : $\frac{18:3}{18:2}$	0.56	2.64	4.37	0.18	0.18	0.23

Dans PC (Tab. X), l'indice de désaturation de l'oléate augmente de 0.58 à 11.6 entre 6 heures et 24 heures de marquage, ce qui confirme que la PC est le substrat de l'oléate désaturase. L'indice de désaturation du linoléate est relativement faible

et stable pendant toute la durée du marquage (0.18, 0.18 et 0.23 respectivement après 6 heures, 24 heures et 48 heures de marquage) traduisant une très basse activité de désaturation du linoléate en linoléate liée à la PC.

Il se pourrait donc qu'une partie du linoléate lié à la PC provienne du compartiment chloroplastique tel que suggéré par Browse et *al.*, (1993) et Somerville et Browse, (1996). Dans ce cas le linoléate est désaturé en linoléate au niveau du MGDG qui affiche 22% d'acide linoléique radioactif dès 6 heures de marquage, contre seulement 3.9% au niveau de la PC ; le linoléate sortirait du chloroplaste et serait alors acylé à la PC.

Ces résultats montrent que les deux compartiments chloroplastique et extrachloroplastique sont les sièges des désaturations de l'oléate et du linoléate respectivement au niveau du MGDG et de la PC en tant que molécules support de ces désaturations avec cependant un très faible niveau de désaturation du linoléate au niveau de la PC ce qui nous laisse supposer qu'une partie du linoléate lié à la PC puisse provenir du chloroplaste.

De nombreux travaux dont ceux de Heinz et Roughan (1983), Norman et St John (1986) et Serghini-Caid et *al.*, (1988), stipulent que le MGDG eucaryote se forme à partir de DAG fortement insaturés provenant de la PC. Nos résultats montrent une activité de désaturation de l'oléate lié au MGDG ce qui signifie que les DAG à l'origine du MGDG ne sont pas toujours hautement insaturés.

#### **2.4- Biosynthèse des espèces moléculaires du MGDG et de PC.**

Les espèces moléculaires des MGDG et PC marqués *in vivo*, ont été séparées et analysées par HPLC. Après collecte, les espèces moléculaires de ces deux catégories lipidiques sont séparées sur plaque imprégnée de nitrate d'argent et leur radioactivité est déterminée par phosphorImager.

La PC constitue un carrefour pour la biosynthèse des lipides eucaryotes aussi bien dans les feuilles des plantes de type C18 :3 que des plantes de type C16 :3. En effet, il est généralement admis que la PC est formée à partir de DAG contenant du 18 :1 sur les deux positions sn-1 et sn-2 (ou du 16 :0 en position sn1) et que les désaturations *in situ* produisent de la PC 18 :2 et PC 18 :3 (Browse et Somerville, 1991). La PC ainsi formée est alors utilisée en tant que lipide structural des membranes cellulaires ou en tant que précurseur de DAG (Williams et *al.*, 1988) servant à la production des lipides chloroplastiques de type eucaryotes MGDG, DGDG et SQDG ; la lysoPC pourrait également représenter le lipide qui retourne vers l'enveloppe du chloroplaste tel que suggéré par Bessoule et *al.*, 1995 et Mongrand et *al.*, 2000).

##### **2.4.1 - Les espèces moléculaires du MGDG**

Dès 6 heures de marquage, l'espèce moléculaire la plus marquée (80% de radioactivité) est l'espèce la plus insaturée 18:3/18:3 , son pourcentage de radioactivité continue d'augmenter en fonction du temps.

En revanche l'espèce moléculaire précurseur de la 18:3/18:3 à savoir la 18:2/18:3 voit son pourcentage de radioactivité réduit de moitié après 24 heures et 48 heures de marquage, il en est de même pour la 18:2/18:2 dont le pourcentage de radioactivité tend à s'annuler après 48 heures de marquage (Fig. 31).

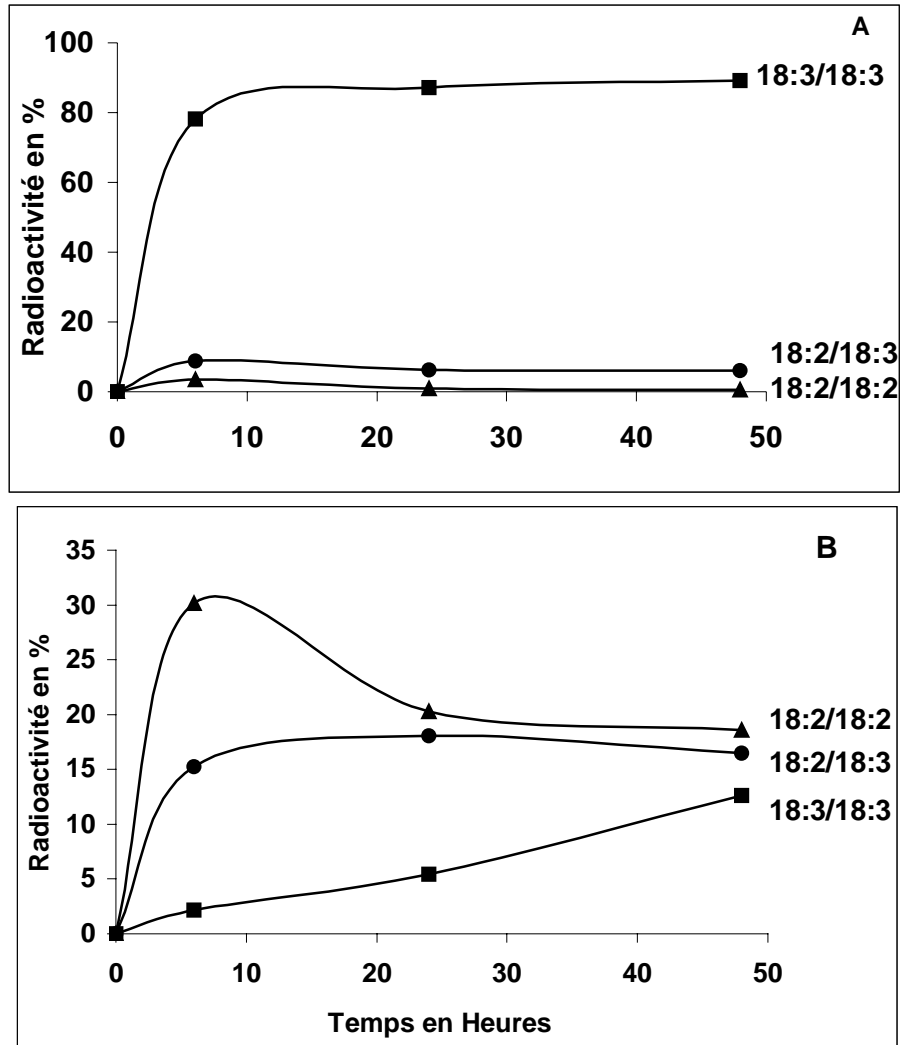


Figure 31 : Cinétique d'incorporation du [1-14C] acétate dans certaines espèces moléculaires du MGDG (A) et de la PC (B) des feuilles de soja. (Radioactivité incorporée en %).

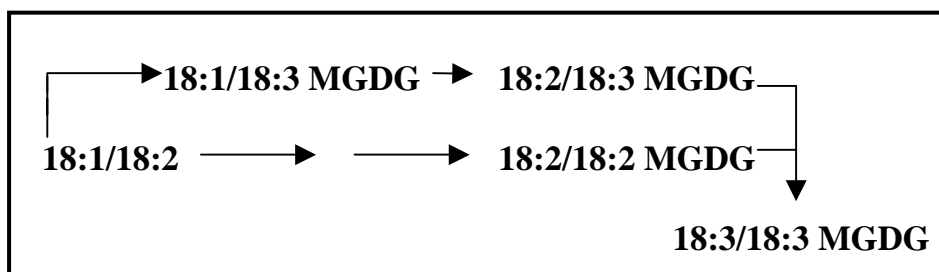
Les espèces 18:1/18:3 et 18 :1/18 :2 sont faiblement représentées après 6 heures de marquage (7.5% et 1.8% respectivement). Leur radioactivité est encore plus faible après 48 heures de marquage (3.4% et 0.7%) (Tab. XI).

Tableau XI : Distribution de la radioactivité (en %) dans les espèces moléculaires du MGDG

Espèces moléculaires	6 h	24 h	48 h
<b>18 :3/18 :3</b>	<b>78.2</b>	<b>87.1</b>	<b>89.2</b>
<b>18 :2/18 :3</b>	8.8	6.3	6.0
<b>18 :2/18 :2</b>	3.4	0.9	0.6
<b>18 :1/18 :3</b>	7.5	4.4	3.4
<b>18 :1/18 :2</b>	1.8	1.1	0.7

Le fort taux de radioactivité (78%) affiché dès les temps courts par l'espèce moléculaire la plus insaturée 18 :3/18 :3 et les faibles proportions des espèces moléculaires les moins insaturées suggèrent une désaturation précoce et rapide des acides oléique et linoléique liés au MGDG. Ces résultats confirment le fort indice de désaturation des oléoyl et linoléoyl désaturases observé au niveau du MGDG (Tab. X).

La cinétique de marquage au [1-<sup>14</sup>C] acétate des espèces moléculaires liées au MGDG, montre une certaine relation entre les espèces les moins insaturées et les espèces les plus insaturées, en effet alors que l'espèce moléculaire 18 :3/18 :3 qui est largement radioactive dès 6 heures de marquage continue d'augmenter toutes les autres espèces moléculaires diminuent.



Néanmoins, dans le MGDG, la désaturation des espèces moléculaires pentaènes 18 :2/18 :3 et des espèces tétraènes 18 :2/18 :2 en espèces moléculaires hexaènes 18 :3/18 :3 n'explique pas l'importance du MGDG 18 :3/18 :3. Ceci laisse supposer que les molécules de PC servant à la synthèse du MGDG très insaturé via les molécules de DAG peuvent être des tétraènes, des pentaènes tel que suggéré par Norman et St John, (1986,1987).

#### 2.4.2 - Les espèces moléculaires de PC

Dans la PC (Fig. 31), l'espèce moléculaire la moins marquée après 6 heures de dépôt du précurseur est la 18:3/18:3 (2.16%); la radioactivité de cette dernière augmente en fonction du temps: elle double après 24 heures de marquage et devient encore plus radioactive (6 fois plus ) après 48 heures de dépôt du précurseur radioactif.

La radioactivité de l'espèce moléculaire 18:2/18:3 qui est relativement plus marquée après 6 heures varie peu après 24 heures et 48 heures de marquage.

L'espèce moléculaire 18:2/18:2 représente l'espèce la plus marquée dans les temps courts ce qui indique que le substrat de désaturation est bien la PC et que la désaturation du 18 :1PC se fait rapidement (l'espèce moléculaire 18 :1/18 :1 ne se retrouve pas dans la PC après 6 heures et 24 heures de marquage et elle est très faiblement marquée après 48 heures). Au delà de 6 heures de marquage, la radioactivité de l'espèce moléculaire 18 :2/18 :2 diminue alors que celle des espèces 18 :2/18 :3 et 18 :3/18 :3 augmente.

L'évolution de la radioactivité dans ces espèces moléculaires, montre une désaturation progressive de l'espèce 18 :2/18 :2 en 18 :2/18 :3 puis en 18 :3/18 :3.

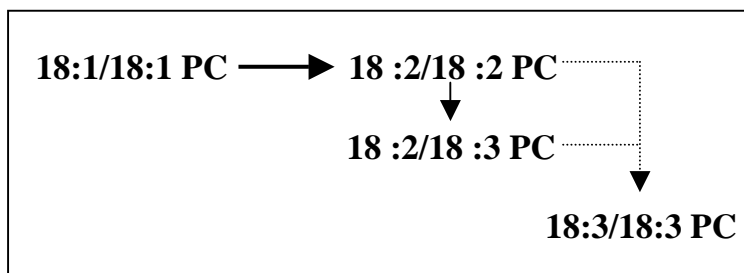
Néanmoins, l'augmentation de l'espèce moléculaire 18 :3/18 :3 PC pour les temps longs de marquage n'est que partiellement compensée par la diminution des espèces 18 :2/18 :3 et 18 :2/18 :2 PC ce qui laisse supposer qu'une partie des espèces moléculaires hexaènes de la PC pourrait avoir une origine chloroplastique

Deux groupes d'espèces moléculaires (Tab. XII) contiennent un mélange d'espèces moléculaires 18/18 et 16/18; le mélange insaturé 16:0/18:3 et 18:1/18:3 montre une légère variation de la radioactivité alors que le mélange plus saturé 16:0/18:2 et 18:1/18:2 devient de plus en plus marqué. L'espèce 16 :0/18 :1 dont le taux de radioactivité est de 16% après 6 heures de marquage, est réduite de moitié après 48 heures de marquage.

Tableau XII : Distribution de la radioactivité (en %) dans les espèces moléculaires de la PC.

<b>Espèces moléculaires</b>	<b>6 h</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>
<b>18 :3/18 :3</b>	2.16	5.45	12.63
<b>18 :2/18 :3</b>	15.24	18.08	16.48
<b>18 :2/18 :2</b>	30.17	20.27	18.56
<b>16 :0/18 :3</b> <b>18 :1/18 :3</b>	14.06	12.30	10.71
<b>16 :0/18 :2</b> <b>18 :1/18 :2</b>	21.19	30.41	29.00
<b>16 :0/18 :1</b>	16.11	13.47	8.71
<b>18 :1/18 :1</b>	-	-	2.94

La cinétique de marquage des espèces moléculaires 18/18 de la PC montre une certaine désaturation séquentielle de certaines espèces moléculaires de la PC.



### 3 - Acylation et désaturation *in vivo* du [1-<sup>14</sup>C] oléate dans les lipides foliaires du soja

Les résultats obtenus avec l'acétate radioactif comme précurseur montrent que la désaturation de l'oléate peut avoir lieu au niveau du MGDG et de PC. Nous avons donc utilisé du [1-<sup>14</sup>C] oléate (déposé sur les feuilles de plantules de soja en place sous forme de gouttelettes de solution de sel d'ammonium) ce qui permet de réduire le nombre de produits marqués (contrairement à l'acétate) et d'analyser des réactions spécifiques en particulier la désaturation de l'acide oléique en acide linoléique lequel se transforme en acide linoléique.

#### 3.1 – Incorporation du [1-<sup>14</sup>C] oléate dans les lipides foliaires

La cinétique d'incorporation du [1-<sup>14</sup>C] oléate dans les lipides totaux montre que le précurseur fourni est rapidement incorporé par les feuilles de plantules de soja. En effet dès 2 heures de marquage, 32% de la radioactivité est retrouvée dans les lipides totaux soit 6.48  $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{MVF}$ . Le pourcentage de radioactivité augmente pour atteindre après 24 heures près de 90% de la radioactivité déposée soit 18  $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{MVF}$  (Fig. 32).

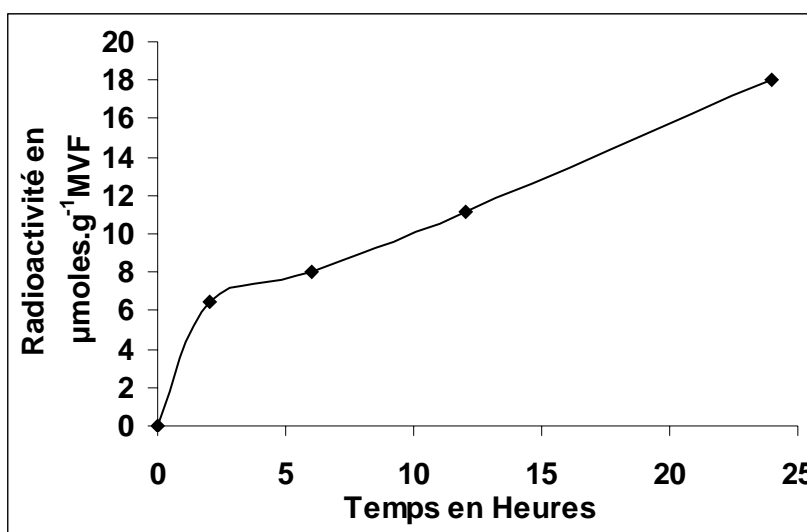


Figure 32 : Cinétique d'incorporation du [1-<sup>14</sup>C] oléate dans les lipides totaux des feuilles de soja. (Radioactivité en  $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{MVF}$ ).

Des deux précurseurs radioactifs fournis ( $[1-^{14}\text{C}]$  acétate et  $[1-^{14}\text{C}]$  oléate), l'oléate semble le mieux incorporé dans les lipides des feuilles de soja, l'acétate étant impliqué dans des voies métaboliques autres que celle des lipides telles les terpènes, le cycle de Krebs, .....

La cinétique de l'incorporation du  $[1-^{14}\text{C}]$  oléate dans les acides gras totaux des feuilles de soja (Tab. XIII), montre que 2 heures après le dépôt du précurseur, l'acide oléique est le principal acide gras marqué (89% de la radioactivité), par la suite, son taux de radioactivité diminue tandis qu'augmente progressivement celui des acides linoléique et linoléinique.

Tableau XIII : Cinétique d'incorporation du  $[1-^{14}\text{C}]$  oléate dans les acides gras des lipides foliaires de soja (radioactivité en % des acides gras totaux).

Acides Gras	2 h	6 h	12 h	24 h
<b>C18 :1</b>	89.5	65.6	54.0	53.9
<b>C18 :2</b>	8.9	25.0	31.3	25.8
<b>C18 :3</b>	1.6	9.4	14.7	20.3
<b>IDL</b>	112.1	143.8	160.7	166.4

Cette cinétique d'incorporation de l'oléate dans les acides gras insaturés de la feuille de soja confirme la désaturation séquentielle de l'acide oléique en acides linoléique et linoléinique ce qui est en accord avec l'augmentation de l'indice de doubles liaisons en fonction du temps de marquage (Tab. XIII).

### 3.2- Acylation du $[1-^{14}\text{C}]$ oléate dans les lipides polaires

Après 2 heures de marquage, 26% de la radioactivité est incorporée dans les lipides polaires. La radioactivité augmente de façon continue dans les lipides polaires atteignant 52% de la radioactivité des lipides totaux après 24 heures de marquage (Fig. 33).

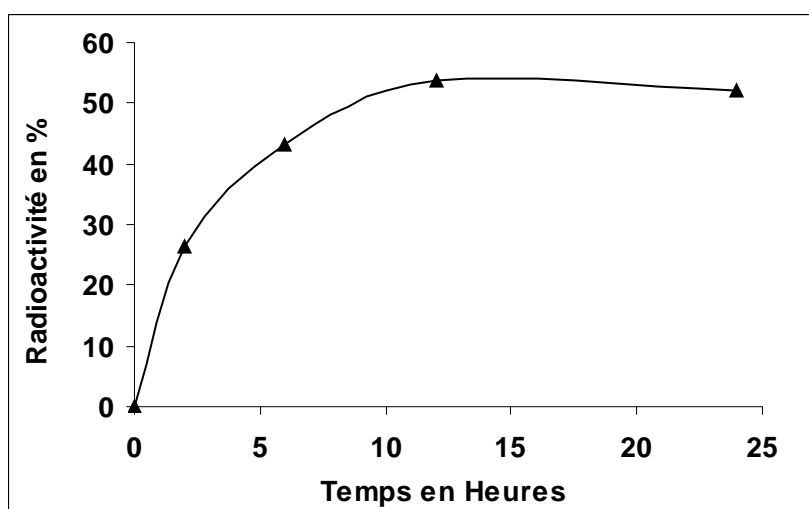


Figure 33 : Cinétique d'incorporation du  $[1-^{14}\text{C}]$  oléate dans les lipides polaires des feuilles de soja. (Radioactivité en %).

Le tableau XIV, montre la répartition de la radioactivité dans les différentes classes de lipides polaires des feuilles de soja.

Parmi les lipides polaires, après 2 heures de marquage, la PC est la catégorie lipidique qui montre le plus fort taux de radioactivité incorporée soit 80% de la radioactivité des lipides polaires ce qui montre que la PC est le substrat d'acylation de l'oléate. Par la suite, le pourcentage de radioactivité dans la PC décline pour ne représenter plus que la moitié (39%) après 24 heures de marquage.

Les PE et PI sont faiblement marqués pendant toute la durée du marquage.

Tableau XIV : Cinétique d'incorporation du [1-<sup>14</sup>C] oléate dans les lipides polaires des feuilles de soja. (Radioactivité en % des lipides polaires).

<b>Classes lipidiques</b>	<b>2 H</b>	<b>6 H</b>	<b>12 H</b>	<b>24 H</b>
<b>PC</b>	<b>80</b>	<b>64.6</b>	<b>48.6</b>	<b>38.8</b>
<b>PE</b>	0.3	0.6	0.8	1.0
<b>PI</b>	3.3	4.0	3.8	3.4
<b>MGDG</b>	<b>6.3</b>	<b>16.6</b>	<b>26.9</b>	<b>33.4</b>
<b>DGDG</b>	0.6	2.3	5.6	7.8
<b>PG</b>	<b>9.5</b>	<b>11.7</b>	<b>14.3</b>	<b>15.5</b>

Concernant les lipides chloroplastiques, les galactolipides affichent un faible pourcentage de radioactivité après 2 heures de marquage (6,3% pour le MGDG et 0,6% pour le DGDG). Leur pourcentage de radioactivité augmente en fonction du temps de marquage : il atteint 33% pour le MGDG et près de 8% pour le DGDG après 24 heures de marquage.

Dans le PG, 9.5% de radioactivité sont détectés dès 2 heures de marquage ; par la suite le taux de PG radioactif augmente doucement atteignant 15,5 % après 24 heures de marquage.

Le marquage du PG après fourniture du [1-<sup>14</sup>C] oléate signifie que ce précurseur pénètre dans le chloroplaste et qu'il est acylé à ce phospholipide.

La cinétique d'incorporation du [1-<sup>14</sup>C] oléate dans PC et MGDG (Fig. 34), montre une évolution similaire à celle observée avec le [1-<sup>14</sup>C] acétate (Fig. 27) .

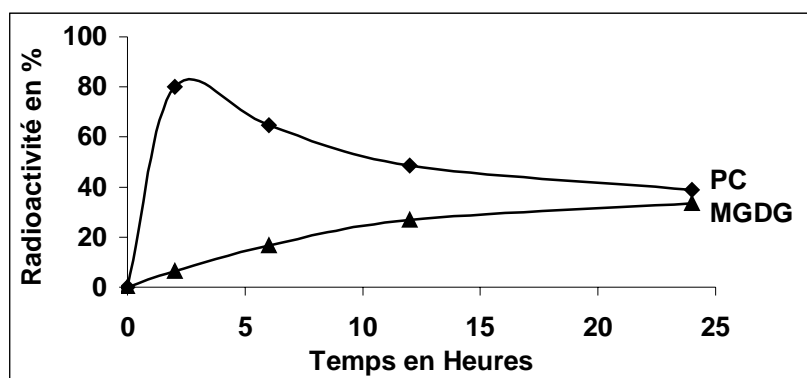


Figure 34 : Cinétique d'incorporation du [1-<sup>14</sup>C] oléate dans PC et MGDG des feuilles de soja. (Radioactivité incorporée en %).

La diminution du taux de radioactivité dans la PC concomitante à son augmentation dans les galactolipides (en particulier MGDG), suggère un transfert des acides gras acylés à la PC vers le chloroplaste pour la synthèse des galactolipides de type eucaryote.

### 3.3-Désaturation *in vivo* du [1-<sup>14</sup>C] oléate dans la PC

Le [1-<sup>14</sup>C] oléate fourni se retrouve dans les acides gras estérifiés aux lipides. Etudier la distribution de la radioactivité au cours du temps parmi les acides gras de PC et du MGDG va permettre de suivre au sein de chacune de ces classes lipidiques, la transformation de l'acide gras (oléate) en acide gras diinsaturé (linoléate) puis en acide gras triinsaturé (linoléate).

En début de cinétique de marquage (2 heures après le dépôt du précurseur radioactif), le plus fort pourcentage de radioactivité (64%) se retrouve dans le résidu C18:1 acylé à la PC; par la suite le pourcentage de radioactivité décline progressivement dans le résidu C18:1 alors que celui des résidus linoléoyl et linoléoyl estérifiés à la PC augmente en fonction du temps (Fig. 35).

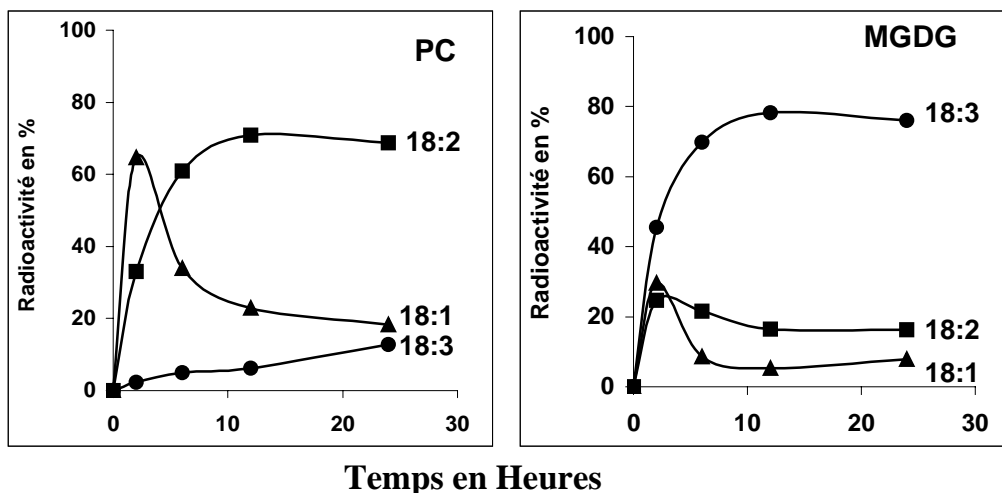
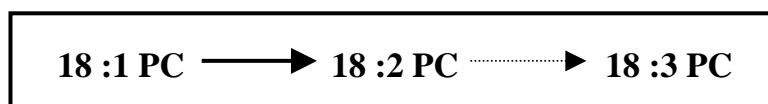


Figure 35 : Cinétique de désaturation du [1-<sup>14</sup>C] oléate dans les acides gras de PC et MGDG des feuilles de soja. (Radioactivité incorporée en %).

Ces résultats confirment que PC est non seulement le substrat d'acylation de l'oléate mais également le substrat de désaturation du résidu oléoyl en acide linoléique et probablement linoléique.



### 3 4 - Désaturation *in vivo* du [1-<sup>14</sup>C] oléate dans le MGDG

Nous constatons que le [1-<sup>14</sup>C] oléate fourni comme précurseur est rapidement incorporé et acylé au MGDG (Fig. 35).

En effet après 2 heures de marquage au [1-<sup>14</sup>C] oléate, trois acides gras radioactifs sont retrouvés au niveau du MGDG : il s'agit des acide oléique, linoléique et

linoléique qui affichent respectivement 29 %, 24 % et 45% de la radioactivité du MGDG. Au delà la radioactivité décline dans les acides oléique et linoléique alors qu'elle s'accumule dans l'acide linoléique, en effet ce dernier présente 76% de radioactivité après 24 heures de marquage.

Nous constatons donc que le [1-<sup>14</sup>C] oléate pénètre dans le chloroplaste où il est acylé aux molécules de MGDG et PG.

Cet acide oléique est rapidement désaturé ce qui expliquerait le fort pourcentage de C18 :3 MGDG observé (45% dès 2 heures de marquage).

Néanmoins une partie de l'oléate acylé au MGDG proviendrait des molécules de PC (cette affirmation s'appuie sur la courbe de cinétique d'incorporation du [1-<sup>14</sup>C] oléate dans la PC et le MGDG) fait que nous avons déjà signalé avec l'acétate comme précurseur ; ceci signifie par ailleurs que les molécules de DAG dérivant de la PC et servant à la synthèse des molécules de MGDG ne sont pas toujours très insaturées.

Les molécules de PC et de MGDG sont donc des molécules substrat de la désaturation de l'oléate. Ce résultat est corroboré par le calcul des indices de désaturation dans la PC et le MGDG (Tab. XV) qui montre que l'activité de désaturation de l'oléate se déroule aussi bien dans le compartiment extrachloroplastique au niveau de la PC que dans le compartiment chloroplastique avec le MGDG comme substrat de désaturation. Cette activité de désaturation augmente en fonction du temps de marquage.

L'activité de désaturation du linoléate est très faible au niveau de la PC pour tous les temps de marquage, alors qu'elle est nettement visible au niveau du MGDG dès 2 heures de marquage (1.84) et ne cesse d'augmenter pendant toute la durée de l'expérience atteignant 4.7 après 24 heures de marquage.

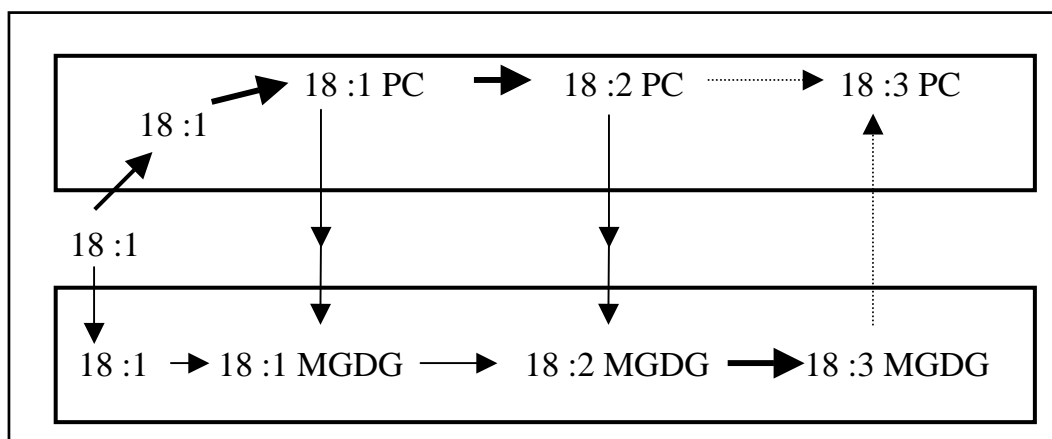
Tableau XV : Indices de désaturation de l'oléate et du linoléate dans les molécules de PC et de MGDG après incorporation du [1-<sup>14</sup>C] oléate.

	PC				MGDG			
	2 h	6 h	12 h	24 h	2 h	6 h	12 h	24 h
<u>18 :2+18 :3</u> 18 :1	0.54	1.94	3.36	4.45	2.37	10.62	17.86	11.82
<u>18 :3</u> 18 :2	0.07	0.08	0.08	0.18	1.84	3.25	4.73	4.69

Ces résultats confirment ceux obtenus avec le [1-<sup>14</sup>C] acétate comme précurseur et montrent d'une part que la PC et le MGDG constituent des substrats de la désaturation de l'oléate d'autre part que la formation du 18 :3 débute très rapidement dans le MGDG (45% de linoléate radioactif dès 2 heures de marquage).

L'activité de désaturation du linoléate dans le MGDG augmente en fonction du temps alors qu'elle est très faible dans la PC (les pourcentages de C18 :3

sont toujours nettement plus importants dans le MGDG que dans la PC) ce qui suggère que le linoléate retrouvé au niveau de la PC proviendrait pour une grande part du compartiment chloroplastique.



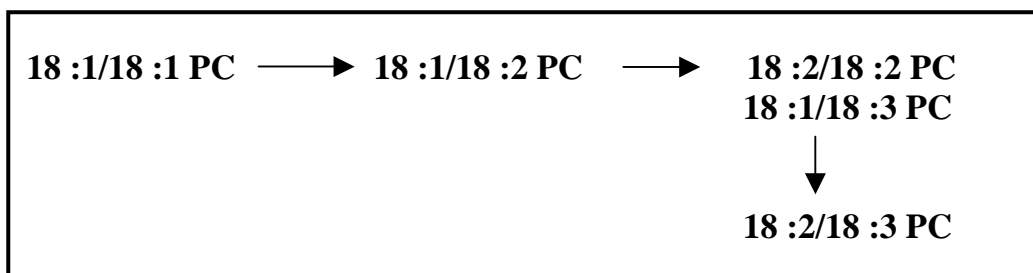
### 3.5 - Incorporation du [1-<sup>14</sup>C] oléate dans les espèces moléculaires de PC et MGDG

#### 3.5.1 – Espèces moléculaires de PC

Six espèces moléculaires radioactives sont présentes après 24 heures de marquage au [1-<sup>14</sup>C] oléate au niveau de la PC (Tab. XVI) ; l'espèce moléculaire la plus radioactive est représentée par l'espèce moléculaire 18:2/18:3 qui a accumulé près de 51% de la radioactivité totale de la PC, elle est suivie des espèces moléculaires 18:1/18:3 et 18:1/18:2 qui ont incorporé respectivement 18 % et 15 % de radioactivité. L'espèce moléculaire la plus insaturée à savoir la 18:3/18:3 ne présente que 3% de radioactivité, il en est de même des espèces moléculaires 18:2/18:2 et 18:1/18:1 qui sont relativement faiblement marquées (4.3% et 8% respectivement). La faible proportion de l'espèce moléculaire 18:1/18:1 PC indique que la majorité du C18 :1 radioactif a été désaturé au niveau de la PC.

Tableau XVI : Incorporation du [1-<sup>14</sup>C] oléate dans les espèces moléculaires de la PC et du MGDG après 24 heures de marquage. (radioactivité en %).

Espèces Moléculaires	PC	MGDG
<b>18 :3/18 :3</b>	3.1	<b>76.8</b>
<b>18 :2/18 :3</b>	<b>50.8</b>	14.7
<b>18 :1/18 :3</b>	18.2	4.4
<b>18 :2/18 :2</b>	4.3	3.8
<b>18 :1/18 :2</b>	15.1	-
<b>18 :1/18 :1</b>	8.0	-



### 3.5.2 – Espèces moléculaires du MGDG

Dans le MGDG (Tab. XVI), quatre espèces moléculaires ont été mises en évidence après 24 heures de dépôt du précurseur radioactif. L'espèce moléculaire la plus insaturée 18:3/18:3 est prédominante avec 77% de radioactivité, elle est suivie de la 18:2/18:3 avec 15% de radioactivité; Les espèces 18:1/18:3 et 18:2/18:2 ne sont que faiblement radioactives (4.4 % et 3.8% respectivement). Il est à constater l'absence des espèces plus saturées 18:1/18:2 et 18:1/18:1 du fait probablement de leur désaturation rapide.

Nous constatons que aussi bien pour la PC que pour le MGDG, les espèces les plus radioactives 18 :2/18 :3 pour la PC et 18 :3/18 :3 pour le MGDG correspondent aux espèces les plus importantes en masse.

#### Discussion :

Dans les feuilles de soja, nous retrouvons une composition lipidique typique des tissus verts caractérisée par l'abondance des lipides chloroplastiques (MGDG, DGDG et PG) qui représentent respectivement 32%, 20% et 7% des lipides foliaires.

Les phospholipides extrachloroplastiques représentent 21 % des lipides totaux et la PC est la plus abondante des phospholipides (près de 15% des lipides foliaires).

La composition globale en acides gras de la feuille de soja est caractérisée par la présence d'un fort taux d'acide linoléique (57 %), celui-ci étant majoritairement concentré dans le MGDG où il représente 91% des acides gras de ce lipide.

Cette composition en acides gras est également caractérisée par l'absence d'acide hexadécatriénoïque ou C16 :3 du fait que le soja fait partie du groupe des plantes de type C18 :3. En effet l'espèce moléculaire la plus représentée dans le MGDG est l'espèce moléculaire 18 :3/18 :3 (91.8 %). Ce résultat est en accord avec ceux rapportés par de nombreux chercheurs dont ceux de Serghini-Caïd *et al.*, (1988) et ceux de Monteiro De Paula *et al.*, (1990) sur les feuilles de plantes de la même famille (Fabacées).

Le PG est le seul lipide à présenter des espèces moléculaires de type procaryote. Ce dernier contient en position sn-2 du glycérol des acides gras à 16 carbones correspondant soit à l'acide palmitique (C16 :0) ou à l'acide  $\Delta^3$  trans hexadécénoïque (C16 :1t). Le PG 16 :1t qui est concentré dans les lamelles des thylakoides joue un rôle important dans l'organisation et le fonctionnement de l'antenne collectrice du PSII (Dubertret *et al.*, 1994 ; El Maani *et al.*, 1998 ; Trémolières et Siegenthaler, 1998).

La biosynthèse *in vivo* des lipides dans les feuilles de soja a été suivie en fournissant du [1-<sup>14</sup>C] acétate sous forme de microgouttes déposées sur les feuilles de plantules en place.

Ce précurseur radioactif est rapidement incorporé dans les lipides des feuilles de soja principalement dans la PC. De nombreux travaux effectués *in vivo* sur des feuilles de pois (Serghini- Caïd et al., 1988), d'olivier (Zarrouk et al., 1990) et de colza (Aid et al., 1998) ont montré une incorporation importante de ce précurseur radioactif au niveau de la PC.

Pour les temps de marquage longs, il est noté une diminution de la radioactivité dans la PC qui coïncide avec une augmentation de celle du MGDG ce qui suggère un transfert de la radioactivité du compartiment extrachloroplastique (principalement la PC) vers le compartiment chloroplastique pour la synthèse des galactolipides qui chez le soja ont une structure de type eucaryotique. Ceci appuie l'hypothèse selon laquelle la PC intervient dans le métabolisme des galactolipides (Roughan et Slack, 1984 ; Norman et St John, 1986, 1987 ; Browse et al., 1991).

Ohnishi et Yamada (1980) ont montré par des expériences de double marquage avec du [1-<sup>14</sup>C] acétate et du [2-<sup>3</sup>H] glycérol sur des feuilles respectivement de maïs et d'avoine que le flux métabolique entre la PC et les galactolipides consiste en un transfert de DAG.

Bessoule et al., (1995) et Mongrand et al., (2000) ont proposé de leur côté la lysoPC comme navette entre le réticulum endoplasmique et l'enveloppe des chloroplastes.

La comparaison des cinétiques de marquage des acides gras et des espèces moléculaires de la PC et du MGDG montre que le MGDG est toujours plus insaturé que la PC ; en effet dès les temps courts de marquage (6 heures), les acides linoléique et linoléique de même que les espèces moléculaires contenant ces acides gras sont moins marqués dans la PC que dans le MGDG.

Après 6 heures de marquage au [1-<sup>14</sup>C] acétate, le MGDG contient 39% de C18 :2 radioactif contre 22% dans la PC et 22.3% de C18 :3 radioactif contre 3.9% seulement dans la PC.

Par ailleurs, la comparaison des indices de désaturation de l'oléoyl désaturase et de la linoléoyl désaturase dans le MGDG et la PC montre que les niveaux de désaturation sont plus élevés dans le MGDG. Ces résultats suggèrent que dans les feuilles de soja, la PC et le MGDG représentent deux molécules support des désaturations successives menant à la synthèse des acides gras triinsaturés.

Dans le PG, l'acide palmitique est désaturé en acide  $\Delta^3$  trans hexadécénoïque par la PG  $\Delta^3$  trans désaturase spécifique du PG. Par ailleurs ce lipide de même que le DGDG semblent représenter des substrats de désaturation des acides gras à 18 carbones.

L'étude de la désaturation *in vivo* est réalisée en fournissant du [1-<sup>14</sup>C] oléate sous forme de sel d'ammonium aux feuilles de plantules de soja en place.

Dès 2 heures de marquage, la PC est la catégorie lipidique la plus radioactive (80% de la radioactivité des lipides polaires) ce qui montre que la PC est le substrat d'acylation de l'oléate ; ce résultat est en accord avec de nombreux travaux conduits sur les feuilles de diverses plantes (Serghini Caid et al., 1986, Zerrouk et al., 1990 Aid et al., 1998). Par la suite la radioactivité dans la PC décline alors qu'elle

augmente dans le MGDG (résultat analogue à celui observé avec l'acétate comme précurseur) ce qui suggère un transfert de la radioactivité de la PC vers le MGDG.

De nombreux auteurs associent la désaturation de l'acide oléique en acide linoléique à la PC au niveau du réticulum endoplasmique (Roughan et Slack, 1982 ; Murphy et *al.*, 1985 ; Demandre et *al.*, 1986) puis un transfert de l'acide linoléique de la PC vers le MGDG via des DAG est envisagé et le 18 :2 MGDG formé servirait de substrat de désaturation du 18 :2 MGDG en 18 :3 MGDG (Norman et St John, 1986 ; Williams et Khan, 1996 ; Maréchal et *al.*, 1997).

Nos résultats montrent que l'oléate radioactif pénètre dans le compartiment chloroplastique ; en effet dès 2 heures de marquage, il est retrouvé au niveau du PG mais également au niveau du MGDG qui par ailleurs montre des indices de désaturation de l'oléate assez élevés traduisant une incorporation et une désaturation précoce de ce résidu au niveau des molécules de MGDG.

Par conséquent dans la feuille de soja, la PC ne contribue que partiellement à la synthèse du MGDG (résultat montré par l'évolution de la radioactivité qui diminue dans la PC alors qu'elle augmente dans le MGDG). Une partie du MGDG se formerait par acylation directe de l'oléate sur le MGDG.

Les molécules de PC participant à la synthèse du MGDG ne sont donc pas toujours très insaturées contrairement à ce qui est généralement avancé. Cependant, il n'est pas totalement exclu que le 18:3/18 :3 MGDG provienne de molécules de DAG dérivant d'espèces moléculaires de PC insaturées (18 :2/18 :2) comme l'ont montré Serguini-Caid et *al.*, (1988) dans les feuilles de pois.

L'acide oléique est donc incorporé au niveau de la PC, celle-ci fournirait le 18 :1 DAG au chloroplaste où il est galactosylé pour former le MGDG qui sert alors de substrat à la désaturation du 18 :1 en 18 :2 puis en 18 :3.

Il est probable aussi que les 18 :1 et 18 :2 retrouvés au niveau du MGDG proviennent de la LysoPC tel que suggéré par Bessoule et *al.*, (1995) et Mongrand et *al.*, (2000). La LysoPC se formerait grâce à une phospholipase C ; au niveau de la membrane externe du chloroplaste la LysoPC serait transformée par une LysoPC acylCoA transférase en PC qui donnerait alors les molécules de DAG.

La comparaison des indices de désaturation du linoléate dans les molécules de PC et de MGDG montre que dans la PC ces derniers sont toujours nettement plus faibles que ceux du MGDG aussi bien après incorporation du [1-<sup>14</sup>C] acétate que du [1-<sup>14</sup>C] oléate. Ces résultats suggèrent un transfert d'une partie du linoléate synthétisé dans le compartiment chloroplastique au niveau des molécules de MGDG vers les molécules de PC dans le compartiment extrachloroplastique. Ce résultat appuie donc l'idée avancée par Ohlrogge et *al.*, (1991) et Browse et *al.*, (1993) quant à l'échange de résidus linoléoyls entre le chloroplaste et le réticulum endoplasmique.

En conclusion de nos observations, nous constatons que chez le soja, comme chez toutes les plantes étudiées, la désaturation du 18 :1 en 18 :2 a lieu principalement dans la PC ; la désaturation du linoléate en linoléate au niveau de la PC est toutefois relativement faible. Cette séquence de désaturation ne s'effectuerait pas uniquement dans le compartiment extrachloroplastique mais également dans le chloroplaste au niveau du MGDG qui semble être le substrat de l'oléate désaturase et principalement de la linoléate désaturase.

La figure 36, résume les voies d'acylation et de désaturation du [1-<sup>14</sup>C] oléate et les échanges pouvant s'effectuer entre le chloroplaste et le compartiment extrachloroplastique dans les feuilles de soja.

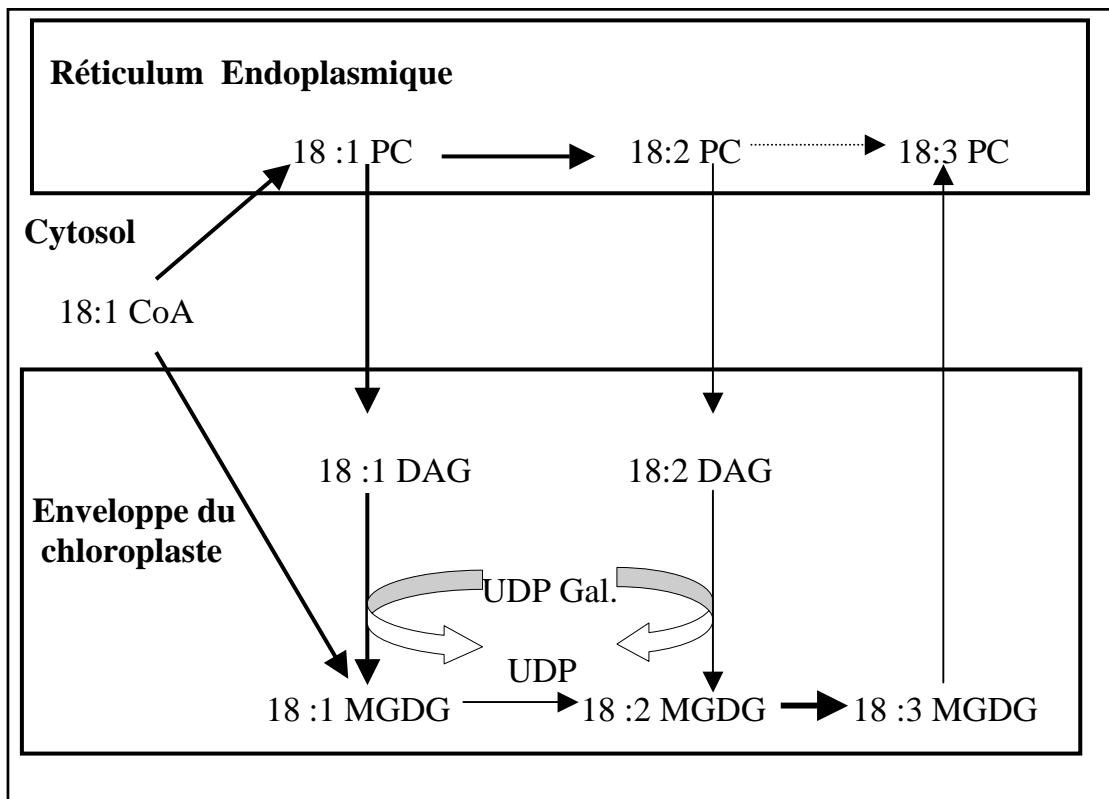


Figure 36 : Voies d'utilisation du [1-<sup>14</sup>C] oléate dans les compartiments chloroplastique et extrachloroplastique des feuilles de plantules de soja.

# Effet du norflurazon sur les plantules de soja : morphologie, pigments et lipides foliaires

Le norflurazon, herbicide de pré-semis (ou de pré-émergence) a été appliqué avant la mise en terre des graines de soja. L'extraction des pigments foliaires et des lipides ainsi que leurs analyses ont été effectuées au stade premières et parfois deuxièmes feuilles.

De nombreuses concentrations herbicides ont été testées, trois sont retenues suivant l'effet morphologique obtenu (effet sur la pigmentation des plantules et sur leur croissance en longueur) :  $10^{-6}$ M : effet insignifiant,  $10^{-5}$ M : effet moyen et  $10^{-4}$ M : effet important (blanchiment des plantules). Dans un premier temps nous avons utilisé les trois concentrations de norflurazon. Par la suite nous n'avons maintenu que la dose  $10^{-4}$ M entraînant le photobleaching et un effet assez net sur le métabolisme lipidique.

### 1- Effet sur la morphologie des plantules de soja

Aux faibles concentrations  $10^{-6}$  M et  $10^{-5}$  M, le norflurazon ne semble pas avoir d'effets morphologiques apparents sur les plantules de soja ; ces dernières sont de taille sensiblement égale à celle des plantules témoins et les feuilles formées après le traitement sont vertes. Les plantules évoluent pratiquement normalement et forment de nouvelles feuilles.

A la dose  $10^{-4}$  M, plusieurs phénotypes se manifestent (Photo 1) : des plantules vertes, des plantules avec des feuilles panachées mi-vertes mi-blanches et des plantules entièrement dépigmentées ou albinos. Le blanchiment débute à la base de la feuille puis gagne toute la surface foliaire; ce phénomène est qualifié de « photobleaching ».

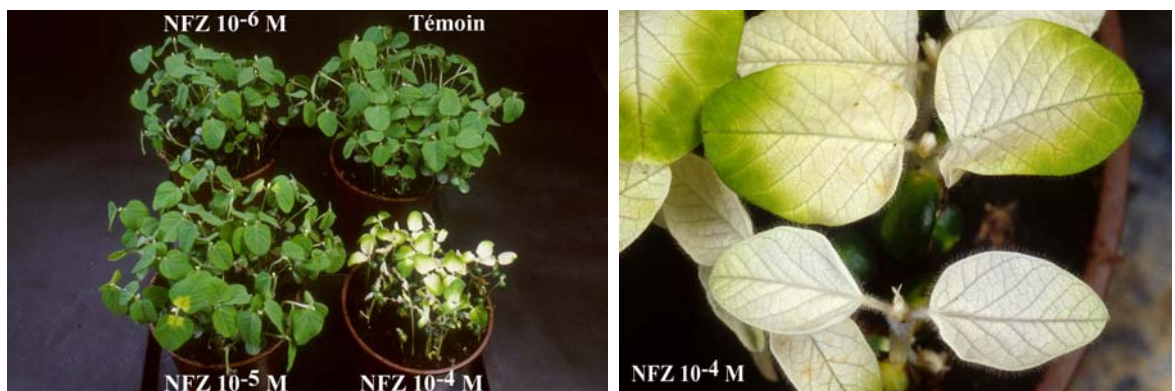


Photo : Plantules de soja témoins et traitées au norflurazon.

De nombreux auteurs qualifient le norflurazon de photobleaching herbicide provoquant le blanchiment des plantes à la lumière. Des expériences que nous avons réalisées à l'obscurité ont montré le même effet sur les plantules (blanchissement) ce qui nous permet d'affirmer qu'il s'agit d'un bleaching herbicide agissant aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité.

Les plantules à feuilles panachées et celles à feuilles blanchâtres présentent également une réduction de la taille comparativement aux plantules témoins.

Les plantules dont la feuille I n'est que partiellement dépigmentée, bien que présentant un ralentissement dans leur croissance, évoluent et forment leurs

deuxièmes feuilles qui sont totalement blanchâtres. Les troisièmes feuilles ne sont que très rarement formées.

Les plantules dont la feuille I est entièrement dépigmentée dépérissent souvent sans atteindre le stade deuxièmes feuilles.

A la dose  $10^{-4}$  M, le norflurazon appliqué en pré-semis engendre donc des symptômes apparents sur les plantules de soja. Les plantes affectées comparées aux plantules témoins sont de taille réduite et albinos.

Un grand nombre d'herbicides appliqués à des doses convenables sur des plantules entraînent un ralentissement de la croissance et du développement par rapport au lot témoin cultivé dans les mêmes conditions. Les plantes exposées à différentes doses forment un moins grand nombre de feuilles, celles ci sont généralement plus petites et souvent dépigmentées (blanchâtres); les tiges et les racines sont également plus petites.

La réduction de la taille est un phénomène courant observé chez de nombreuses plantes traitées par les herbicides ; dans le cas du traitement par le norflurazon elle est due à une réduction de la photosynthèse engendrant une réduction voire une absence de photosynthétats découlant du manque de tissus verts.

## **2- Effet sur la teneur en pigments foliaires**

Le blanchiment observé au niveau des feuilles traduit une déficience en pigments foliaires (caroténoïdes et chlorophylles).

### **2.1 - Au niveau de la feuille I**

Les figures 37A et B, montrent les variations de la teneur en pigments engendrées par le norflurazon. Les plantules de soja traitées par les doses de norflurazon  $10^{-6}$  M et  $10^{-5}$  M sont vertes; cependant le dosage des pigments foliaires caroténoïdes et chlorophylles, révèle une réduction de ces derniers : les caroténoïdes diminuent de 7% pour la dose  $10^{-6}$  M et 23% pour la dose  $10^{-5}$  M ; les chlorophylles chutent de 16% et 27% respectivement pour les doses  $10^{-6}$  M et  $10^{-5}$  M comparativement au témoin.

Sous l'effet de la dose  $10^{-4}$  M, les feuilles sont plus ou moins blanchâtres, résultat d'une chute sévère des caroténoïdes et des chlorophylles qui sont respectivement réduits de 96% et 94% par rapport au témoin.

### **2.2- Au niveau de la feuille II**

Les feuilles II formées après le traitement sont vertes pour les doses  $10^{-6}$  M et  $10^{-5}$  M de norflurazon et blanchâtres pour la dose  $10^{-4}$  M ; ces observations sont similaires à celles notées au niveau des feuilles I ; il en est de même pour les teneurs en pigments foliaires. En effet pour les doses  $10^{-6}$  M et  $10^{-5}$  M, les teneurs en chlorophylles diminuent de 22% et 33%, les caroténoïdes sont réduits de 12% et 27%. Pour la dose  $10^{-4}$  M, les chlorophylles chutent de 88% et les caroténoïdes de 92% comparativement aux feuilles témoins (Fig.37A et B).

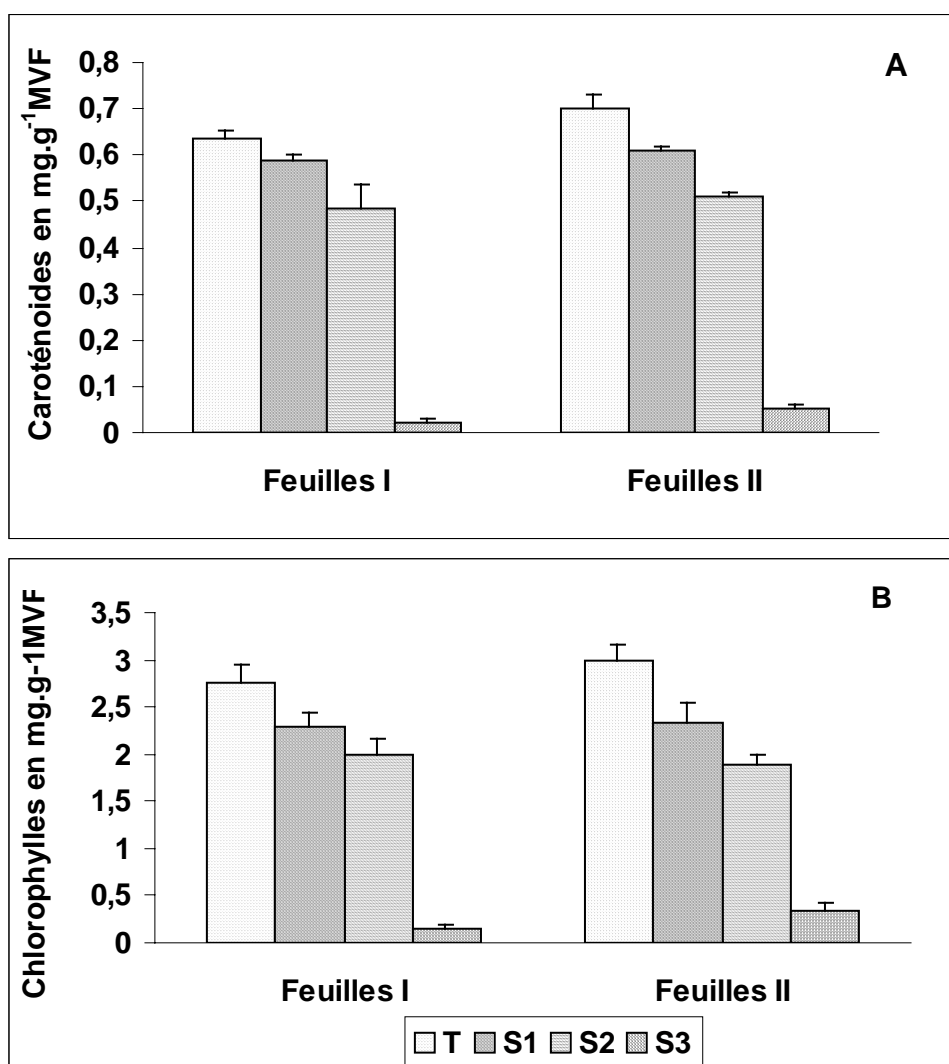


Figure 37: Effet du norflurazon sur la teneur en caroténoïdes (A) et en chlorophylles totales (B), dans les feuilles de soja. (T= Témoin, S1= 10<sup>-6</sup>M, S2= 10<sup>-5</sup>M, S3= 10<sup>-4</sup>M).

Le rapport chlorophylles/caroténoïdes varie très peu pour les doses 10<sup>-6</sup> M et 10<sup>-5</sup> M et augmente pour la dose 10<sup>-4</sup> M aussi bien dans les feuilles I que les feuilles II (Tab. XVII).

Tableau XVII : rapport Chlorophylles/caroténoïdes dans les feuilles des plantules témoins et les feuilles des plantules soumises à différentes doses de norflurazon.

	Feuilles I	Feuilles II
<b>Témoin</b>	4.3	5.0
<b>NFZ 10<sup>-6</sup> M</b>	3.9	4.2
<b>NFZ 10<sup>-5</sup> M</b>	4.1	3.6
<b>NFZ 10<sup>-4</sup> M</b>	7.0	7.8

La chute des pigments occasionnée par le norflurazon est due à l'inhibition de la biosynthèse des caroténoïdes suite au blocage de la phytoène désaturase (Sandmann et Albrecht, 1990).

La diminution de la teneur en chlorophylles est un processus secondaire: l'interruption de la biosynthèse des caroténoïdes engendre un stress oxydatif sévère par la formation de molécules réactives d'oxygène (oxygène singulet  $^1\text{O}_2^*$ ) au niveau de l'antenne collectrice d'énergie (Thomas et *al.*, 1998). Il s'ensuit un manque de protection des chlorophylles qui sont alors détruites par photooxydation (Wilkinson, 1983).

Les complexes protéines/chlorophylles du PSII et les protéines D<sub>1</sub> et D<sub>2</sub> sont alors décomposées ou réduites par manque de stabilisation par les caroténoïdes et les chlorophylles (Markgraf et Oelmüller, 1991 ; Yurina et Kloppstech, 2001).

Le norflurazon est un herbicide de pré-émergence : il n'agit que sur les tissus chlorophylliens en formation. En effet lorsque les tissus foliaires sont développés le norflurazon n'a pas d'effet : des plantules qui ont reçu l'herbicide à la dose  $10^{-4}$  M après la formation de leurs premières feuilles ou de leurs deuxièmes feuilles demeurent vertes et ne présentent pas de variations significatives de leurs pigments ; cependant les feuilles qui se développent ultérieurement sont blanchâtres.

Le norflurazon affecte le contenu cellulaire en pigments mais également la structure cellulaire ; des coupes semi-fines que nous avons effectuées sur des feuilles de soja dépigmentées ont montré une déformation des cellules du parenchyme foliaire chlorophyllien et les chloroplastes sont en nombre réduit (résultat non montré).

Ces résultats sont en accord avec ceux de Dalla Vecchia et *al.*, (2001), qui ont montré que dans les feuilles de maïs traitées au norflurazon, les plastes sont sévèrement endommagés ; ils présentent juste quelques ribosomes dans un stroma vide pratiquement dépourvu de thylakoides.

L'absence de caroténoïdes engendre donc non seulement une photooxydation des chlorophylles, mais également une destruction des thylakoides et des ribosomes plastidiaux.

A l'échelle cellulaire, l'absence de caroténoïdes et de chlorophylles entraîne une perturbation dans la structure des membranes où la stabilité protéines/lipides et pigments serait compromise (Havaux, 1998).

Les aspects toxiques du norflurazon ont été décrits dans de nombreuses études (Wilkinson, 1985; Dalla Vecchia et *al.*, 2001 ; Yurina et Kloppstech, 2001). Parmi les nombreux effets, figure l'inhibition de l'importation des protéines plastidiales (Dahlin, 1993).

Les précurseurs des protéines plastidiales codées par le noyau sont synthétisés dans le cytosol, puis transportés à travers les membranes de l'enveloppe vers le stroma où ils sont débarrassés de leur séquence transit par des processing peptidases. Dahlin, (1993) ; Dahlin et Franzen, (1997) ont montré que le norflurazon peut réduire l'importation des protéines précurseurs vers le chloroplaste. Il est donc possible que la déficience en caroténoïdes soit due à la réduction de l'importation des enzymes impliquées dans la biosynthèse de ces derniers ou à leur non intégration dans les membranes (manque de stabilisation du fait de l'absence des caroténoïdes).

Il se peut aussi que les protéines soient importées mais qu'elles ne soient pas processées par perte de l'activité des processing peptidases ou qu'elles soient inactives simplement par manque d'énergie (ATP).

### 3- Effet sur la composition en lipides

#### 3.1- Teneur en lipides totaux

Aux doses  $10^{-6}$  M et  $10^{-5}$  M de norflurazon (Fig. 38), la masse des lipides totaux dans les feuilles I de plantules de soja varie très peu. La dose  $10^{-4}$  M de norflurazon affecte par contre sévèrement les lipides totaux dont la masse accuse une baisse de 43% par rapport au témoin. En effet, la teneur en lipides totaux qui est de 5.7 mg .g<sup>-1</sup>MVF dans les feuilles des plantules témoins diminue à 3.2 mg. g<sup>-1</sup>MVF dans les feuilles des plantules traitées.

Dans les feuilles II, des résultats sensiblement similaires sont observés (Fig. 38).

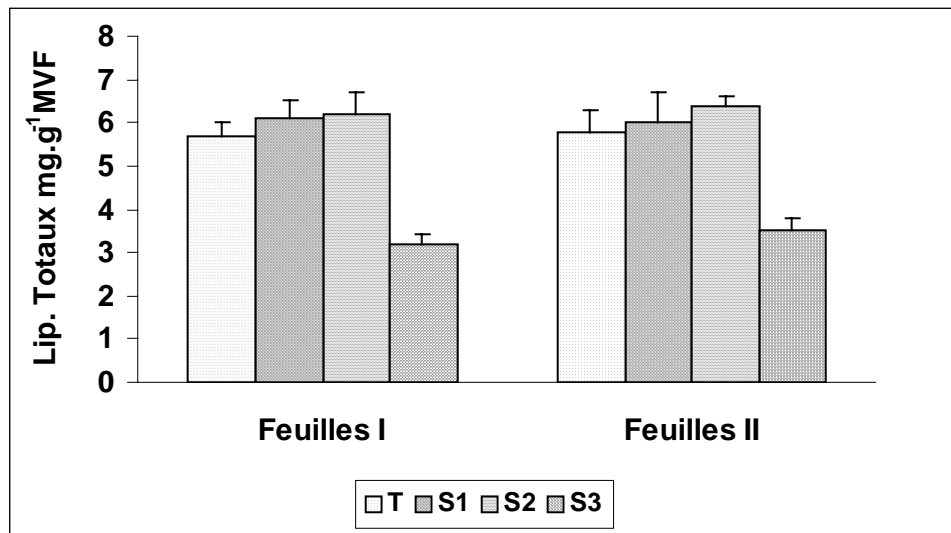


Figure 38 : Effet du norflurazon sur la teneur en lipides totaux dans les feuilles de soja. (Lipides en mg.g-1MVF. T= Témoin, S1= 10<sup>-6</sup>M, S2= 10<sup>-5</sup>M, S3= 10<sup>-4</sup>M).

#### 3.2- Teneur et Composition en acides gras des lipides totaux

La masse des acides gras des lipides totaux (Fig. 39), varie en fonction de la dose herbicide administrée.

A la dose  $10^{-6}$ M, les teneurs en acides palmitique, stéarique et oléique varient peu (tout au plus une légère diminution est observée) alors que les teneurs en acides linoléique et linoléinique augmentent respectivement de 40% et 17%.

Pour la dose  $10^{-5}$ M, mis à part l'acide stéarique dont la quantité ne varie presque pas, la masse de tous les autres acides gras augmente par rapport au témoin.

La composition en acides gras varie très peu de même que l'IDL ou indice de doubles liaisons (Tab. XVIII).

La forte dose  $10^{-4}$ M, entraîne une diminution de la masse de tous les acides gras, plus particulièrement les acides trans hexadécénoïque et linoléinique qui sont respectivement réduits de 60% et 48% comparativement au témoin (Fig. 39). Cette réduction des différents acides gras résulte d'une diminution des enzymes

impliquées dans la synthèse des lipides (acide gras synthétase notamment) et explique la forte diminution des lipides totaux observée.

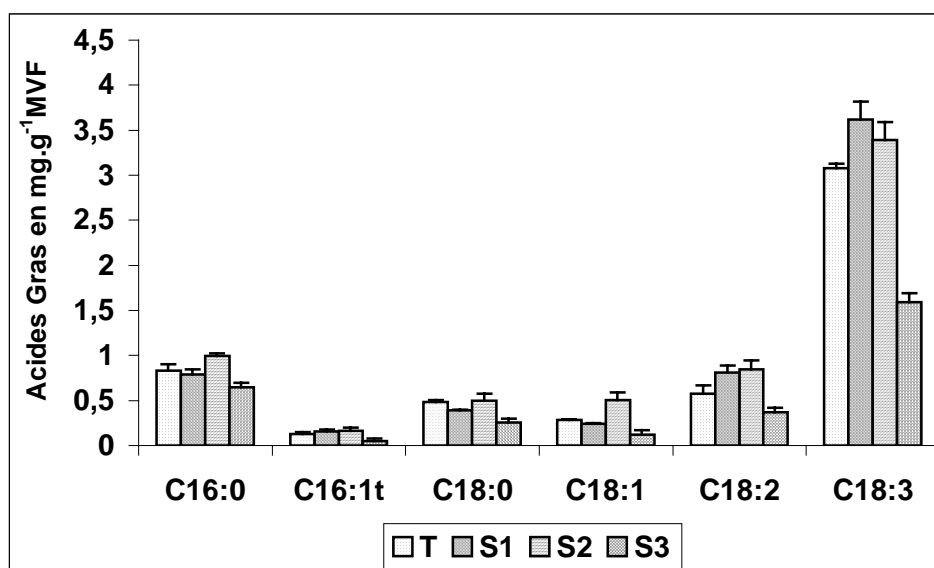


Figure 39 : Effet du norflurazon sur la teneur en acides gras totaux des feuilles de soja. (Acides gras en  $\text{mg.g}^{-1}\text{MVF}$ . T= Témoin, S1=  $10^{-6}\text{M}$ , S2=  $10^{-5}\text{M}$ , S3=  $10^{-4}\text{M}$ ).

Cette dose est également celle qui modifie le plus la composition en acides gras des lipides totaux: les modifications concernent surtout les acides palmitique et linoléique qui augmentent respectivement de 45% et 15% par rapport au témoin et les acides trans hexadécénoïque et linoléique qui sont respectivement réduits de 32% et 9% comparativement au témoin.

L'indice de doubles liaisons chute de 200.4 dans les feuilles des plantules témoins à 186 dans les feuilles des plantules dépigmentées.

La diminution de l'IDL observée sous l'effet de la forte dose trouve son origine dans la réduction du taux des acides linoléique et trans hexadécénoïque.

Tableau XVIII : Effet du norflurazon sur la composition en acides gras (en % des acides gras totaux) des lipides foliaires de plantules de soja.

	C16 :0	C16 :1t	C18 :0	C18 :1	C18 :2	C18 :3	IDL
<b>Témoin</b>	15,4±1,2	2,2 ± 0,5	9.0 ± 1.1	5.1 ± 1.5	10.6±1.7	57.3±7.2	200.4
<b>NFZ 10<sup>-6</sup>M</b>	13.1±0.6	2.6 ± 0.2	6.5 ± 2.6	4.0 ± 0.2	13.4±0.6	60.3±3.7	214.3
<b>NFZ 10<sup>-5</sup>M</b>	15.5±1.6	2.5 ± 0.1	1.7 ± 1.9	7.8 ± 2.4	13.2±0.4	53.0±2.0	195
<b>NFZ 10<sup>-4</sup>M</b>	22.3±0.8	1.5 ± 0.3	7.5 ± 4.3	4.0 ± 0.1	12.2±1.7	52.0±2.3	186

La variation dans la composition en acides gras des lipides totaux montre une perturbation des enzymes du métabolisme lipidique telles la palmitoyl élongase et les désaturases.

### 3.3 - La teneur et la composition en classes lipidiques

#### 3.3.1 – Lipides des membranes chloroplastiques

Aux faibles doses  $10^{-6}M$  et  $10^{-5}M$ , les galactolipides tendent à augmenter en masse (Fig. 40) et en valeur relative (Tab. XIX).

Sous l'effet de la forte dose  $10^{-4}M$ , les galactolipides diminuent sévèrement aussi bien en masse (Fig. 40) qu'en proportions (Tab. XIX). La quantité de MGDG passe de  $2.3 \text{ mg.g}^{-1}MVF$  dans les feuilles des plantules témoins à  $0.75 \text{ mg.g}^{-1}MVF$  dans les feuilles des plantules traitées soit une réduction de 67% ; la masse du DGDG chute de  $1.3 \text{ mg.g}^{-1}MVF$  dans les feuilles témoins à  $0.26 \text{ mg.g}^{-1}MVF$  dans les feuilles des plantules traitées soit 79% de diminution.

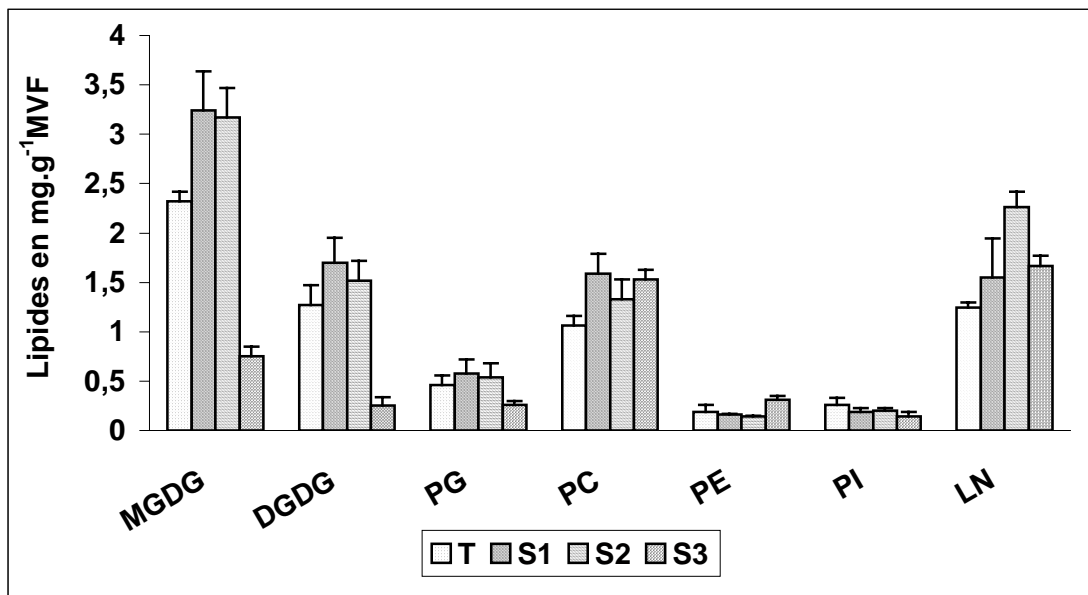


Figure 40 : Effet du norflurazon sur la teneur en classes lipidiques des feuilles de soja. (Lipides en  $\text{mg.g}^{-1}MVF$ . T= Témoin, S1=  $10^{-6}M$ , S2=  $10^{-5}M$ , S3=  $10^{-4}M$ ).

Le rapport MGDG/DGDG passe de 1,52 chez les plantules témoins à 2,46 chez les plantules traitées ce qui traduit un effet plus important sur le DGDG et donc sur l'enveloppe du chloroplaste vu que ce galactolipide y est majoritairement représenté.

En valeur relative (Tab. XVIII), le PG demeure pratiquement inchangé quelle que soit la dose administrée. En valeur absolue (Fig. 40), la teneur en PG varie peu dans les feuilles des plantules traitées par les doses  $10^{-6}M$  et  $10^{-5}M$ .

Pour la dose  $10^{-4}M$ , la quantité de PG passe de  $0.46 \text{ mg.g}^{-1}MVF$  dans les feuilles témoins à  $0.26 \text{ mg.g}^{-1}MVF$  dans les feuilles des plantules traitées soit 43 % de réduction comparativement aux plantules témoins (Fig. 40).

Tableau XIX : Effet du norflurazon sur la composition en lipides chloroplastiques des feuilles de soja. (Lipides exprimés en pourcentage des classes lipidiques totales).

	<b>MGDG</b>	<b>DGDG</b>	<b>PG</b>
<b>Témoin</b>	31.8 ± 2.8	20.3 ± 2.5	6.2 ± 1.0
<b>NFZ 10<sup>-6</sup> M</b>	37.5 ± 2.0	22.0 ± 0.9	6.2 ± 1.1
<b>NFZ 10<sup>-5</sup> M</b>	34.5 ± 0.9	20.3 ± 2.1	6.0 ± 1.1
<b>NFZ 10<sup>-4</sup> M</b>	19.5 ± 0.6	07.4 ± 1.4	6.2 ± 0.8

La réduction de la masse des lipides chloroplastiques et en particulier des galactolipides) engendrée par le norflurazon 10<sup>-4</sup> M traduirait une inhibition de la biosynthèse de ces derniers par blocage des enzymes impliquées dans leur formation, et/ou une augmentation de leur dégradation entraînant une altération des structures membranaires. Il a été démontré que le stress diminue les activités de biosynthèse des galactolipides (Aid et *al.*, 1998 et Benhassaine-Kesri et *al.*, 2002).

### 3.3.2 - Lipides des membranes extrachloroplastiques.

La composition en lipides extrachloroplastiques (Tab. XX) ainsi que leur quantité (Fig. 40), varient en fonction des doses administrées.

Sous l'effet des doses 10<sup>-6</sup>M et 10<sup>-5</sup>M, les proportions et les quantités de PC, PE et PI ne changent que très légèrement.

Dans les feuilles des plantules traitées par la dose 10<sup>-4</sup>M, le pourcentage de PC est pratiquement doublé et celui de PE quadruplé (Tab. XX), il en est de même de leur quantité (Fig. 40) : la masse de PC augmente de 43%, elle passe de 1.06 mg.g<sup>-1</sup>MVF dans les feuilles témoins à 1.53 mg.g<sup>-1</sup>MVF dans les feuilles traitées et celle de la PE est pratiquement doublée (0.19 mg.g<sup>-1</sup>MVF dans les feuilles témoins et 0.31 mg.g<sup>-1</sup>MVF dans les feuilles traitées).

Le PI demeure inchangé en valeur relative, mais il diminue en masse, en effet la quantité de PI passe de 0.26 mg.g<sup>-1</sup>MVF dans les feuilles des plantules témoins à 0.14 mg.g<sup>-1</sup>MVF dans les feuilles traitées soit 46 % de réduction en présence de l'herbicide.

Tableau XX : Effet du norflurazon sur la composition en lipides extrachloroplastiques des feuilles de soja. (Lipides exprimés en pourcentage des classes lipidiques totales).

	<b>PC</b>	<b>PE</b>	<b>PI</b>
<b>Témoin</b>	14.6 ± 2.0	2.3 ± 0.1	3.4 ± 0.9
<b>NFZ 10<sup>-6</sup> M</b>	16.0 ± 1.5	1.5 ± 0.0	2.3 ± 0.4
<b>NFZ 10<sup>-5</sup> M</b>	15.0 ± 0.9	1.6 ± 0.0	2.3 ± 0.1
<b>NFZ 10<sup>-4</sup> M</b>	27.9 ± 3.0	8.4 ± 0.8	3.4 ± 0.3

Les lipides neutres varient peu en présence des faibles doses de norflurazon mais ils augmentent en masse et en proportions en présence de la dose  $10^{-4}$ M; leur masse augmente de 23% ; en proportions ils passent de 21.4% dans les feuilles témoins à 28% dans les feuilles traitées soit 27% d'augmentation.

Le norflurazon affecte différemment la composition en lipides dans les feuilles de soja. Aux faibles doses, le norflurazon induit de faibles variations dans la masse et la composition en classes lipidiques se traduisant surtout par de légères augmentations ce qui impliquerait une activation de la synthèse de nouvelles membranes et correspondrait à une réponse adaptative de la part des plantules vis à vis du stress chimique. En effet le stress étant modéré, les plantules ajustent leur métabolisme lipidique pour maintenir leurs activités et fonctionner plus ou moins normalement.

La dose  $10^{-4}$ M réduit les lipides chloroplastiques en masse et en pourcentage plus particulièrement les galactolipides.

La diminution des lipides chloroplastiques (galactolipides et PG) résulte de leur dégradation et/ou de l'inhibition de leur synthèse. Cette réduction de la masse des lipides des chloroplastes implique une déstructuration des membranes de ces organites.

Les phospholipides extrachloroplastiques PC et PE augmentent en masse et en proportion. L'augmentation en masse de la PC peut résulter d'un ralentissement ou d'une inhibition de son acheminement vers le chloroplaste auquel elle fournit des diacylglycérols.

Le norflurazon augmente la teneur en lipides neutres dans les feuilles des plantules traitées. Une augmentation de la teneur en lipides neutres en réponse à des conditions stressantes a déjà été observée par Hubac et *al.*, (1989), Monteiro et *al.*, (1990) et Hamrouni et *al.*, (2001).

### **3.4 - La teneur en acides gras des classes lipidiques**

#### **3.4.1 - Acides gras du MGDG**

La Figure 41, montre les variations engendrées par le norflurazon dans les teneurs en acide linoléinique acide gras majeur du MGDG.

Pour les doses  $10^{-6}$ M et  $10^{-5}$ M, la masse de l'acide linoléinique passe de  $2.08 \text{ mg.g}^{-1}$ MVF dans les feuilles témoins à  $3.05 \text{ mg.g}^{-1}$ MVF et  $2.95 \text{ mg.g}^{-1}$ MVF respectivement dans les feuilles des plantes traitées par les doses  $10^{-6}$ M et  $10^{-5}$ M. L'augmentation de la masse de MGDG observée en présence de ces deux doses d'herbicide est due essentiellement à l'augmentation de cet acide gras.

Sous l'effet de la dose  $10^{-4}$  M, la masse de l'acide linoléinique diminue de  $2.08 \text{ mg.g}^{-1}$ MVF à  $0.67 \text{ mg.g}^{-1}$ MVF dans les feuilles traitées soit une baisse de 67% comparativement aux feuilles témoins.

Cette diminution de la quantité d'acide linoléinique sous l'effet de la forte dose traduit un blocage de la synthèse du 18 :3 MGDG et /ou une stimulation de sa dégradation.

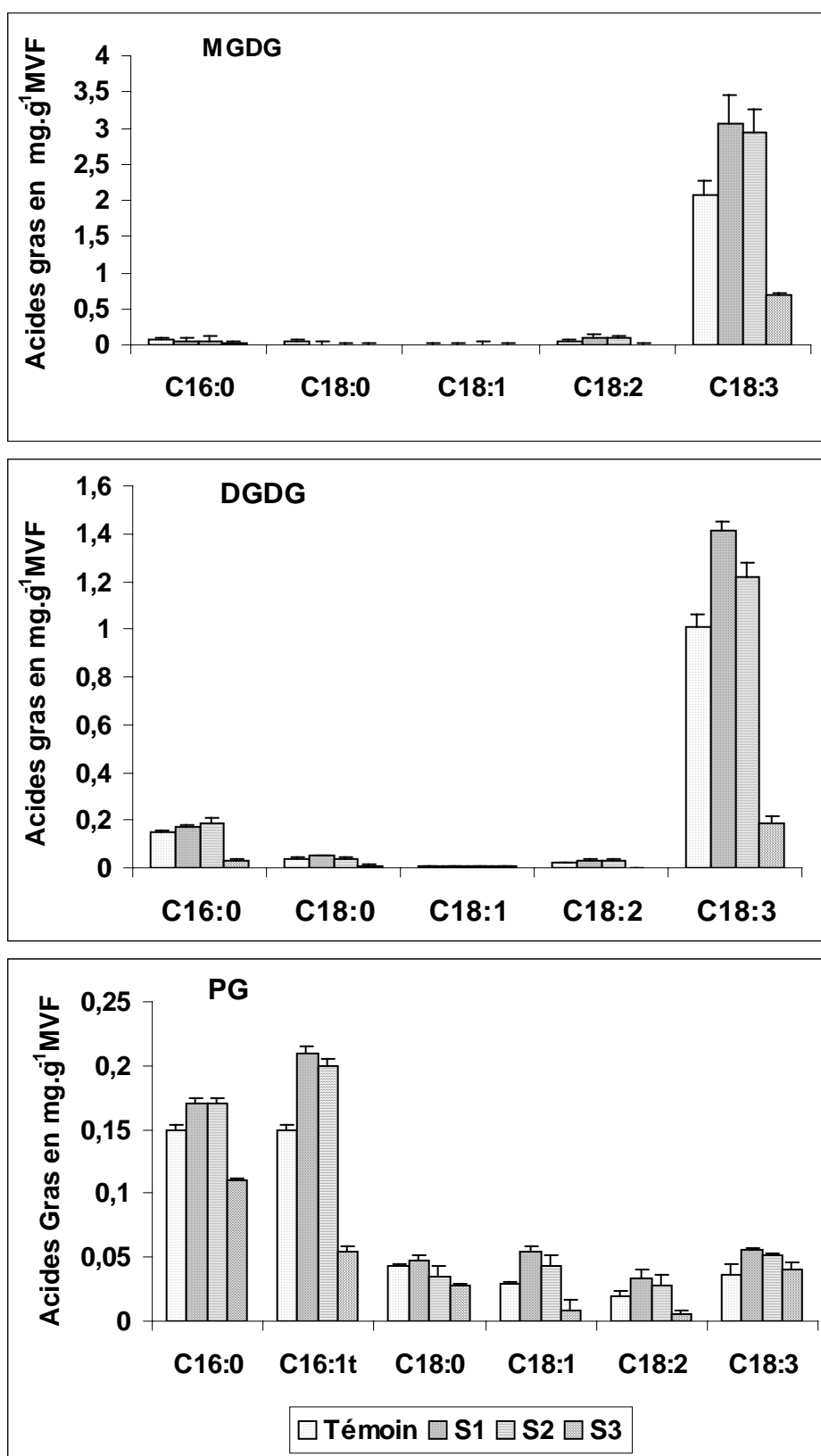


Figure 41 : Effet du norflurazon sur la teneur en acides gras des lipides du chloroplaste. (Acides gras en mg.g<sup>-1</sup>MVF. T= Témoin, S1= 10<sup>-6</sup>M, S2= 10<sup>-5</sup>M, S3= 10<sup>-4</sup>M).

### 3.4.2 - Acides gras du DGDG

En valeur absolue (Fig. 41), les acides gras palmitique et linoléique acylés au DGDG augmentent pour les doses  $10^{-6}M$  et  $10^{-5}M$  ce qui explique l'augmentation de la teneur en DGDG observée en présence de ces doses d'herbicide.

Sous l'effet de la dose  $10^{-4}M$ , les acides gras palmitique et linoléique diminuent : la teneur de l'acide palmitique passe de  $157.5 \mu g.g^{-1}MVF$  dans les feuilles des plantules témoins à  $31 \mu g.g^{-1}MVF$  dans les feuilles des plantules traitées et celle de l'acide linoléique chute de  $1 mg.g^{-1}MVF$  à  $0.2 mg.g^{-1}MVF$  soit une baisse de 80% par rapport au témoin.

La réduction de l'ensemble des acides gras observée explique la forte baisse de la masse de DGDG et traduit une inhibition de la synthèse du DGDG et/ou une dégradation de ce dernier.

### 3.4.3 - Acides gras du PG

Les faibles doses de norflurazon (Fig. 41), élèvent les quantités de la majorité des acides gras estérifiés au PG. L'augmentation de la masse des différents acides gras provoquée par les doses  $10^{-6}M$  et  $10^{-5}M$  de norflurazon confirme l'augmentation de la masse de PG observée en présence de l'herbicide.

Pour la dose  $10^{-4}M$ , mis à part l'acide linoléique qui ne varie pratiquement pas, tous les acides gras voient leur quantité diminuer plus particulièrement les acides palmitique, trans-hexadécénoïque et linoléique dont la teneur chute respectivement de 26%, 64% et 68% par rapport aux feuilles témoins.

### 3.4.4 - Acides gras de PC

Dans PC (Fig. 42), les masses des différents acides gras ont tendance à augmenter pour les doses  $10^{-6}M$  et  $10^{-5}M$  comparativement au témoin.

Dans les feuilles des plantules traitées par la dose  $10^{-4}M$ , les quantités d'acides palmitique et stéarique restent inchangées, celles des acides oléique et linoléique diminuent, elles passent respectivement de  $30 \mu g.g^{-1}MVF$  et  $325 \mu g.g^{-1}MVF$  à  $16 \mu g.g^{-1}MVF$  et  $133 \mu g.g^{-1}MVF$  soit une baisse de 47% et 59% respectivement.

La teneur en acide linoléique augmente par contre, en effet, celle ci est de  $377 \mu g.g^{-1}MVF$  dans les feuilles témoins, elle s'élève à  $590.2 \mu g.g^{-1}MVF$  dans les feuilles des plantules traitées soit une augmentation de 57%.

### 3.4.5 - Acides gras de PE

Dans PE (Fig. 42), la teneur en acides gras saturés palmitique et stéarique diminuent en présence des doses  $10^{-6}M$  et  $10^{-5}M$  et celle de l'acide oléique demeure inchangée. Les quantités d'acides linoléique et linoléique augmentent légèrement.

Sous l'effet de la forte dose de norflurazon, hormis l'acide linoléique qui ne varie presque pas, tous les autres acides gras augmentent en masse, ce qui explique l'élévation de la quantité de PE observée.

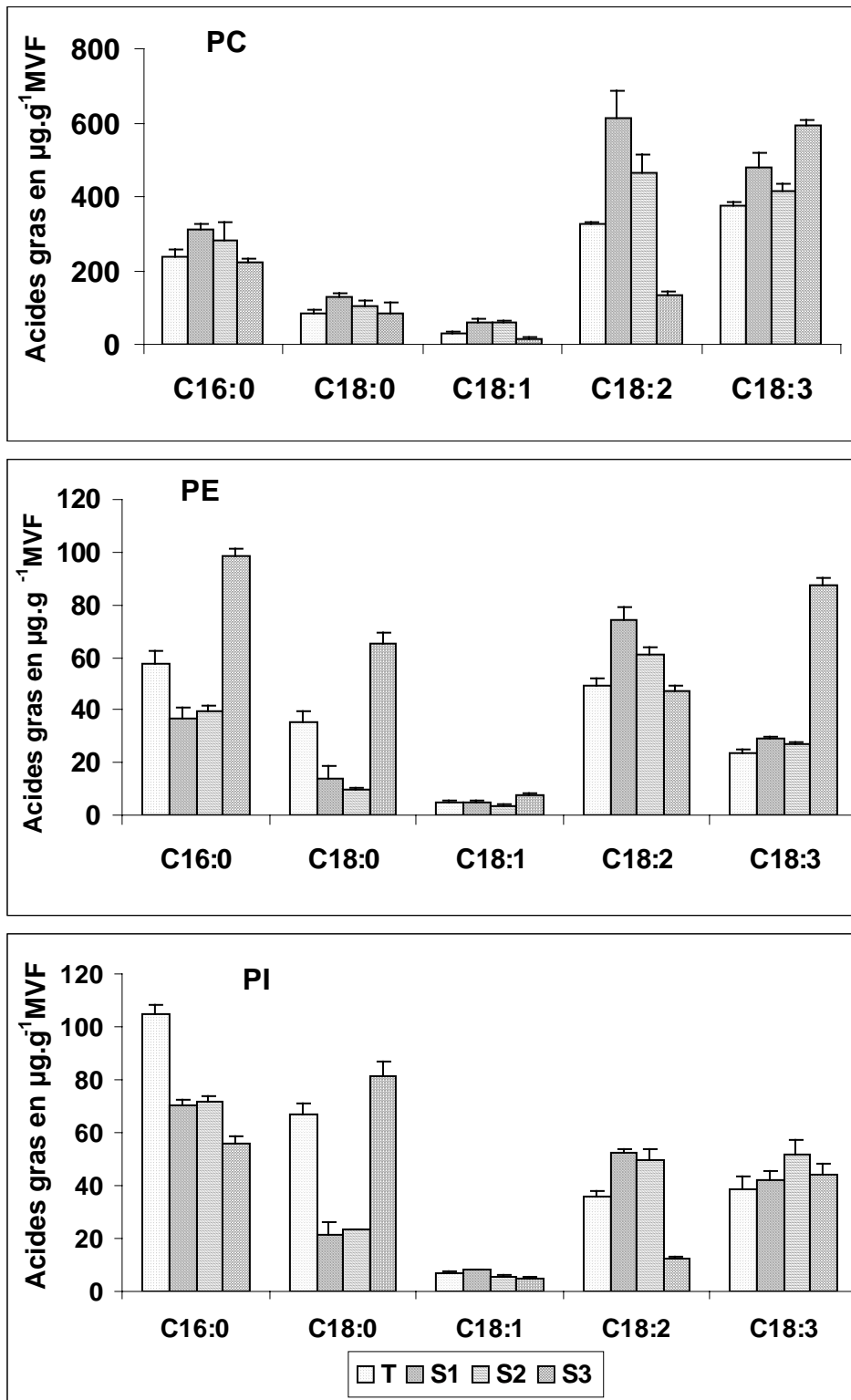


Figure 42 : Effet du norflurazon sur la teneur en acides gras des lipides extra-chloroplastiques des feuilles de soja. (Acides gras en  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MVF}$ . T= Témoin, S1=  $10^{-6}\text{M}$ , S2=  $10^{-5}\text{M}$  et S3=  $10^{-4}\text{M}$ ).

### 3.4.6 - Acides gras du PI

En valeur absolue (Fig. 42), l'acide palmitique diminue pour toutes les concentrations d'herbicide utilisées. L'acide stéarique est réduit sous l'effet des doses  $10^{-6}$ M et  $10^{-5}$ M mais il augmente en présence de la forte dose.

La masse de l'acide oléique varie très peu sous l'effet de l'herbicide. L'acide linoléique voit sa teneur augmenter sous l'effet des faibles doses et diminuer sous l'effet de la forte dose. Quant à l'acide linoléique, sa masse augmente légèrement pour toutes les doses de norflurazon utilisées.

## 3.5- Composition en acides gras et en espèces moléculaires des différentes classes lipidiques

### 3.5.1 – composition en acides gras des lipides des membranes chloroplastiques

Le tableau XXI, montre les variations de la composition en acides gras ainsi que l'indice de doubles liaisons ou IDL dans les lipides des membranes du chloroplaste (MGDG, DGDG et PG) des feuilles de plantules de soja témoins et traitées par le norflurazon  $10^{-4}$  M.

Dans le MGDG, la proportion de l'acide palmitique augmente et celle des acides gras insaturés oléique et linoléique diminue sous l'effet du norflurazon ; Le taux d'acide linoléique ne change pas d'où la faible variation de l'IDL.

Dans le DGDG, les taux d'acides stéarique et oléique augmentent et ceux des acides linoléique et linoléique diminuent ce qui explique la réduction de l'IDL.

Dans le PG, le norflurazon ne modifie que légèrement l'IDL car la réduction des proportions des acides trans hexadécénoïque, oléique et linoléique est contrebalancée par l'augmentation du taux de l'acide linoléique.

Tableau XXI : Effet du norflurazon  $10^{-4}$  M sur la composition (en %) en acides gras des lipides des membranes chloroplastiques. (T : témoins, E : traitées).

	16 :0	16 :1t	18 :0	18 :1	18 :2	18 :3	IDL
<b>T</b>	3.2± 0.5	-	2.3± 1.6	0.2± 0.0	2.8± 0.6	91.5 ±1.3	280.3
<b>MGDG</b>							
<b>E</b>	5.04± 1.6	-	1.6 ± 0.3	0.6 ± 0.3	5.0 ± 0.0	91.6 ±3.8	278.3
<b>T</b>	12.5±0.6	-	3.5± 0.3	0.7± 0.3	2.0± 0.1	81.2 ±1.0	248.3
<b>DGDG</b>							
<b>E</b>	12.3 ±0.3	-	6.0 ± 1.7	2.7 ± 0.3	1.1 ± 0.0	77.9 ±2.3	238.6
<b>T</b>	34.6± 0.8	35.7 ±2.1	9.9 ± 1.5	6.9 ± 0.9	4.5 ± 0.2	8.3 ± 1.0	76.5
<b>PG</b>							
<b>E</b>	45.0 ±3.1	22.1 ±2.8	11.1 ±0.5	3.7 ± 0.3	2.2 ± 0.1	15.8 ±2.6	77.6

### 3.5.2 - Espèces moléculaires des lipides des membranes chloroplastiques

#### - Espèces moléculaires du MGDG

Dans le MGDG (Tab. XXII), l'espèce moléculaire 18 :3/18 :3, espèce majoritaire qui représente 92 % du total des espèces moléculaires du MGDG dans les feuilles témoins diminue à 71.9 % dans les feuilles des plantules traitées soit une réduction de 22% sous l'effet du norflurazon.

Cette réduction découle de l'augmentation de l'espèce moléculaire 18 :2/18 :3 et plus particulièrement de l'espèce moléculaire 18:2/18:2 qui sont les précurseurs immédiats de la 18:3/18:3 MGDG. En effet, l'espèce moléculaire 18 :2/18 :2 est 6 fois plus représentée dans les feuilles des plantules traitées ; ce résultat suggère une inhibition de l' $\omega^3$  désaturase liée au MGDG. Norman et *al.*, (1987) ont également observé une diminution des espèces moléculaires les plus insaturées du MGDG dans les plantules d'*Arabidopsis* soumise à un autre pyridazinone substitué le BASF 13-338. Cette inhibition semble affecter les deux positions sn1 et sn2 du MGDG.

Tableau XXII : Effet du norflurazon  $10^{-4}$ M sur la composition en espèces moléculaires du MGDG des feuilles de soja.(nmoles % ; T : témoins, E : traitées).

Espèces Moléculaires	MGDG	
	T	E
18 :3/18 :3	92	71.9
18 :2/18 :3	0.3	2.7
18 :2/18 :2	3.2	18.5
18 :1/18 :3	-	-
18 :0/18 :3	0.1	1.0
16 :0/18 :3	4.4	5.8

La réduction du 18 :3/18 :3 MGDG peut provenir de la diminution de la désaturation des espèces moléculaires précurseurs 18 :2/18 :3 et 18 :2/18 :2 et/ou de la stimulation de la dégradation du dilinolényl MGDG par les galactolipases. Il a été montré que les activités des MGDG hydrolases pouvaient augmenter sous l'action du stress hydrique (El Hafid et *al.*, 1989) et la dégradation du MGDG est susceptible d'engendrer une diminution de l'insaturation suite à la réduction de l'acide linoléique.

#### - Espèces moléculaires du DGDG

Dans le DGDG, le norflurazon modifie légèrement la composition en espèces moléculaires (Tab. XXIII). Il diminue l'espèce moléculaire la plus insaturée 18 :3/18 :3 tout en augmentant les espèces moléculaires précurseurs les 18 :2/18 :3 et 18 :2/18 :2.

Les autres espèces moléculaires ne varient presque pas sous l'effet de l'herbicide.

Tableau XXIII : Effet du norflurazon  $10^{-4}$  M sur la composition en espèces moléculaires du DGDG des feuilles de soja.(nmoles %).

Espèces moléculaires	DGDG	
	T	E
<b>18 :3/18 :3</b>	<b>69.1</b>	<b>64.0</b>
18 :2/18 :3	2.9	3.9
18 :2/18 :2	0.4	3.2
18 :1/18 :3	0.7	1.0
18 :0/18 :3	5.8	4.8
<b>16 :0/18 :3</b>	<b>19.8</b>	<b>21.8</b>
18 :1/18 :2	0.1	0.1
16 :0/18 :2	0.9	1.0

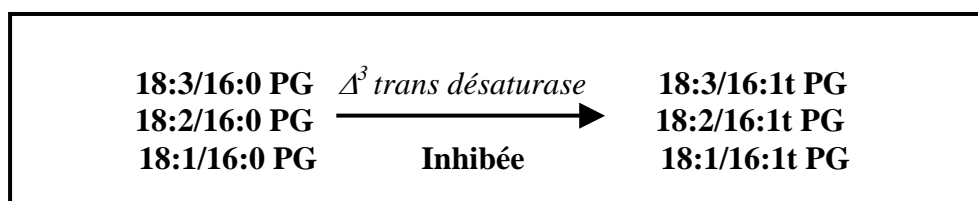
### - Espèces moléculaires du PG

Dans le PG, le norflurazon réduit toutes les espèces moléculaires ayant du C16:1t en position sn2 du PG plus particulièrement la 18 :3/16 :1t et 18 :2/16 :1t qui sont respectivement réduites de 38% et 91% dans le PG des feuilles traitées alors que les espèces moléculaires saturées ayant du C16:0 en position sn-2 en particulier les 18 :3/16 :0 et 18 :2/16 :0 augmentent respectivement de 68% et 30% sous l'effet de l'herbicide (Tab. XXIV).

Tableau XXIV : Effet du norflurazon  $10^{-4}$ M sur la composition en espèces moléculaires du PG des feuilles de soja (nmoles %).

Espèces moléculaires	PG	
	T	E
<b>18:3/16:0</b>	14.5	24.5
<b>18:3/16:1t</b>	15.2	9.2
<b>18:2/16:0</b>	7.2	9.4
<b>18:2/16:1t</b>	3.5	0.3
<b>18:1/16:0</b>	30.4	29.0
<b>18:1/16:1t</b>	29.1	27.1

La réduction des espèces moléculaires ayant du C16 :1t traduit une inhibition de la  $\Delta^3$  trans désaturase liée au PG.



Le PG 16 :1tr est impliqué dans la biogénèse du LHCII, dans son organisation oligomérique et donc dans le fonctionnement du PSII (Dubertret et *al.*, 1994). La forte chute du C16 :1tr lié au PG traduit une altération dans l'organisation supramoléculaire de l'antenne collectrice d'énergie du PSII de ce fait, la phase claire de la photosynthèse est perturbée ce qui se répercute négativement sur le fonctionnement et l'état général du végétal.

Dans les trois principaux lipides des membranes du chloroplaste, le norflurazon entraîne une augmentation de la saturation en favorisant l'accumulation des espèces moléculaires les moins insaturées suite probablement au blocage des enzymes impliquées dans les activités de désaturation.

### 3.5.3 – Composition en acides gras des lipides des membranes extrachloroplastiques

Dans les phospholipides (PC, PE et PI) du compartiment extrchloroplastique, les changements dans la composition en acides gras concernent surtout les acides linoléique et linoléique. L'acide linoléique est en proportion réduite dans les plantules traitées alors que le taux d'acide linoléique est augmenté sous l'effet du norflurazon. Cet effet se reflète au niveau de l'IDL qui est augmenté en présence de l'herbicide (Tab. XXV).

Tableau XXV : Effet du norflurazon  $10^{-4}$  M sur la composition (en %) en acides gras des lipides des membranes extrachloroplastiques.

Acides Gras		C16 :0	C18 :0	C18 :1	C18 :2	C18 :3	IDL
PC	T	22.4 ± 0.3	07.9 ± 0.9	02.8 ± 0.4	30.9 ± 1.4	35.9 ± 1.8	172.3
	E	21.2 ± 0.6	07.9 ± 0.8	01.5 ± 0.3	12.7 ± 0.8	56.6 ± 2.0	196.7
PE	T	30.5 ± 2.8	19.1 ± 1.1	2.6 ± 0.3	26.4 ± 3.9	12.8 ± 1.4	93.8
	E	30.6 ± 1.6	19.7 ± 1.5	2.3 ± 0.7	15.3 ± 3.5	27.8 ± 0.7	116.3
PI	T	37.5 ± 3.6	29.3 ± 1.4	2.5 ± 0.8	15.0 ± 1.0	16.1 ± 1.6	80.8
	E	37.8 ± 2.1	18.1 ± 2.1	2.7 ± 0.7	8.2 ± 0.5	31.6 ± 1.2	113.9

Aussi bien dans la PC que dans la PE et le PI, il est observé une diminution du taux de 18 :2 concomitant à une augmentation du taux de 18 :3 sous l'effet du norflurazon. Cet herbicide semble donc favoriser la formation de l'acide linoléique dans le compartiment extrachloroplastique.

### 3.5.4 - Espèces moléculaires des lipides des membranes extrachloroplastiques

#### - Espèces moléculaires de PC

Dans la PC (Tab. XXVI), le norflurazon réduit l'espèce moléculaire majoritaire 18:2/18:3 qui est de 91% dans les feuilles des plantules témoins et qui n'est que de

83% dans les feuilles des plantules prétraitées au norflurazon; L'espèce moléculaire 18 :2/18 :2 est également diminuée sous l'effet de l'herbicide (30% de réduction) ; en revanche l'espèce la plus insaturée 18:3/18:3 qui est très réduite dans les feuilles témoins (0.6%) augmente sous l'effet du norflurazon (5.3%); ceci traduirait une stimulation de la  $\Delta^{15}$  désaturase liée à la PC.

Les autres espèces moléculaires moins insaturées (18 :1/18 :3, 18 :0/18 :3 et 18 :1/18 :2) varient peu dans les plantules traitées. Les espèces moléculaires 16:0/18:3 et 16:0/18:2 sont en proportions presque doublées sous l'effet de l'herbicide.

Tableau XXVI : Effet du norflurazon  $10^{-4}$  M sur la composition en espèces moléculaires dans la PC des feuilles soja (nmoles %).

Espèces moléculaires	PC	
	T	E
<b>18 :3/18 :3</b>	<b>0.6</b>	<b>5.3</b>
<b>18 :2/18 :3</b>	<b>91.2</b>	<b>83.6</b>
<b>18 :2/18 :2</b>	3.0	2.1
<b>18 :1/18 :3</b>	0.4	0.3
<b>18 :1/18 :2</b>	0.4	0.3
<b>18 :0/18 :3</b>	0.3	1.0
<b>16 :0/18 :3</b>	1.9	3.5
<b>16 :0/18 :2</b>	1.9	3.6
<b><math>\Sigma</math>18/18</b>	95.9	92.6
<b><math>\Sigma</math>16/18</b>	3.8	7.1

La somme des espèces moléculaires 18/18 diminue de 95.9% à 92.6% sous l'effet de l'herbicide alors que la somme des espèces moléculaires saturées 16/18 est pratiquement doublée en présence du norflurazon (Tab. XXVI). Le norflurazon semble modifier la distribution des espèces moléculaires liées à la PC et augmenter les espèces moléculaires 16/18 suite probablement à une exportation plus intense de l'acide palmitique à partir du chloroplaste.

#### – Espèces moléculaires de PE

Dans la PE (Tab. XXVII), l'espèce moléculaire la plus insaturée varie très peu, l'espèce moléculaire 18:2/18:3 augmente 4 fois plus sous l'effet du norflurazon alors que les espèces moléculaires 18:1/18:3 et 18:2/18:2 sont réduites dans les feuilles des plantules traitées.

Le norflurazon semble favoriser la formation des espèces 18 :2/18 :3 et 18 :3/18 :3 au détriment des espèces 18 :1/18 :3 et 18 :2/18 :2.

Les espèces moléculaires contenant du C16 en position sn1de la PE évoluent différemment sous l'effet du norflurazon: la 16:0/18:3 varie très peu alors que l'espèce 16:0/18:2 augmente.

Tableau XXVII : Effet du norflurazon  $10^{-4}$  M sur la composition en espèces moléculaires dans la PE des feuilles soja (nmoles %).

Espèces moléculaires	PE	
	T	E
<b>18 :3/18 :3</b>	13.6	15.8
<b>18 :2/18 :3</b>	5.8	20.6
<b>18 :2/18 :2</b>	29	10.9
<b>18 :1/18 :3</b>	3.4	0.7
<b>16 :0/18 :3</b>	33.5	31.3
<b>16 :0/18 :2</b>	14.5	20.5

Le norflurazon agit différemment sur la composition en acides gras des différentes classes lipidiques et leur niveau d'insaturation : dans le compartiment chloroplastique il a tendance à réduire le niveau d'acides gras insaturés alors que dans les phospholipides du compartiment extrachloroplastique il a plutôt tendance à élever le niveau d'insaturation en augmentant le taux d'acide linoléique.

### Discussion

D'après nos résultats, le norflurazon semble exercer deux actions possibles qui varient en fonction de l'intensité de la dose :

Les doses  $10^{-6}$ M et  $10^{-5}$ M qui peuvent être qualifiées de doses faibles à modérées, augmentent légèrement la masse des lipides totaux dans les plantules traitées, les classes lipidiques les plus concernées par cette augmentation étant les galactolipides et le PG. Cette action stimulante a été signalée dans de nombreuses situations de stress modéré : la cellule végétale réagit au stress en stimulant ses activités enzymatiques.

La dose  $10^{-4}$ M qui peut être considérée comme forte car elle provoque le photobleaching des plantules traitées, réduit la masse des lipides totaux de 43% dans les feuilles des plantules traitées comparativement aux plantules témoins. La réduction des lipides totaux peut découler de l'inhibition de leur biosynthèse sous l'effet de l'herbicide et/ou de l'accélération de leur dégradation.

Une réduction de la masse de lipides totaux a déjà été rapportée par Willemot et *al.*, (1979) dans des racines de plantules de blé (*Triticum aestivum*) traitées par le BASF 13 338 ou San 9785 et par Di Baccio et *al.*, (2002) dans les étiooplastes de feuilles de plantes d'orge (*Hordeum vulgare*) traitées par le norflurazon.

Par ailleurs, Rajasekharan et Sastry, (1987) ont rapporté une inhibition de l'acide gras synthétase par cinq pyridazinones substitués dans les feuilles d'*Arachis hypogea*.

L'effet exercé par le norflurazon sur les lipides n'est pas un phénomène secondaire résultant de son action sur les pigments donc « du bleaching », il s'agit d'une action directe car le même effet a été observé sur les lipides des tissus non photosynthétiques tels que les racines (St John, 1982).

Dans les plantules de soja, les classes lipidiques les plus sensibles à l'herbicide et donc les plus affectées par cette diminution sont les lipides chloro-plastiques : les MGDG, DGDG et PG diminuent en masse respectivement de 67%, 79% et 43 % par rapport aux plantules témoins.

Ces observations montrent que les chloroplastes sont les premiers à manifester les signes de stress, et suggèrent que ces changements affectent les membranes de l'enveloppe et des thylakoides. En effet, les galactolipides jouent un rôle essentiel dans la biogénèse des membranes chloroplastiques (Jarvis et *al.*, 2000) : ils favorisent l'intégration des complexes protéiques dans les membranes des thylakoides (Dormann et Benning, 2002) intervenant ainsi dans la formation des empilements granaires (Lee, 2000).

La forte réduction des galactolipides traduit donc une altération et une déstructuration sévère des membranes chloroplastiques.

Une réduction de la teneur en galactolipides a déjà été signalée par Khan et *al.*, (1979) chez les plantules de *Vicia faba* et de *Hordeum vulgare* traitées par les pyridazinones San 9785 et San 6706.

La diminution des galactolipides peut être due à l'inactivation des enzymes intervenant dans leur biosynthèse (MGDG synthétase et DGDG synthétase) et/ou à l'activation des enzymes intervenant dans les processus de dégradation de ces lipides (galactolipases).

Dans les feuilles de soja, les cellules sous l'effet du norflurazon, augmentent les phospholipides du compartiment extrachloroplastique PC et PE (probablement pour compenser la perte des lipides chloroplastiques). Une augmentation des phospholipides a été observée par Thomas et *al.*, (1982) dans des feuilles de plantules d'orge soumises à un stress hydrique. Jouhet et *al.*, (2003) ont également observé une augmentation de PC dans les cellules de végétaux en réponse à une carence en phosphate.

L'augmentation des PC et PE dériverait du blocage de la synthèse des galactolipides (PC étant à l'origine des DAG précurseurs des galactolipides) et/ou d'une activation de leur biosynthèse.

Il a été également observé une augmentation des lipides neutres en présence du norflurazon suite probablement à une dégradation partielle de certains lipides polaires. Ces lipides neutres qui se formeraient à partir des acides gras libérés contribueraient à éviter la peroxydation de ces acides gras par les formes réactives d'oxygène.

L'augmentation de la teneur en lipides neutres a été observée dans des conditions de stress salin (Gharsalli et Cherif, 1984) et hydrique (Monteiro de Paula et *al.*, 1990 ; Hamrouni et *al.*, 2001).

Le norflurazon modifie la composition en acides gras des différentes classes lipidiques.

Dans le MGDG, l'espèce moléculaire la plus insaturée du MGDG à savoir la 18 :3/18 :3 diminue sous l'effet du norflurazon alors que les espèces moléculaires précurseurs 18 :2/18 :3 et 18 :2/18 :2 augmentent ; ceci traduit une inhibition de la désaturation du linoléate en linoléate lié au MGDG.

Il se pourrait que la réduction du 18 :3/18 :3 MGDG soit également due à une activité de dégradation sélective de ces espèces moléculaires par des MGDG hydrolases ou galactolipases stimulées par l'herbicide entraînant une réduction de l'insaturation . Ce phénomène a déjà été observé par El Hafidi et *al.*, (1989) dans des feuilles de coton soumises à un stress hydrique.

De nombreux travaux dont ceux de St John, (1982), Khan et *al.*, (1979), Davies et Harwood, (1983) et Norman et St John, (1987) ont rapporté une augmentation du rapport 18 :2/18 :3 des galactolipides sous l'effet des pyridazinones et ont montré que les pyridazinones (BASF 13 338, norflurazon et metflurazon) bloquent la désaturation du C18 :2 en C18 :3 lié au MGDG.

Cependant, la réaction aux traitements par les pyridazinones peut varier selon l'espèce végétale étudiée : le traitement de *Vicia faba* par le metflurazon n'a qu'un très faible effet sur la composition en acides gras des galactolipides (Khan et *al.*, 1979), chez *Hordeum vulgare* cet herbicide réduit le niveau de 18 :3 et augmente celui de 18 :2 lié aux galactolipides (Khan et *al.*, 1979 ; St John, 1982).

Le norflurazon affecte la composition en acides gras et en espèces moléculaires du PG : le taux de C16 :1t diminue alors que celui du C16 :0 augmente, par ailleurs les espèces moléculaires ayant du C16 :1t sont réduites par le norflurazon alors que les espèces moléculaires plus saturées ayant du C16 :0 sont favorisées en présence de l'herbicide traduisant ainsi une inhibition de la  $\Delta^3$  trans désaturase liée au PG. Davies et Harwood (1983), ont déjà signalé l'inhibition de la désaturation du C16 :0 en C16 :1t liée au PG sous l'effet du metflurazon et du norflurazon chez diverses plantes.

De nombreuses approches biochimiques et génétiques ont assigné au PG 16 :1t un rôle clef dans le processus de trimérisation des monomères LHCII et dans la formation des accolements granaires des thylakoides (Dubacq et Trémolières, 1983 ; Trémolières et *al.*, 1991 ; Dubertret et *al.*, 1994 ; El Maani et *al.*, 1998) ; il est donc clair que l'inhibition occasionnée par le norflurazon doit perturber l'organisation fonctionnelle des membranes photosynthétiques.

Il est suggéré tout au moins chez certaines plantes telles *Vicia faba* que le site extrachloroplastique de synthèse du 18 :3 n'est pas influencé par les pyridazinones (Lem et Williams, 1981-1983, Norman et St John, 1987). Cependant Ashworth et *al.*, (1981) ont rapporté dans les tissus non photosynthétiques (racines) de blé une augmentation du rapport 18 :2/18 :3 dans la PC et la PE sous l'effet du BASF 13 338 indiquant par là une inhibition de la désaturation du C18 :2.

Dans notre cas, nous avons observé au niveau du compartiment extrachloroplastique, une augmentation du niveau de C18 :3 lié à la PC et à la PE et une augmentation des espèces moléculaires 18 :3/18 :3 au détriment des espèces 18 :2/18 :3 et 18 :2/18 :2. Ces résultats suggèrent une éventuelle activation de la  $\Delta^{15}$  désaturase extrachloroplastique par le norflurazon.

Le norflurazon affecte négativement les désaturases chloroplastiques ( $\Delta^3$  trans désaturase liée au PG et  $\omega^3$  désaturase liée au MGDG) et semble favoriser la désaturation du C18 :2 dans le compartiment extrachloroplastique. Ce résultat appuie l'idée rapportée dans plusieurs situations physiologiques ou génétiques selon laquelle les plantes du fait de l'organisation coopérative du métabolisme lipidique sont capables de compenser une déficience dans la désaturation dans un compartiment (ici le compartiment chloroplastique) par une augmentation de ce mécanisme dans le compartiment non affecté (ici le réticulum endoplasmique).

L'effet du norflurazon sur les feuilles de soja et leur métabolisme lipidique peut être assimilé à une sénescence. Dans les feuilles d'orge, Gut et Matile (1989) et dans

celles de tabac, Koiwai et *al.*, (1981) ont montré une réduction des galactolipides accompagnée d'une augmentation de PC enrichie en résidus 18:3/18:3 a été observée. Selon Wanner et *al.*, (1991), le MGDG serait converti en DAG lui même converti en PC.

Dans les feuilles de soja, le norflurazon induit donc une variation dans la composition en glycérolipides qui peut découler de la diminution ou de l'inhibition de la biosynthèse de différentes classes lipidiques et/ou de l'accélération de leur dégradation. Le norflurazon engendre une sérieuse altération des galactolipides et une augmentation des phospholipides extrachloroplastiques ainsi que des lipides neutres.

De plus le norflurazon entraîne une diminution du degré d'insaturation des lipides chloroplastiques suite à l'inhibition de la synthèse des acides gras insaturés et des activités désaturases ou à des activations des mécanismes de dégradation..

La réduction des lipides membranaires et l'altération de leur composition avec une tendance vers la saturation peut bloquer l'habilité de la plante à optimiser la fluidité et le fonctionnement des membranes. Ce changement dans la composition en lipides peut intervenir dans la réponse des plantes aux températures extrêmes (Scalla, 1991).

# Effet du norflurazon sur la biosynthèse des lipides foliaires du soja

Les résultats précédents montrent que le norflurazon à la dose  $10^{-4}\text{M}$  diminue la masse des lipides totaux dans les feuilles de soja, réduit les acides gras insaturés dans les lipides du compartiment chloroplastique et augmente au contraire l'insaturation des phospholipides du compartiment extra-chloroplastique. Dans cette partie du travail, la fourniture du  $[1-^{14}\text{C}]$  acétate qui permet de suivre la biosynthèse *de novo* des acides gras va permettre de mieux appréhender l'effet du norflurazon sur la biosynthèse des lipides foliaires du soja.

### 1- Effet sur l'incorporation du $[1-^{14}\text{C}]$ acétate dans les lipides foliaires du soja.

Les courbes de cinétique d'incorporation du  $[1-^{14}\text{C}]$  acétate, dans les lipides foliaires des plantules de soja témoins et traitées par le norflurazon  $10^{-4}\text{M}$  (Fig. 43), montrent une certaine ressemblance, avec cependant une réduction de la quantité de lipides radioactifs sous l'effet de l'herbicide et ceci pour tous les temps de marquage.

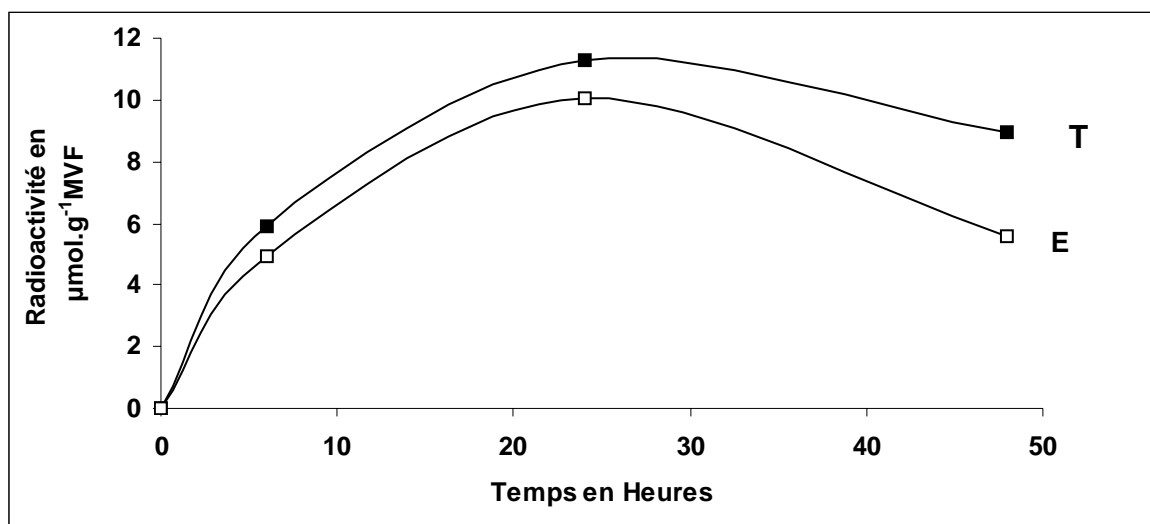


Figure 43 : Effet du norflurazon sur la cinétique d'incorporation du  $[1-^{14}\text{C}]$  acétate dans les lipides foliaires du soja. (Radioactivité incorporée en  $\mu\text{moles.g}^{-1}\text{MVf}$ ).

En effet, la radioactivité augmente rapidement dans les lipides des feuilles des plantules témoins et traitées pendant les premières heures de marquage atteignant après 6 heures de marquage  $5.93 \mu\text{mol.g}^{-1}\text{MVf}$  dans les feuilles témoins et  $4.95 \mu\text{mol.g}^{-1}\text{MVf}$  dans les feuilles traitées soit respectivement 29% et 24% de la radioactivité déposée.

La radioactivité augmente lentement à  $11.3 \mu\text{mol.g}^{-1}\text{MVf}$  et  $10 \mu\text{mol.g}^{-1}\text{MVf}$  à 24 heures ce qui correspond à des taux de 56% et 50% de lipides radioactifs respectivement dans les plantules témoins et traitées. Au delà de 24 heures, la radioactivité décline chutant à  $9 \mu\text{mol.g}^{-1}\text{MVf}$  et  $5.6 \mu\text{mol.g}^{-1}\text{MVf}$  soit 44% et 27% de la radioactivité déposée respectivement dans les plantules témoins et les plantules traitées par l'herbicide.

Le norflurazon dans une première phase (entre 0 heures et 24 heures) réduit de 14% la quantité de lipides radioactifs dans les feuilles de soja freinant ainsi l'acide gras synthétase enzyme clef de la biosynthèse des lipides.

Dans une deuxième phase (au delà de 24 heures), le pourcentage de réduction des lipides foliaires radioactifs par le norflurazon est de 40% ; cette diminution résulte non seulement du ralentissement de leur biosynthèse mais plus particulièrement de l'accélération de leur dégradation.

## 2 - Effet sur l'incorporation du [1-<sup>14</sup>C] acétate dans les acides gras des lipides foliaires.

La figure 44, représente l'évolution de l'incorporation du [1-<sup>14</sup>C] acétate dans les acides gras des lipides foliaires des plantules témoins et traitées.

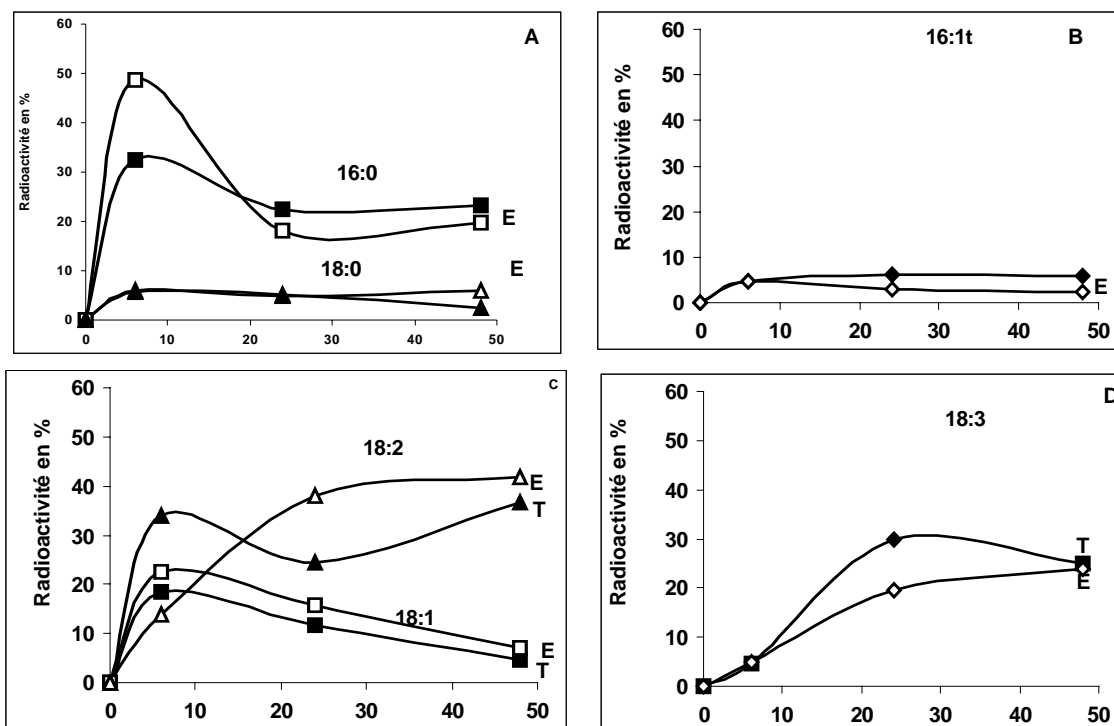


Figure 44 : Effet du norflurazon sur la cinétique d'incorporation du [1-<sup>14</sup>C] acétate dans les acides gras totaux des feuilles de soja. (Radioactivité incorporée en %).

Après 6 heures de marquage, le norflurazon semble favoriser la formation de l'acide palmitique dont le taux de radioactivité est plus important dans les feuilles de plantules traitées. Au delà la proportion de cet acide gras est plus réduite sous l'effet de l'herbicide.

Le taux d'acide stéarique ne varie pratiquement pas sous l'effet du norflurazon (Fig. 44A).

Après 6 heures de marquage, les proportions d'acide  $\Delta^3$  trans-hexadécénoïque sont les mêmes dans les plantules témoins et les plantules traitées ; par la suite le taux d'acide trans hexadécénoïque radioactif est plus réduit dans les plantules traitées (Fig. 44B).

Le taux d'acide oléique radioactif est plus élevé dans les feuilles des plantules traitées pendant toute la durée du marquage (Fig. 44C). Cette augmentation peut provenir d'une stimulation de la synthèse de cet acide gras par la stéaroyl désaturase et/ou d'une réduction de la formation de l'acide linoléique.

Pour les temps courts (6 heures), le taux d'acide linoléique radioactif est plus important dans les plantules témoins, par la suite, le norflurazon élève la proportion de cet acide gras dans les plantules traitées (Fig. 44C).

L'acide linoléique est en proportions égales dans les plantules témoins et les plantules traitées en début de marquage, au bout de 24 heures sa formation semble réprimée par l'herbicide qui réduit son taux de 35% comparativement au témoin. Au delà, le taux d'acide linoléique est sensiblement le même dans les feuilles des plantules témoins et les feuilles des plantules traitées par le norflurazon (Fig. 44D).

Dans les lipides foliaires des plantules traitées, les acides gras saturés radioactifs sont plus représentés que les acides gras insaturés après 6 heures de marquage (Fig. 44') contrairement à ce qui est observé dans les plantules témoins. Au delà, les proportions d'acides gras saturés sont légèrement plus faibles dans les feuilles des plantules traitées et celles des acides gras insaturés sont légèrement plus élevées dans les plantules traitées.

La formation des acides gras insaturés semble donc freinée par le norflurazon pendant les 6 premières heures de marquage, elle devient légèrement stimulée par la suite (cette stimulation concernant surtout la formation des acides oléique et linoléique).

### **3 - Effet sur l'incorporation du [1-<sup>14</sup>C] acétate dans les lipides polaires les lipides neutres.**

La figure 45, montre la formation des lipides polaires et des lipides neutres radioactifs dans les feuilles de plantules de soja témoins et traitées par le norflurazon.

Pendant toute la durée du marquage, la radioactivité dans les lipides polaires des plantules traitées est plus faible que celle retrouvée dans ceux des plantules témoins. Les pourcentages de réduction par rapport aux plantules témoins sont 17%, 24% et 36% respectivement après 6 heures, 24 heures et 48 heures de marquage.

La formation des lipides neutres radioactifs est pratiquement la même dans les feuilles des plantules témoins et les feuilles des plantules traitées après 6 heures de marquage. Après 24 heures, le norflurazon favorise la formation des lipides neutres dont la quantité est doublée dans les feuilles des plantules traitées. Au delà de 24 heures, les lipides neutres radioactifs sont légèrement plus réduits dans les feuilles des plantules traitées.

Entre 6 heures et 24 heures, le norflurazon réduit la synthèse des lipides polaires et favorise la synthèse des lipides neutres. Au delà de 24 heures, le norflurazon semble plutôt accélérer la dégradation de tous les lipides radioactifs (polaires et neutres), leur quantité étant plus faible dans les plantules traitées.

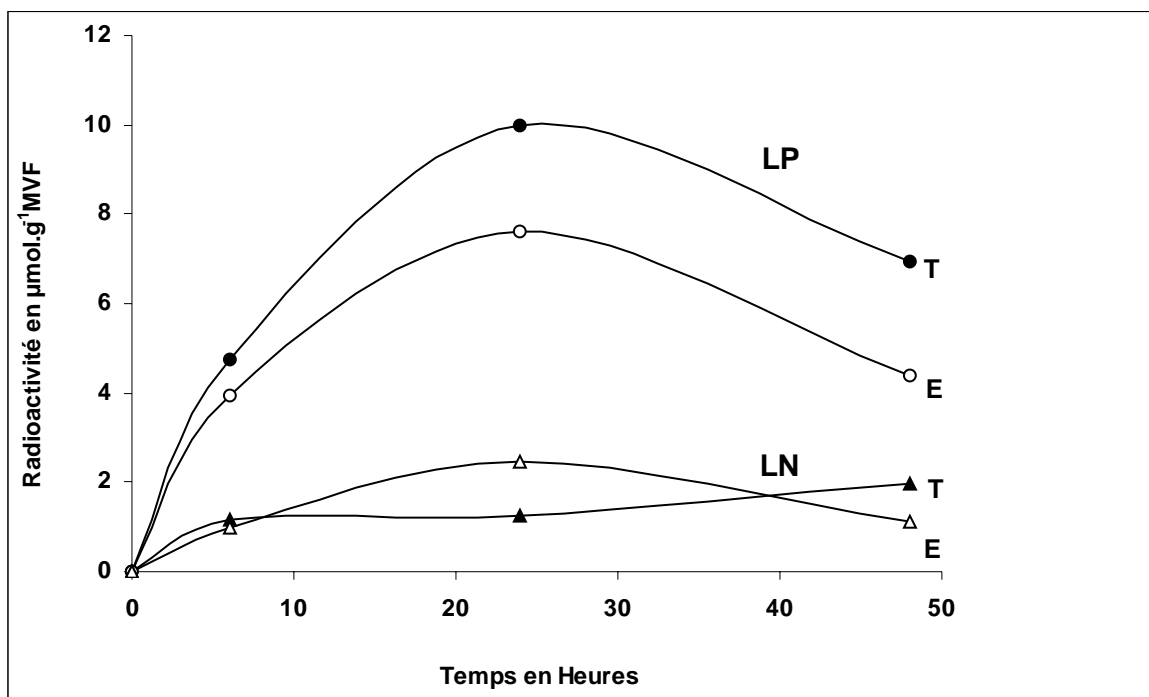


Figure 45 : Effet du norflurazon sur l'incorporation du [1-<sup>14</sup>C] acétate dans les lipides polaires (LP) et les lipides neutres (LN) des feuilles de soja. (Radioactivité incorporée en  $\mu\text{moles.g}^{-1}$  MVF).

#### 4- Effet sur l'incorporation du [1-<sup>14</sup>C] acétate dans les lipides des membranes chloroplastiques

La figure 46, montre l'effet du norflurazon sur la biosynthèse des lipides des membranes du chloroplaste.

Le norflurazon diminue la synthèse du MGDG dans les feuilles des plantules traitées dès les temps courts de marquage : la radioactivité dans le MGDG des plantules témoins est de  $0.42 \mu\text{mol.g}^{-1}$  MVF contre  $0.30 \mu\text{mol.g}^{-1}$  MVF dans le MGDG des plantules traitées soit 28% de réduction. L'effet retardant du norflurazon sur la biosynthèse du MGDG est maximum après 24 heures de marquage où l'on note une diminution du MGDG radioactif dans les feuilles des plantules traitées de 67% comparativement aux plantules témoins. Après 48 heures de marquage, l'effet de l'herbicide est atténué : le pourcentage de réduction du MGDG radioactif n'est plus que de 21% (Fig. 46A).

La formation du DGDG radioactif est également entravée par le norflurazon et ceci pour tous les temps de marquage avec un effet maximum dès 6 heures de marquage : en effet, la radioactivité dans le DGDG des plantules témoins est de  $0.38 \mu\text{mol.g}^{-1}$  MVF,  $0.41 \mu\text{mol.g}^{-1}$  MVF et  $0.38 \mu\text{mol.g}^{-1}$  MVF respectivement après 6 heures, 24 heures et 48 heures de marquage ; elle est de  $0.23 \mu\text{mol.g}^{-1}$  MVF,  $0.33 \mu\text{mol.g}^{-1}$  MVF et  $0.34 \mu\text{mol.g}^{-1}$  MVF dans les plantules traitées soit une réduction du DGDG radioactif de 40%, 19% et 10% respectivement après 6 heures, 24 heures et 48 heures de marquage sous l'effet du norflurazon (Fig. 46B).

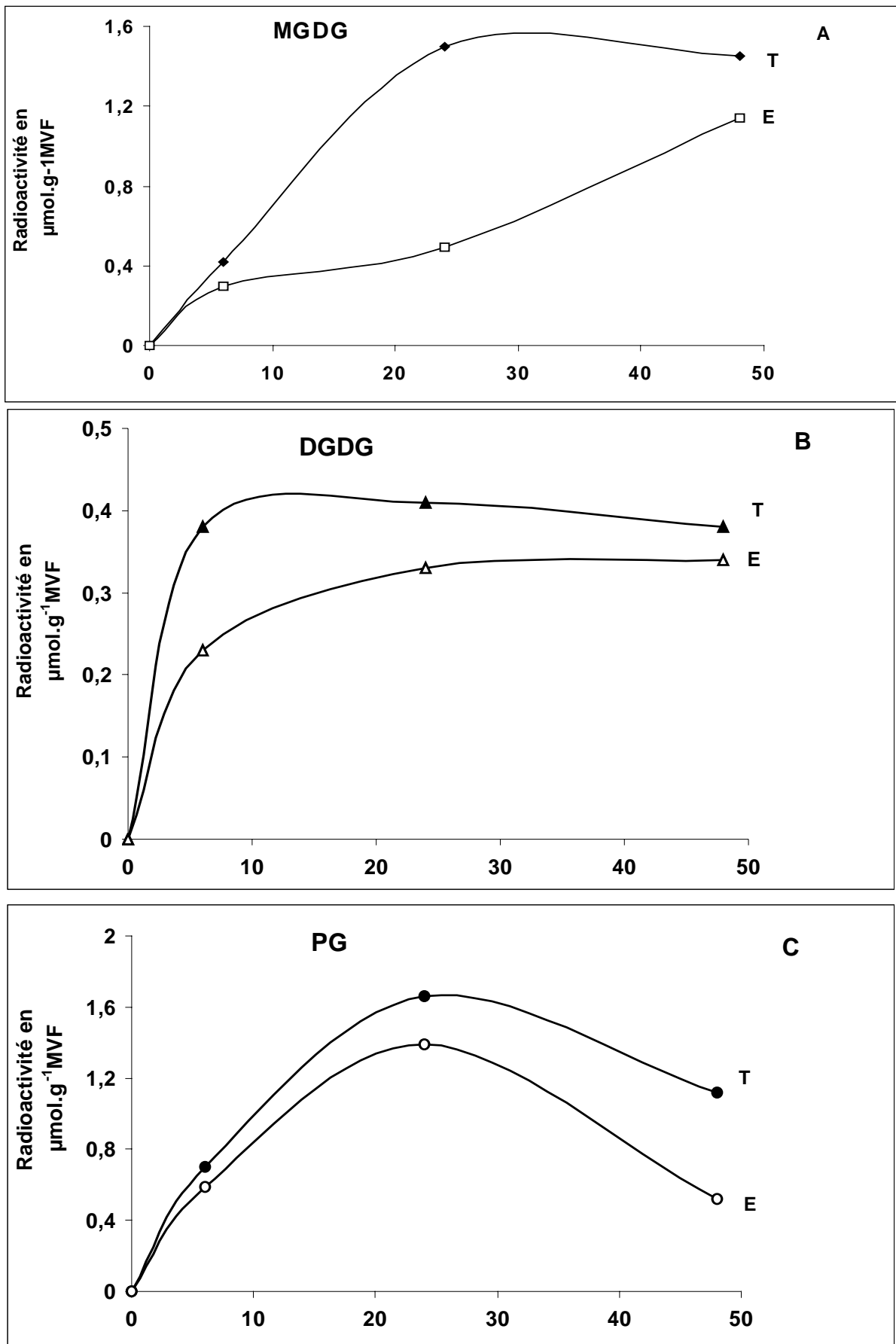


Figure 46 : Effet du norflurazon sur la cinétique d'incorporation du [1-14C] acétate dans les lipides chloroplastiques des feuilles de soja.

La cinétique de la formation du PG radioactif dans les plantules témoins et dans les plantules traitées (Fig. 46C), montre que le norflurazon diminue la formation du PG radioactif entre 0 heure et 24 heures de marquage avec des pourcentages de réduction de 16% et 20% comparativement aux plantules témoins. Au delà de 24 heures, le norflurazon accélère plutôt la dégradation du PG radioactif qui est réduit de 54% dans les plantules traitées.

Les proportions relatives des lipides polaires radioactifs du compartiment chloroplastique sont consignées dans le tableau XXVIII.

Tableau XXVIII : Effet du norflurazon sur la répartition de la radioactivité dans les lipides chloroplastiques après marquage au [1-<sup>14</sup>C] acétate. (Radioactivité en % de la radioactivité des lipides polaires).

Classes lipidiques		6 h	24 h	48 h
<b>MGDG</b>	<b>T</b>	9.8	15.8	21.6
	<b>E</b>	7.8	6.7	21.6
<b>DGDG</b>	<b>T</b>	8.4	4.1	4.9
	<b>E</b>	6.0	4.6	6.4
<b>PG</b>	<b>T</b>	15.0	17.4	16.6
	<b>E</b>	15.5	19.4	12.2

Le norflurazon réduit les proportions du MGDG pendant les premières 24 heures de marquage en effet après cette période, le taux de MGDG radioactif est réduit de 64% (ce taux passe de 15.8% dans les feuilles des plantules témoins à 6.7% dans les feuilles des plantules traitées). Après 48 heures de marquage, la proportion de MGDG est sensiblement la même dans les deux types de plantules.

Le niveau de DGDG radioactif est légèrement réduit dans les plantules traitées après 6 heures de marquage (il est à un taux de 8.4% dans les témoins contre 6% dans les plantules traitées). Au delà la proportion de DGDG radioactif est légèrement plus élevée dans les plantules traitées.

Les proportions de PG radioactif sont presque les mêmes dans les plantules témoins et les plantules traitées jusqu'à 24 heures de marquage, par la suite le PG radioactif est à un taux légèrement plus réduit dans les plantules traitées.

Les membranes plastidiales sont composées d'un ensemble de pigments et de protéines associées à la matrice lipidique. Il est donc clair que la perturbation dans la composition en lipides de ces membranes engendrée par le traitement herbicide va modifier non seulement leur structure mais également leur fonctionnement.

### **5- Effet sur l'incorporation du [1-<sup>14</sup>C] acétate dans les lipides des membranes extrachloroplastiques**

Dans les plantules traitées (Fig. 47A), le norflurazon réduit la synthèse de la PC radioactive pendant les premières 24 heures de marquage, les pourcentages de

réduction étant de 19% et 22.5% respectivement après 6 heures et 24 heures de dépôt du précurseur radioactif. Entre 24 heures et 48 heures de marquage, le norflurazon accentue la réduction de PC radioactif (51 % de réduction) en accélérant probablement les processus de turn over de ce phospholipide.

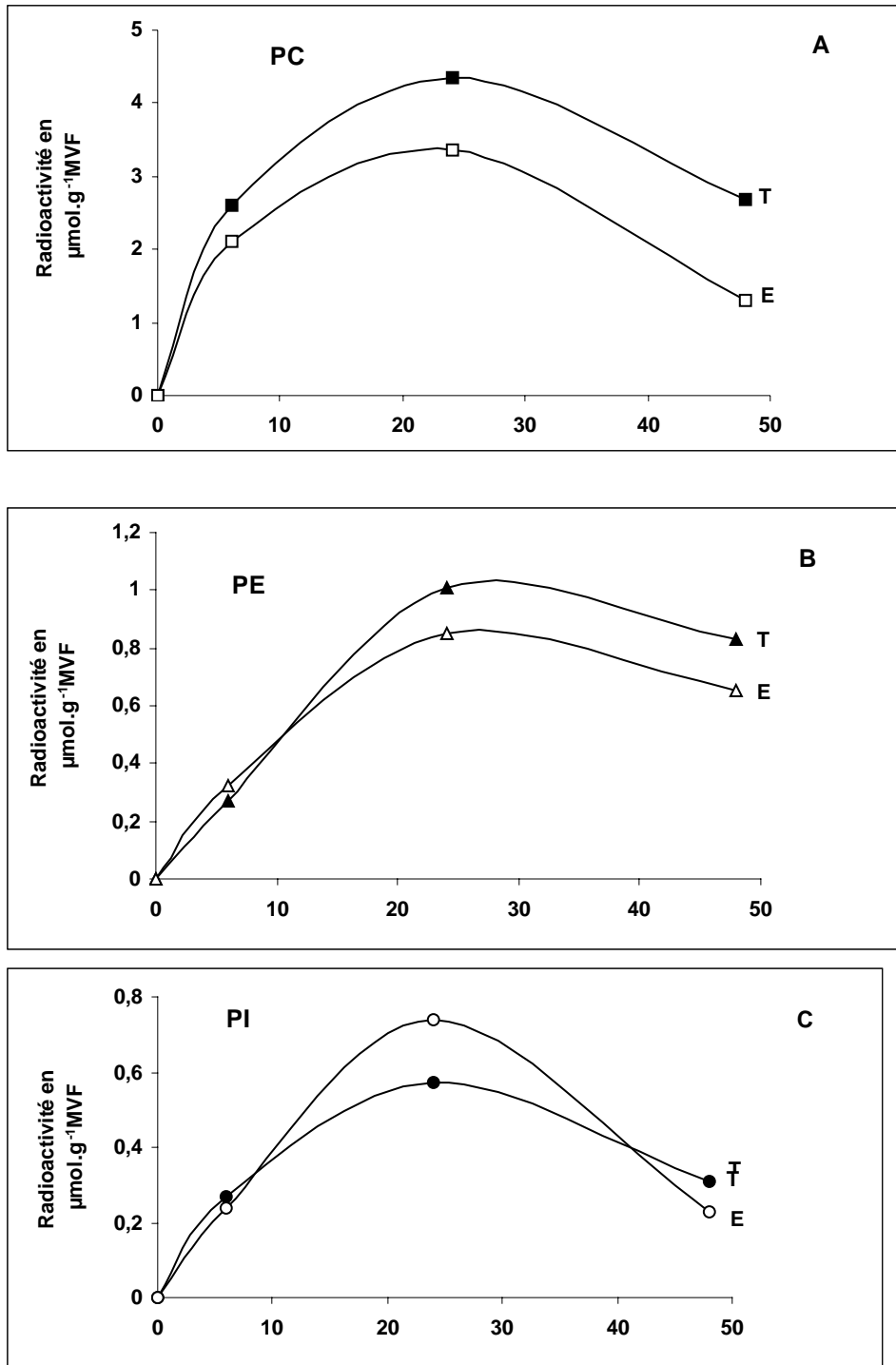


Figure 47 : Effet du norflurazon sur la cinétique d'incorporation du  $[1-^{14}\text{C}]$  acétate dans les phospholipides extrachloroplastiques des feuilles de soja. (Radioactivité incorporée en  $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{MVF}$ ).

La formation de la PE radioactive (Fig. 47B) ne semble pas influencée par l'herbicide en début de marquage (6 heures), au delà la PE radioactive est plus réduite dans les plantules traitées : les pourcentages de diminution sont de 15% et 24% après 24 heures et 48 heures de marquage.

Pour les temps courts de marquage (6 heures), la synthèse du PI paraît identique dans les plantules témoins et les plantules traitées. Après 24 heures de marquage, le norflurazon augmente la formation du PI radioactif (Fig. 47C) (30% d'augmentation par rapport au témoin) ; au delà, comme pour les autres phospholipides, le norflurazon accélère la dégradation du PI radioactif qui est réduit de 22% par rapport aux plantules témoins.

Le tableau XXIX, comporte les proportions relatives des phospholipides radioactifs du compartiment extrachloroplastique.

En valeur relative, la PC est la classe lipidique la plus radioactive aussi bien dans les plantules témoins que dans les plantules traitées. Les proportions de cette classe lipidique sont sensiblement les mêmes dans les deux types de plantules après 6 heures de marquage ; au delà, le taux de PC radioactif est légèrement plus réduit dans les plantules traitées.

Les taux de PE et de PI sont légèrement plus élevés dans les plantules traitées pour tous les temps de marquage.

Tableau XXIX : Effet du norflurazon sur la répartition de la radioactivité dans les lipides extrachloroplastiques après marquage au [1-<sup>14</sup>C] acétate. (Radioactivité en % de la radioactivité des lipides polaires).

Classes lipidiques		6 h	24 h	48 h
<b>PC</b>	<b>T</b>	55.2	45.5	39.6
	<b>E</b>	55.3	47.0	36.9
<b>PE</b>	<b>T</b>	5.8	10.7	12.3
	<b>E</b>	8.4	11.8	16.6
<b>PI</b>	<b>T</b>	5.8	5.9	4.7
	<b>E</b>	6.0	10.4	5.6

Les figures 46 et 47, montrent que le norflurazon diminue la biosynthèse de pratiquement tous les lipides polaires radioactifs pendant les premières 24 heures de marquage, avec un effet prononcé sur la formation du MGDG radioactif qui est réduit de 67% après 24 heures, les autres lipides polaires radioactifs étant réduits en moyenne de 20 à 30%.

Au delà de 24 heures, le norflurazon réduit tous les lipides polaires radioactifs et plus particulièrement les phospholipides en accélérant probablement leur dégradation avec un effet plus prononcé sur le PG qui est réduit de moitié.

## 6- Effet sur l'incorporation du [1-<sup>14</sup>C] acétate dans les acides gras des lipides des membranes chloroplastiques.

### 6.1 - Acides gras du MGDG

La figure 48, représente l'effet du norflurazon sur l'incorporation du [1-<sup>14</sup>C] acétate dans les acides gras du MGDG.

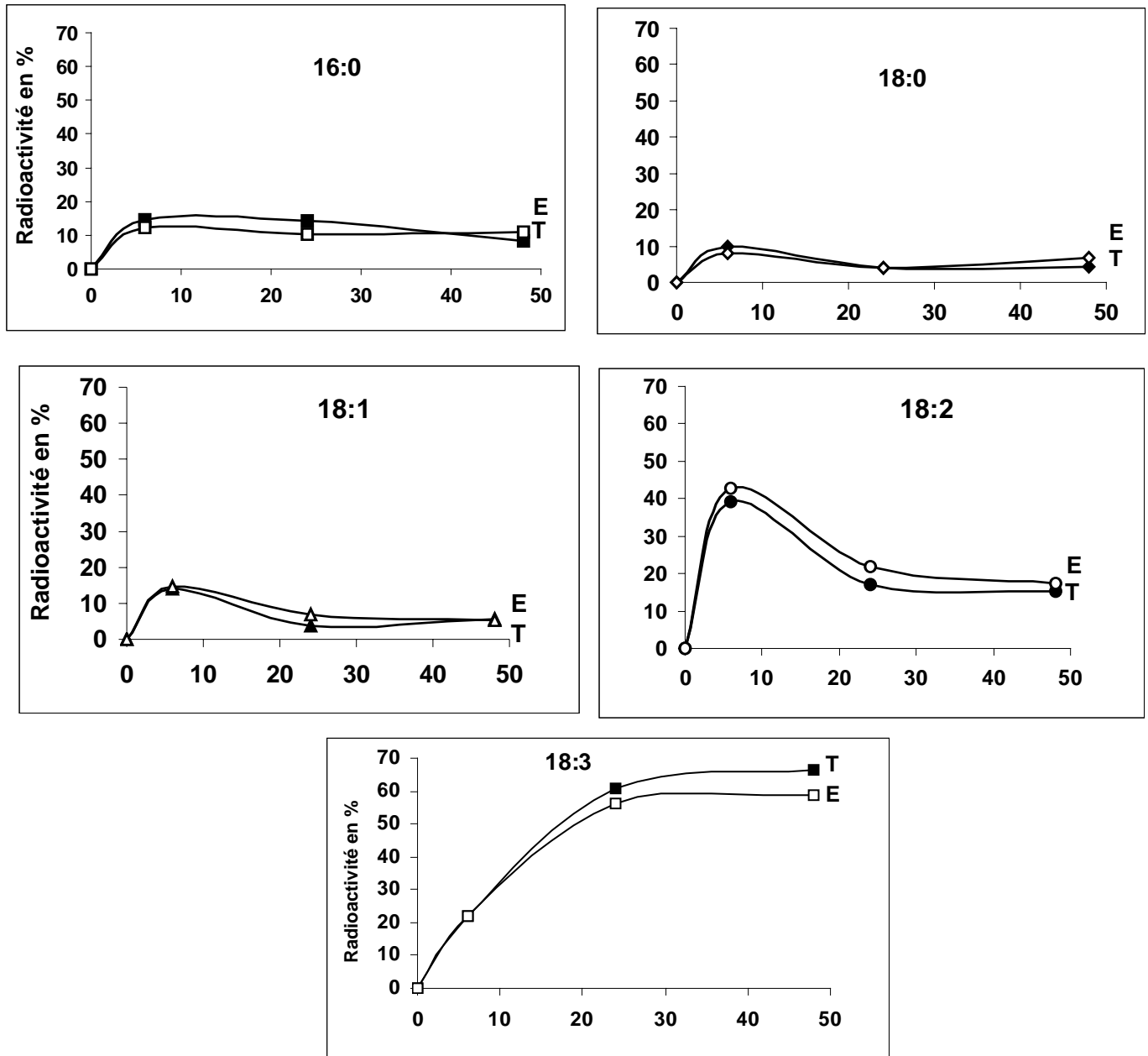


Figure 48 : Effet du norflurazon sur la cinétique d'incorporation du [1-<sup>14</sup>C] acétate dans les acides gras du MGDG des feuilles de soja. (Radioactivité incorporée en %).

Les proportions des acides gras saturés radioactifs (acides palmitique et stéarique) varient très peu sous l'effet du norflurazon.

Concernant les acides gras insaturés, l'acide oléique radioactif est en proportions quasi égales dans les plantules témoins et les plantules traitées.

L'acide linoléique radioactif est plus représenté dans les plantules traitées et ceci pour tous les temps de marquage alors que le taux d'acide linoléique radioactif est plus réduit sous l'effet de l'herbicide après 24 heures et 48 heures de marquage.

Les indices de désaturation de l'oléate et du linoléate (Tab. XXX), sont les mêmes après 6 heures de marquage pour les plantules témoins et celles soumises à l'herbicide. Les variations apparaissent après 24 heures et 48 heures de marquage.

Ainsi l'indice de désaturation de l'oléate est réduit presque de moitié après 24 heures puis il redevient identique à celui des témoins après 48 heures de marquage.

L'indice de désaturation du linoléate est légèrement réduit après 24 heures et 48 heures de marquage dans les plantules traitées.

Tableau XXX : Indice de désaturation des acides gras dans le MGDG après marquage au [1-<sup>14</sup>C] acétate : effet du norflurazon.

<b>Indice de désaturation</b>	<b>6 h</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	
<b>18 :2+18 :3/18 :1</b>	<b>T</b>	4.42	20.4	14.85
	<b>E</b>	4.40	11.6	14.41
<b>18 :3/18 :2</b>	<b>T</b>	0.56	3.58	4.37
	<b>E</b>	0.51	2.59	3.47

Dans les temps courts (6 heures), le norflurazon ne semble pas affecter les désaturases liées au MGDG. Pour des temps plus longs de marquage, le norflurazon réduit les activités de désaturation de l'oléate (quoique à 48 heures, l'indice de désaturation de l'oléate est le même dans les deux types de plantules) et du linoléate liées au MGDG.

## **6.2 - Effet sur la biosynthèse des espèces moléculaires du MGDG**

Sous l'effet du norflurazon (Fig. 49), la biosynthèse de l'espèce moléculaire majoritaire 18:3/18:3 MGDG diminue pour tous les temps de marquage. Dès 6 heures, cette espèce moléculaire qui représente 78.2% dans les plantules témoins n'est qu'à un taux de 59.6% dans les plantules traitées soit une réduction de 24% sous l'effet de l'herbicide. Cette réduction est maintenue jusqu'à 48 heures où l'on enregistre une réduction de 30% par rapport au témoin.

La proportion de l'espèce moléculaire radioactive 18:2/18:3 précurseur immédiat de l'espèce 18:3/18:3 augmente sous l'effet de l'herbicide et cela dès 6 heures de marquage ce qui traduit une inhibition du passage de l'espèce 18 :2/18 :3 vers l'espèce moléculaire 18 :3/18 :3.

L'espèce moléculaire 18:2/18:2 est également accumulée sous l'effet de l'herbicide de même que l'espèce moléculaire 18:1/18:2  
 La proportion de l'espèce moléculaire 18:1/18:3 n'est pratiquement pas modifiée sous l'effet du norflurazon.

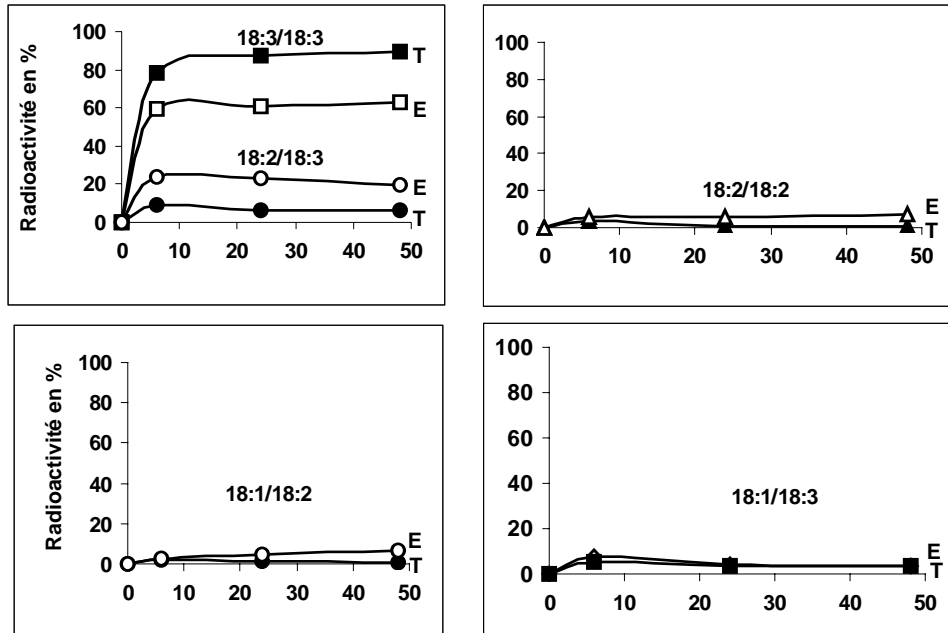
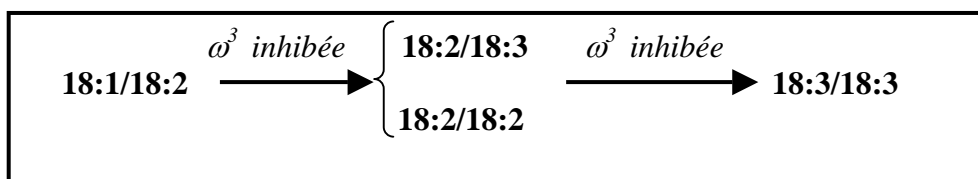


Figure 49 :Effet du norflurazon sur l'incorporation du [1-<sup>14</sup>C] acétate dans les espèces moléculaires du MGDG des feuilles de soja. (Radioactivité incorporée en %).

Ces résultats confirment les indices de désaturation des oléate et linoléate et montrent une inhibition de la désaturation des espèces moléculaires à résidu oléique et linoléique en espèces moléculaires à résidus linoléique et linoléique au niveau du MGDG.



### 6.3 – Acides gras du DGDG

Dans le DGDG (Fig. 50), le norflurazon modifie de façon variable les taux d'acides gras radioactifs. Ainsi, l'acide palmitique radioactif ne présente pas de grandes variations de son pourcentage de radioactivité entre les plantules témoins et les plantules stressées.

Le taux d'acide oléique radioactif augmente légèrement chez les plantules stressées après 6 heures et 24 heures de marquage mais après 48 heures il est en proportions égales dans les plantules témoins et les plantules traitées.

L'acide linoléique radioactif diminue sous l'effet du norflurazon pendant les premières 24 heures de marquage, au delà, il semble s'accumuler sous l'effet du norflurazon suite probablement à sa non transformation en acide linoléique.

En effet l'acide linoléique radioactif, dont le taux est presque égal à celui du DGDG des plantules témoins jusqu'à 24 heures de marquage, est moins bien représenté chez les plantules stressées après 48 heures de marquage, le pourcentage de réduction étant de 20% par rapport aux plantules témoins.

Dans le DGDG, le norflurazon semble également diminuer la proportion de linoléate, l'action étant nette à 48 heures de marquage.

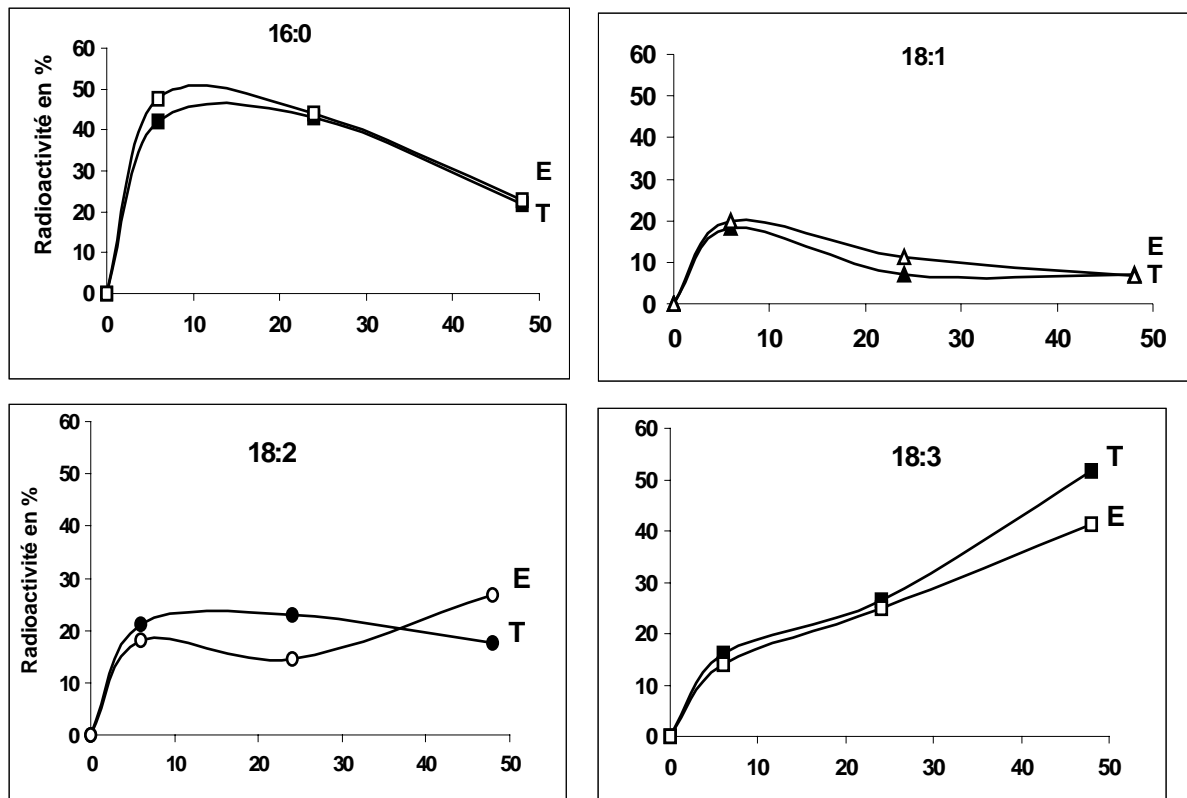


Figure 50 : Effet du norflurazon sur la cinétique d'incorporation du  $[1-^{14}\text{C}]$  acétate dans les acides gras du DGDG des feuilles de soja. (Radioactivité incorporée en %).

#### 6.4 – Acides gras du PG

Après 6 heures de marquage (Fig. 51), une légère diminution est décelée dans le pourcentage d'acide palmitique radioactif des plantules traitées contre une augmentation du taux d'acide trans hexadécénoïque radioactif ; entre 24 heures et 48 heures, l'acide palmitique présente une augmentation de son pourcentage de radioactivité (+ 22 % et + 7 % respectivement) sous l'effet du norflurazon contre une diminution du pourcentage de radioactivité de l'acide transhexadécénoïque (- 45 % et - 18 % respectivement).

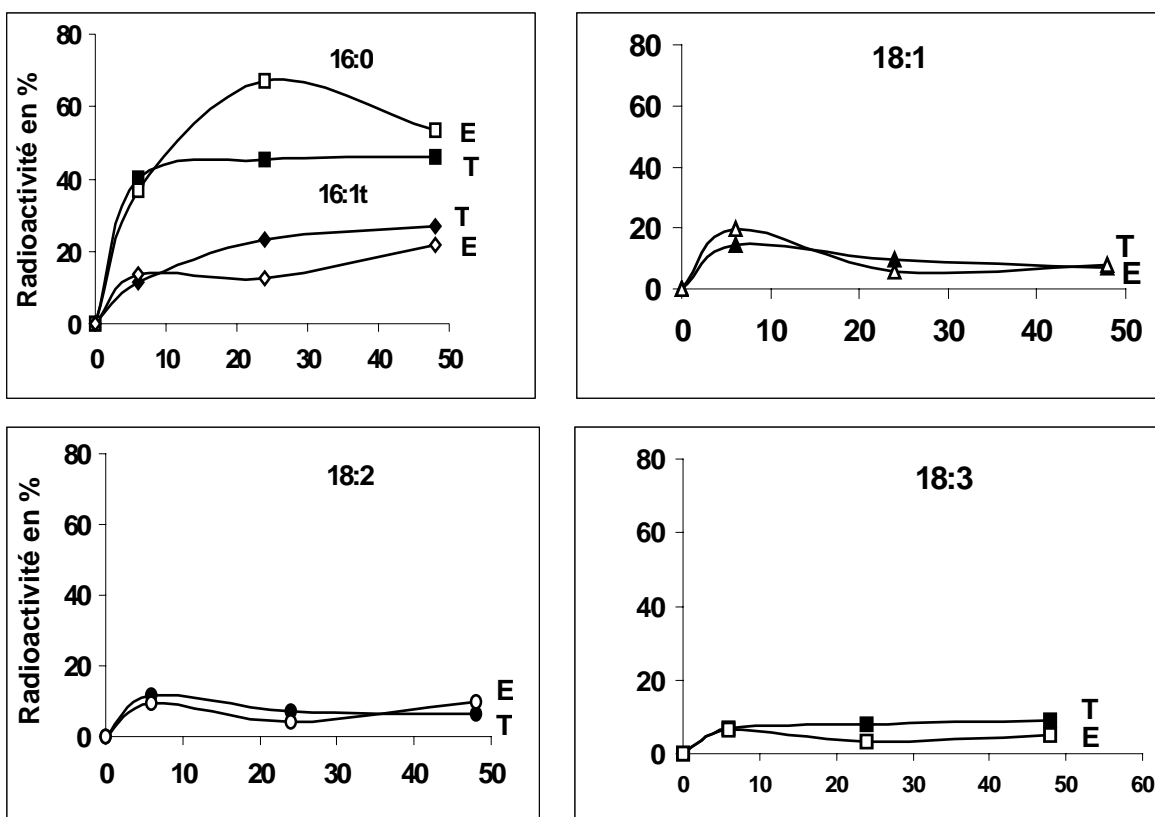


Figure 51 : Effet du norflurazon sur l'incorporation du [1-<sup>14</sup>C] acétate dans les acides gras du PG des feuilles de soja. (Radioactivité incorporée en %).

L'indice de désaturation du C16 :0 en C16 :1t ( Tab. XXXI) diminue dans les plantules traitées ; cette diminution est très prononcée après 24 heures de marquage, ce qui traduit une inhibition de la  $\Delta^3$  trans désaturase liée à ce phospholipide chloroplastique.

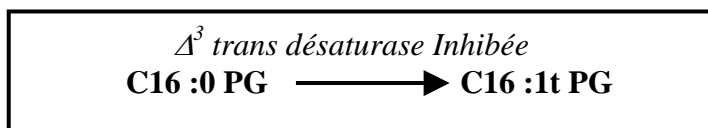


Tableau XXXI : Indice de désaturation des acides gras dans le PG des feuilles de soja après marquage au [1-<sup>14</sup>C] acétate : effet du norflurazon.

Indice de désaturation		6 h	24 h	48 h
<b>16 :1t/16 :0</b>	<b>T</b>	28.60	51.00	58.40
	<b>E</b>	37.05	18.77	41.08
<b>18 :2+18 :3/18 :1</b>	<b>T</b>	1.29	1.54	2.15
	<b>E</b>	0.81	1.25	1.41
<b>18 :3/18 :2</b>	<b>T</b>	0.59	1.15	1.39
	<b>E</b>	0.68	0.72	0.81

Le PG est un lipide entièrement synthétisé dans le chloroplaste par la voie procaryote. Il présente des acides gras à 18 carbones en position sn-1 et des acides gras à 16 carbones en position sn-2. La présence des acides linoléique et linoléique au sein de ce phospholipide signifie qu'il est le siège des désaturations des acides oléique et linoléique.

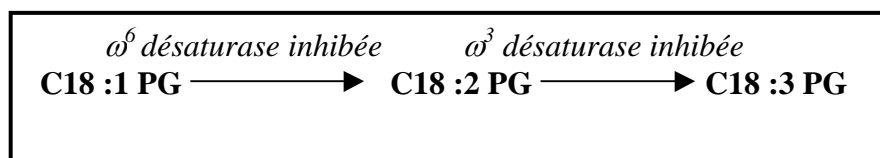
Le taux d'acide oléique radioactif lié au PG augmente légèrement après 6 heures de marquage dans les plantules traitées, puis il est réduit de 40% après 24 heures de marquage et se retrouve à des proportions quasi identiques dans les deux types de plantules après 48 heures de marquage.

La proportion d'acide linoléique est diminuée dans les plantules traitées pendant les premières 24 heures de marquage puis son taux devient plus élevé sous l'effet du norflurazon.

L'acide linoléique radioactif est plus réduit dans les plantules traitées et ceci pendant toute la durée du marquage (Fig. 51).

L'indice de désaturation de l'acide oléique est plus réduit en présence de l'herbicide pour tous les temps de marquage. Celui de l'acide linoléique est légèrement plus élevé après 6 heures de marquage puis il devient nettement plus réduit dans le PG des plantules traitées après 24 heures et 48 heures de marquage (Tab. XXXI).

Le norflurazon semble donc bloquer les oléate et linoléate désaturases ( $\omega^6$  et  $\omega^3$  désaturases) liées au PG chloroplastique.



Le norflurazon, outre son action inhibitrice sur les désaturases intervenant dans la biosynthèse des caroténoïdes, affecte également les désaturases liées au lipides des membranes chloroplastiques.

## 7 - Effet sur l'incorporation du [1-<sup>14</sup>C] acétate dans les acides gras des lipides des membranes extra-chloroplastiques.

### 7.1 – Acides gras de PC

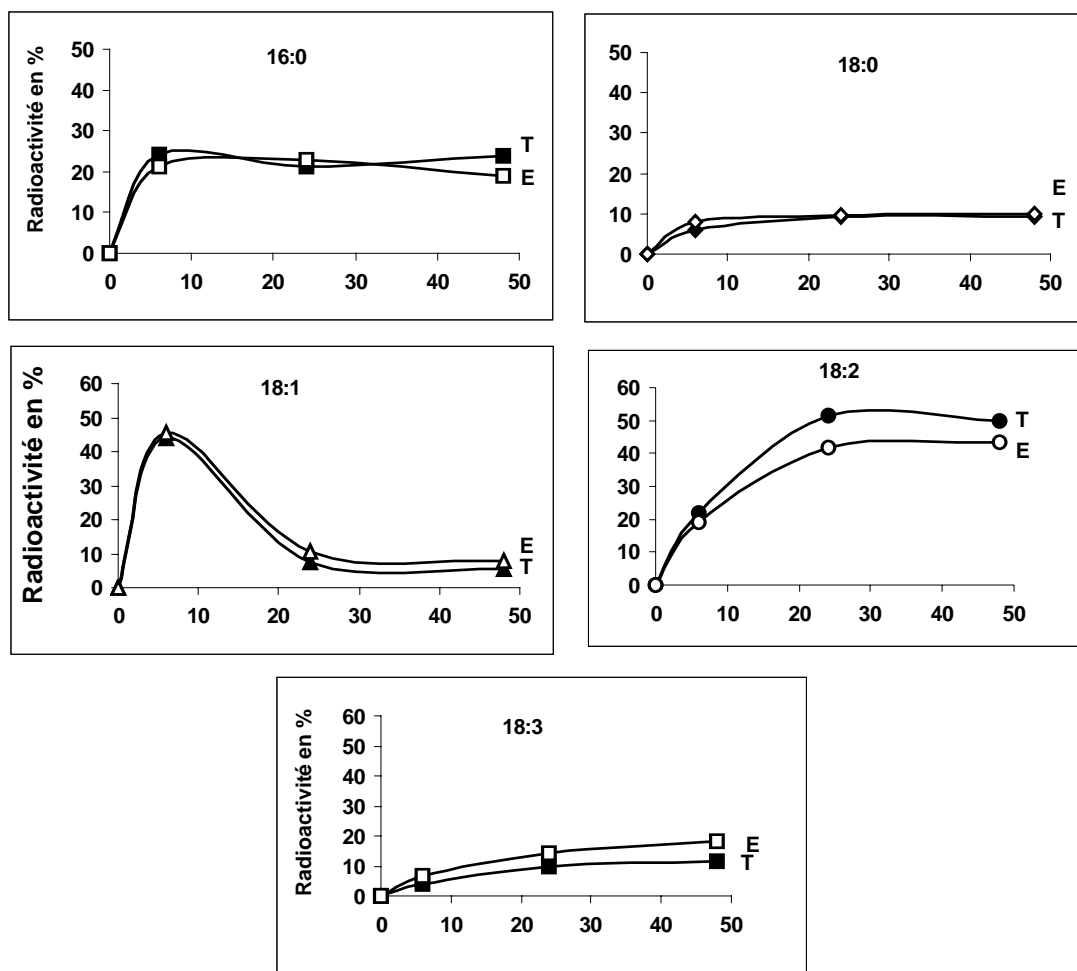


Figure 52 : Effet du norflurazon sur la cinétique d'incorporation du [1-<sup>14</sup>C] acétate dans les acides gras de PC des feuilles de soja. (Radioactivité incorporée en %).

Dans PC (Fig. 52), les acides gras saturés radioactifs (acides palmitique et stéarique) varient légèrement entre les plantules témoins et les stressées et ceci pour tous les temps de marquage.

Le taux d'acide oléique radioactif est presque le même dans les plantules témoins et traitées.

L'acide linoléique, acide gras le plus marqué diminue en proportions chez les plantules traitées. Les pourcentages de réduction sont de 13% ,19% et 12% comparativement aux plantules témoins.

Le taux d'acide linoléique radioactif est augmenté dans les plantules traitées pendant toute la durée du marquage, les pourcentages d'augmentation étant de 66.6%, 47% et 58.6% respectivement après 6 heures, 24 heures et 48 heures de marquage.

Le norflurazon en augmentant la proportion d'acide linoléique lié à la PC stimulerait l'activité linoléate désaturase liée à la PC. L'augmentation du linoléate lié à la PC pourrait provenir aussi du non transfert des groupements acyls de la PC vers le chloroplaste.

## 7.2 - Effet sur la biosynthèse des espèces moléculaires de PC

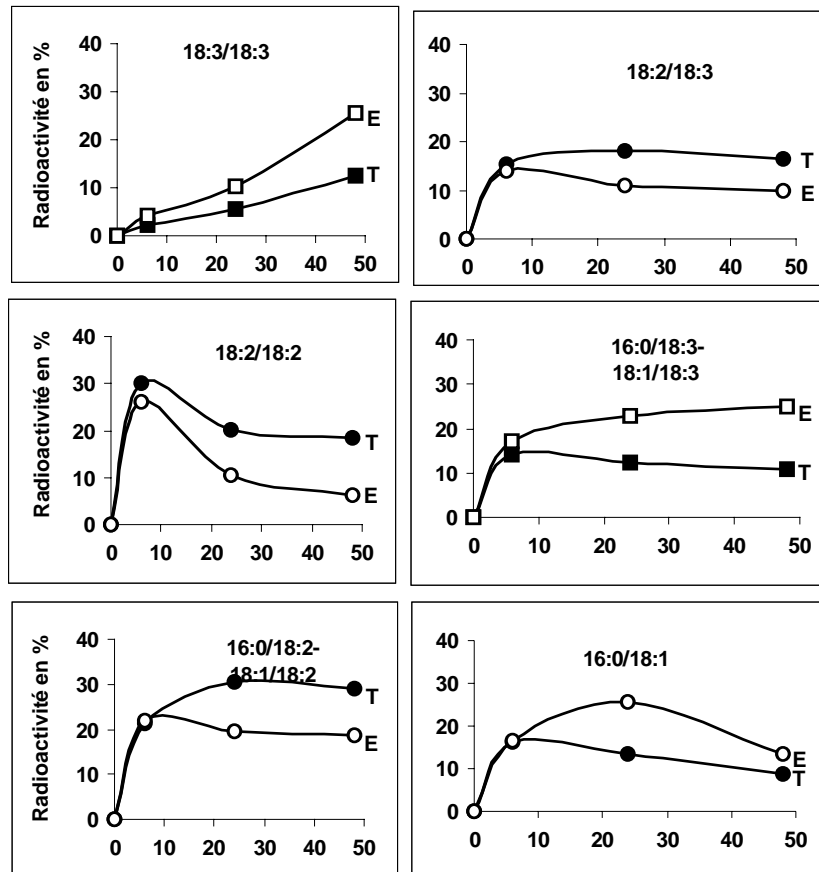


Figure 53 : Effet du norflurazon sur l'incorporation du  $[1-^{14}\text{C}]$  acétate dans les espèces moléculaires de PC des feuilles de soja. (Radioactivité incorporée en %).

Dans PC des plantes traitées (Fig. 53), le norflurazon favorise la formation de l'espèce moléculaire 18:3/18:3 radioactive pendant toute la durée du marquage. Après 48 heures de dépôt du précurseur radioactif, la proportion de cette espèce moléculaire dépasse le double de celle retrouvée dans la PC des plantes témoins. En revanche, les proportions des espèces moléculaires radioactives précurseurs à savoir 18:2/18:3 et 18:2/18:2 sont réduites dans les plantes traitées.

Un effet similaire est observé dans les mélanges d'espèces moléculaires radioactives 16:0/18:3, 18:1/18:3 dont les proportions sont plus élevées dans les plantes traitées alors que leurs précurseurs 16:0/18:2 et 18:1/18:2 présentent un pourcentage de radioactivité plus réduit sous l'effet de l'herbicide.

Ces résultats qui montrent que les espèces moléculaires les plus insaturées sont plus importantes en présence du norflurazon, suggèrent une activation par cet herbicide

de la désaturation des espèces moléculaires à résidus linoléate en espèces moléculaires à résidus linoléate.

L'espèce moléculaire radioactive 16:0/18:1 est en proportions égales dans les plantules témoins et les plantules traitées après 6 heures de marquage. Pour les temps plus longs, elle est à des taux plus élevés dans les plantules traitées ce qui traduirait un ralentissement de la désaturation de cette espèce moléculaire en produit plus insaturé.

Au niveau de PC le norflurazon agirait donc essentiellement en activant la linoléate désaturase résultat que nous avons déjà observé avec l'étude de la composition en acides gras et celle de la biosynthèse des acides gras liés à PC.

### **7.3 – Acides gras de PE**

Dans PE (Fig. 54), l'acide palmitique radioactif augmente en pourcentage chez les plantules traitées après 24 heures et 48 heures de marquage ; l'acide stéarique radioactif est moins représenté dans PE des feuilles des plantules traitées pendant les 24 premières heures de marquage. Il est en proportions égales dans les plantules témoins et traitées après 48 heures de marquage.

L'acide oléique radioactif présente un plus fort pourcentage de radioactivité chez les traitées après 6 heures de marquage mais au delà il ne présente pas de différence notable.

L'acide linoléique radioactif diminue sous l'effet du norflurazon pour tous les temps de marquage. Quant à l'acide linoléique radioactif, il est en proportions égales dans les deux types de plantules pour les temps courts de marquage (6 heures), pour des temps plus longs, il est à des taux plus élevés dans les plantules traitées.

Ce résultat est similaire à celui observé au niveau de PC. Le norflurazon semble donc diminuer le taux d'acide linoléique radioactif et augmenter celui de l'acide linoléique radioactif au niveau du PE.

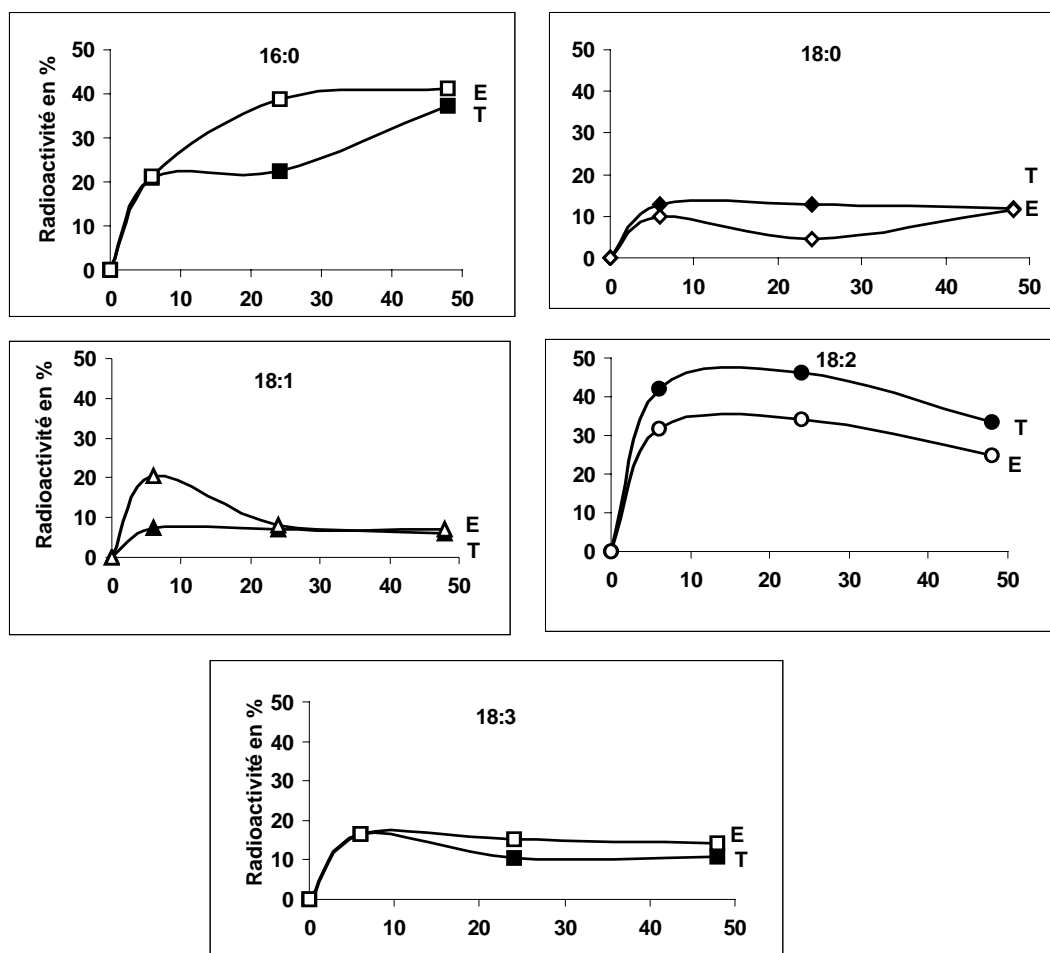


Figure 54 : Effet du norflurazon sur la cinétique d'incorporation du [1-<sup>14</sup>C] acétate dans les acides gras de PE des feuilles de soja. (Radioactivité incorporée en %).

L'augmentation de l'acide linoléique lié au PE doit provenir du pool de linoléoyl CoA dérivant de la PC (le taux d'acide linoléique radioactif lié à la PC étant rehaussé sous l'effet du norflurazon) suite à un échange d'acyls CoA (Williams et al., 2000).

### Discussion

Les expériences de marquage au [1-<sup>14</sup>C] acétate montrent que dès les temps courts de marquage (6 heures), le norflurazon réduit la radioactivité retrouvée dans la fraction lipidique totale dans les plantules traitées et cette réduction est accentuée pour les temps longs de marquage (24 heures). Le norflurazon réduit donc la synthèse *de novo* des acides gras dans le stroma des chloroplastes en inhibant les enzymes impliquées dans cette synthèse notamment l'acide gras synthétase. Rajasekharan et Sastry, (1987) ont montré que le norflurazon freine l'incorporation du [1-<sup>14</sup>C] acétate dans les lipides des disques de feuilles d'arachide et inhibe l'acide gras synthétase dans les chloroplastes isolés de ces feuilles.

Une diminution des lipides totaux des étiooplastes de feuilles d'orge traitées par le norflurazon a été également rapportée par Di Baccio *et al.*, (2002).

Au delà de 24 heures de marquage, l'incorporation de la radioactivité diminue plus rapidement dans les plantules traitées indiquant que le turn over des lipides est accéléré par l'herbicide. Le norflurazon semble agir aussi bien sur les enzymes de biosynthèse des lipides des feuilles de soja (synthèse *de novo* des acides gras) que sur celles du catabolisme des lipides (galactolipases, et phospholipases).

La biosynthèse des classes lipidiques chloroplastiques et extrachloroplastiques est entravée par l'herbicide dès 6 heures de marquage.

Le MGDG est la classe lipidique la plus affectée : après 24 heures de marquage la synthèse du MGDG radioactif est réduite de 67% dans les plantules traitées.

La réduction du niveau de MGDG radioactif peut découler de l'inhibition des enzymes impliquées dans sa biosynthèse : Il a été démontré que des stress divers pouvaient diminuer les activités de biosynthèse des galactolipides notamment le stress thermique (Aid *et al.*, 1998) et le stress hydrique (Benhassaine-Kesri *et al.*, 2002).

Des travaux récents (Miège *et al.*, 1999) ont rapporté que le MGDG peut être synthétisé par une famille multigénique de MGDG synthétases. La forte réduction de la biosynthèse du MGDG observée en présence du norflurazon présume de l'inhibition des différentes enzymes impliquées dans sa biosynthèse.

Dans le compartiment chloroplastique, outre l'inhibition de la synthèse du MGDG par le norflurazon, la synthèse des DGDG et PG est également réduite par l'herbicide. La biosynthèse du MGDG est plus affectée par l'herbicide que celle du DGDG ; après 24 heures de marquage, le rapport MGDG/DGDG est réduit de presque de moitié dans les plantules traitées par l'herbicide suite à la forte réduction de la synthèse du MGDG.

La diminution du niveau de biosynthèse du MGDG dans les plantes traitées par le norflurazon n'est pas suivie d'une augmentation du niveau de biosynthèse de DGDG la formation de ce dernier étant également entravée par l'herbicide bien que à un degré moindre que celle du MGDG.

Si la synthèse du DGDG dérivait exclusivement de celle du MGDG grâce à la galactolipide galactosyl transférase ou GGGT, le taux de DGDG aurait dû s'effondrer avec la même intensité que celui du MGDG.

Dormann, (2001) et Klaus *et al.*, (2002) ont montré chez *Arabidopsis* deux gènes codant pour deux DGDG synthétases DGD1 et DGD2 la première correspondant à la GGGT étant responsable de la synthèse de la fraction prédominante du DGDG retrouvé dans les membranes des chloroplastes ; La deuxième serait responsable de la synthèse du DGDG chez le mutant *dgd1* ou dans des conditions spécifiques de croissance (privation en phosphate). Le niveau de DGDG retrouvé dans les plantules traitées par le norflurazon proviendrait de cette dernière voie.

Le MGDG et le PG sont des lipides constitutifs des membranes des thylakoides, et le DGDG est surtout retrouvé dans les membranes de l'enveloppe des chloroplastes. Leur réduction témoigne de la déstructuration de ces membranes en général et des thylakoides en particulier.

Les membranes extrachloroplastiques sont également affectées par le norflurazon dans la mesure où la biosynthèse des phospholipides PC, PE et PI est également diminuée dans les plantules traitées.

A partir de 24 heures de marquage, le norflurazon accélère la dégradation des lipides foliaires en particulier PG dont le pourcentage de réduction dans les plantules traitées est supérieur à 50%.

La diminution des différentes classes lipidiques polaires radioactives dans les plantules traitées peut résulter de plusieurs mécanismes : il peut s'agir d'une inhibition par l'herbicide des diverses enzymes impliquées dans leur biosynthèse (acide gras synthétase, acylases, UDP galactose diacylglycérol transférase ou MGDG synthétase, CDP-DAG 3phosphate phosphatidyl transférase, phosphatidylglycérol phosphate phosphatase....) ou d'une réduction de l'expression des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la biosynthèse des lipides.

Cette diminution peut trouver aussi une explication dans une éventuelle activation des enzymes de dégradation (galactolipases, phospholipases, peroxydases et lipoxygénases) et/ou de l'expression des gènes codant pour ces dernières.

La diminution des lipides peut provenir aussi d'un manque d'énergie (ATP) résultant de la perturbation de la phase claire de la photosynthèse suite à la chute sévère des pigments photosynthétiques (caroténoïdes et chlorophylles).

Le norflurazon augmente la quantité de lipides neutres radioactifs après 24 heures de marquage coïncidant avec la réduction du niveau des lipides polaires radioactifs et plus spécialement du MGDG radioactif sous l'effet de l'herbicide.

Agnolucci et *al.*, (1994) ont signalé des inclusions inhabituelles observées en conditions de stress et correspondant à des corps non osmiophiles. Ces inclusions analogues aux plastoglobules extra thylakoidaux peuvent être interprétées comme des inclusions lipidiques contenant des triacylglycérols et des prényls quinones lipophyles (Steinmüller et Tevini, 1985 ; Rascio et *al.*, 1993 ; Quartacci et *al.*, 1997) dans lesquels les produits de dégradation tels les acides gras libres et les diacylglycérols résultant d'un traitement stressant sont accumulés (Navari-Izzo et *al.*, 1989).

De nombreux auteurs ( Hubac et *al.*, 1989 ; Monteiro et *al.*, 1990 ; Hamrouni et *al.*, 2001) ont déjà rapporté une augmentation des lipides neutres dans des conditions de stress, ce qui leur a fait suggérer que ces derniers peuvent constituer un mécanisme de défense des plantes face aux contraintes qui leur sont imposées.

Concernant les espèces moléculaires, dans le MGDG, le norflurazon réduit la biosynthèse de l'espèce moléculaire hexaène ou 18 :3/18 :3 MGDG de 30% et augmente les espèces moléculaires pentaène ou 18 :3/18 :2 MGDG et tétraène ou 18 :2/18 :2 MGDG ; ceci montre que ces deux dernières espèces moléculaires sont bien les précurseurs de l'espèce moléculaire 18 :3/18 :3 MGDG et que le norflurazon bloque la désaturation du C18 :2 en C18 :3 liée au MGDG catalysée par la  $\omega^3$  désaturase.

Le norflurazon diminue également la formation du C16 :1t lié au PG en inhibant la  $\Delta^3$  trans désaturase. La diminution du niveau de C16 :1t dans le PG indique que l'herbicide induit une certaine désorganisation des membranes photosynthétiques du

fait que ce lipide est impliqué dans la stabilisation de l'antenne collectrice d'énergie ou LHCI (Dubertret et *al.*, 1994 ; El Maani et *al.*, 1998).

Le norflurazon outre son effet sur la phytoène désaturase (cible primaire de l'herbicide) qui est une enzyme membranaire de l'enveloppe des chloroplastes intervenant dans la biosynthèse des caroténoïdes, agit également sur d'autres désaturases membranaires du chloroplaste dont celles intervenant dans le métabolisme des lipides.

La diminution des niveaux de C18 :3 lié au MGDG provient certainement du blocage par le norflurazon de l'enzyme  $\omega^3$  impliquée dans le mécanisme de désaturation.

La déficience en acides gras polyinsaturés des lipides des membranes des thylakoides rend le photosystème II extrêmement sensible à la photoinhibition (Kanervo et *al.*, 1995), et engendre une réduction importante de la protéine D1 suite probablement à un problème de synthèse de cette protéine.

Dans le compartiment extrachloroplastique, le norflurazon augmente le niveau de C18 :3 lié à la PC et le niveau de l'espèce moléculaire hexaène 18 :3/18 :3 liée à la PC et réduit les niveaux des espèces moléculaires moins insaturées 18 :2/18 :3 PC et 18 :2/18 :2 PC.

L'augmentation de la proportion de l'espèce moléculaire 18 :3/18 :3 PC peut résulter d'une activation de la  $\Delta^{15}$  désaturase responsable de la désaturation du C18 :2 en C18 :3 au niveau de la PC

Effet du norflurazon sur la désaturation  
*in vivo* des lipides foliaires du soja

Afin de mieux appréhender l'effet inhibiteur du norflurazon sur les activités de désaturation du compartiment chloroplastique (en particulier celles liées au MGDG) et afin de confirmer son effet stimulateur sur l'activité linoléate désaturase liée à la PC dans le compartiment extrachloroplastique, nous avons procédé à un marquage des plantules de soja au  $[1-^{14}\text{C}]$  oléate d'ammonium précurseur direct du linoléate et du linoléate.

### 1 - Effet sur l'acylation du $[1-^{14}\text{C}]$ oléate dans les lipides foliaires du soja

La cinétique d'incorporation du  $[1-^{14}\text{C}]$  oléate dans les lipides foliaires des plantules de soja (Fig. 55) montre que le précurseur est rapidement incorporé et acylé dans les lipides foliaires des plantules de soja témoins et traitées avec cependant une légère réduction de l'incorporation dans les plantules traitées.

En effet la quantité de radioactivité incorporée dans les lipides foliaires des plantules témoins est de  $6.48 \mu\text{mol.g}^{-1}$  MVF après 2 heures de marquage, celle ci augmente de façon continue atteignant  $18 \mu\text{mol.g}^{-1}$  MVF après 24 heures de dépôt du précurseur radioactif.

Dans les feuilles des plantules traitées, la quantité de radioactivité incorporée après 2 heures de marquage est de  $5 \mu\text{mol.g}^{-1}$  MVF, elle augmente tout en restant inférieure à celle des plantules témoins mais après 24 heures de marquage, la quantité de radioactivité incorporée dans les plantules traitées ( $17.6 \mu\text{mol.g}^{-1}$  MVF) est presque égale à celle des plantules témoins.

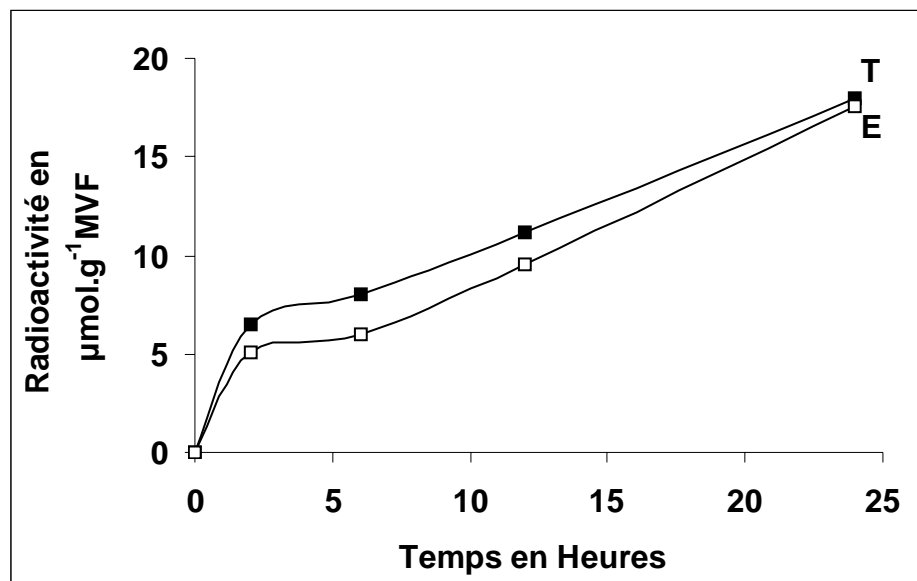


Figure 55 : Effet du norflurazon sur l'incorporation du  $[1-^{14}\text{C}]$  oléate dans les lipides foliaires du soja. (Radioactivité incorporée en  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  MVF).

En valeur relative, dès 2 heures de marquage, 32 % du précurseur radioactif sont incorporés dans les lipides totaux des feuilles des plantules témoins contre 25 % chez les plantules traitées. Après 24 heures de marquage, le taux de radioactivité retrouvé dans les lipides foliaires des plantules témoins et traitées est sensiblement le même en effet, presque toute la radioactivité déposée est retrouvée au niveau des

lipides totaux des plantules témoins et traitées à savoir 90 % et 88 % respectivement de la radioactivité totale déposée.

## 2 - Effet sur l'incorporation du [1-<sup>14</sup>C] oléate dans les acides gras des lipides foliaires du soja.

Le taux d'acide oléique radioactif retrouvé dans les lipides foliaires des plantules témoins et traitées par le norflurazon diminue en fonction du temps de marquage ce qui traduit la désaturation rapide de l'oléate en acides gras plus insaturés (Tab. XXXII).

L'activité de désaturation de l'oléate est légèrement plus importante dans les plantules traitées vu que le taux d'acide oléique radioactif retrouvé dans les lipides totaux des feuilles des plantules traitées est plus bas que celui retrouvé dans les feuilles des plantules témoins et que le taux d'acide linoléique est plus élevé dans les lipides des feuilles des plantules traitées.

L'acide linoléique représente à peu près le même pourcentage de radioactivité dans les plantules témoins et les plantules traitées jusqu'à 12 heures après le dépôt du précurseur radioactif. Par la suite, l'activité de désaturation du linoléate en linoléate est légèrement plus élevée dans les feuilles des plantules traitées : après 24 heures de dépôt du précurseur radioactif, le taux d'acide linoléique est augmenté de 14% comparativement aux plantules témoins.

Pour tous les temps de marquage, l'indice de double liaison (IDL) est légèrement plus élevé dans les plantules traitées.

Tableau XXXII : Effet du norflurazon sur l'incorporation du [1-<sup>14</sup>C] oléate dans les acides gras des lipides foliaires de soja. (Radioactivité incorporée en %).

Acides gras		2 h	6 h	12 h	24 h
<b>C18 :1</b>	<b>T</b>	89.5	65.6	54.0	53.9
	<b>E</b>	84.5	60.3	50.6	42.6
<b>C18 :2</b>	<b>T</b>	08.9	25.0	31.3	25.8
	<b>E</b>	14.3	31.5	38.2	35.1
<b>C18 :3</b>	<b>T</b>	01.5	09.3	14.6	19.8
	<b>E</b>	01.1	07.4	13.1	22.5
<b>IDL</b>	<b>T</b>	111.8	143.5	160.4	164.9
	<b>E</b>	116.4	145.5	166.3	180.3

## 3 - Effet sur l'incorporation du [1-<sup>14</sup>C] oléate dans les lipides polaires des feuilles de soja.

La figure 56A, montre l'acylation du précurseur radioactif dans les lipides polaires. Les lipides polaires radioactifs sont en proportions légèrement plus élevées dans les plantules traitées jusqu'à 12 heures de marquage ; au delà, la radioactivité incorporée est presque en proportions égales dans les plantules témoins et les plantules traitées (environ 50%).

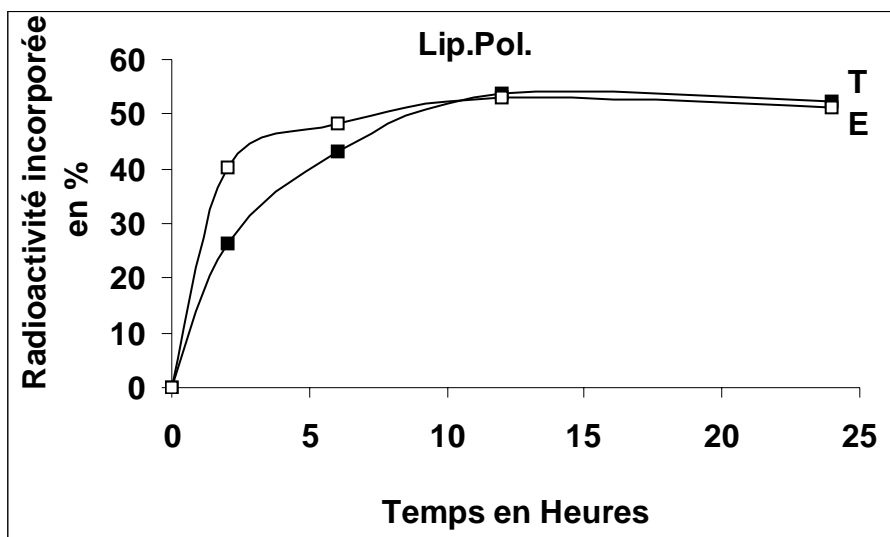


Figure 56A : Effet du norflurazon sur l'incorporation du [1-<sup>14</sup>C] oléate dans les lipides polaires (Lip.Pol.) des feuilles de soja. (Radioactivité incorporée en %).

Pour les temps courts de marquage, le norflurazon semble augmenter l'incorporation de l'oléate radioactif dans les lipides polaires et pour les temps longs, l'incorporation est la même dans les plantules témoins et les plantules traitées.

Le tableau XXXIII, montre l'effet du norflurazon sur la répartition des lipides polaires radioactifs dans les feuilles de soja après incorporation du [1-<sup>14</sup>C] oléate. La PC est la catégorie lipidique la plus radioactive de toutes les classes lipidiques pour tous les temps de marquage aussi bien dans les plantules témoins que dans les plantules traitées avec cependant un niveau de radioactivité plus élevé chez les plantules traitées.

Dès 2 heures de marquage, elle affiche 85% de la radioactivité des lipides polaires dans les plantules stressées contre 80% chez les plantules témoins.

La radioactivité liée à PC décroît en fonction du temps aussi bien chez les témoins que chez les stressées tout en demeurant plus élevée dans les plantules traitées. Le norflurazon augmente donc l'acylation du [1-<sup>14</sup>C] oléate dans les molécules de PC. PE et PI sont très faiblement marqués aussi bien dans les plantules témoins que dans les plantules traitées.

Tableau XXXIII : Effet du norflurazon sur l'incorporation du [1-<sup>14</sup>C] oléate dans les classes lipidiques polaires des feuilles de soja. (Radioactivité en % de la radioactivité des lipides polaires).

Classes lipidiques	2 h		6 h		12 h		24 h	
	T	E	T	E	T	E	T	E
PC	80.0	85.7	64.6	74.9	48.6	61.2	38.8	63.9
PE	00.3	00.5	00.6	00.9	00.8	01.1	01.0	02.0
PI	03.3	02.4	04.0	02.8	03.8	02.9	03.4	03.0
MGDG	06.3	01.0	16.6	02.5	26.9	12.9	33.5	05.7
DGDG	00.6	00.2	02.3	00.5	05.6	02.5	07.8	01.0
PG	09.5	10.2	11.9	18.4	14.3	19.4	15.5	24.4

Dans le compartiment chloroplastique (Tab. XXXIII), le MGDG affiche une importante réduction du pourcentage de radioactivité dans les plantules traitées pour tous les temps de marquage : après 24 heures de dépôt du précurseur radioactif, le MGDG radioactif est environ 7 fois plus réduit dans les feuilles de plantules traitées ce qui présume d'une réduction de la synthèse de ce glycolipide : le taux de PC radioactif est presque doublé dans les plantules traitées après 24 heures de marquage ce qui laisse supposer qu'il n'est pas utilisé pour la synthèse des glycolipides (Fig. 56B).

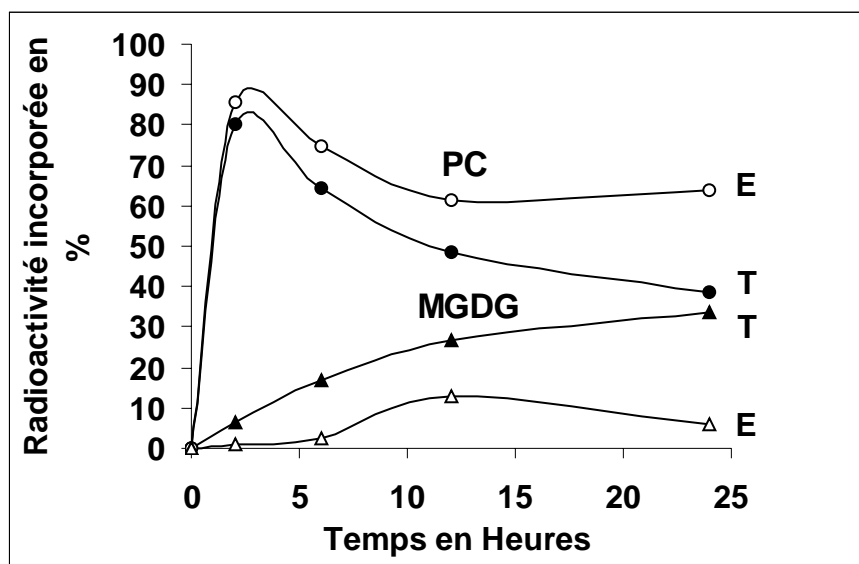


Figure 56B : Effet du norflurazon sur la cinétique d'incorporation du [1-<sup>14</sup>C] oléate dans PC et MGDG des feuilles de soja. (Radioactivité incorporée en %).

Le DGDG radioactif qui est en faibles proportions pour tous les temps de marquage, est également réduit sous l'effet de l'herbicide : après 24 heures de dépôt du précurseur radioactif, il est 8 fois moins présent dans les plantules traitées.

Le PG est le lipide chloroplastique le plus radioactif après 2 heures de marquage aussi bien dans les plantules témoins que dans les plantules traitées. Le taux de PG radioactif augmente en fonction du temps de marquage chez les deux types de plantules (témoins et traitées) avec toutefois une élévation du pourcentage de radioactivité chez les plantules traitées. L'acylation du [1-<sup>14</sup>C] oléate sur le PG semble donc facilitée par le norflurazon.

La cinétique de marquage des catégories lipidiques montre que le norflurazon provoque une forte chute de la radioactivité liée aux galactolipides dans les feuilles traitées alors que PC y est plus radioactive.

La diminution des proportions de galactolipides radioactifs observée dans les plantules traitées résulterait du blocage par le norflurazon du transfert des radicaux acyls de PC vers les galactolipides et/ ou de la dégradation plus importante de ces derniers (galactolipides) en présence de l'herbicide .

#### 4 - Effet sur la désaturation du [1-<sup>14</sup>C] oléate dans PC et MGDG

L'étude de la désaturation du [1-<sup>14</sup>C] oléate dans PC et MGDG (Fig. 57) montre que après 24 heures de dépôt du précurseur radioactif, 81% d'acide oléique ont été désaturés en acide linoléique et linoléique dans la PC des feuilles des plantules témoins contre 86% dans la PC des feuilles des plantules traitées.

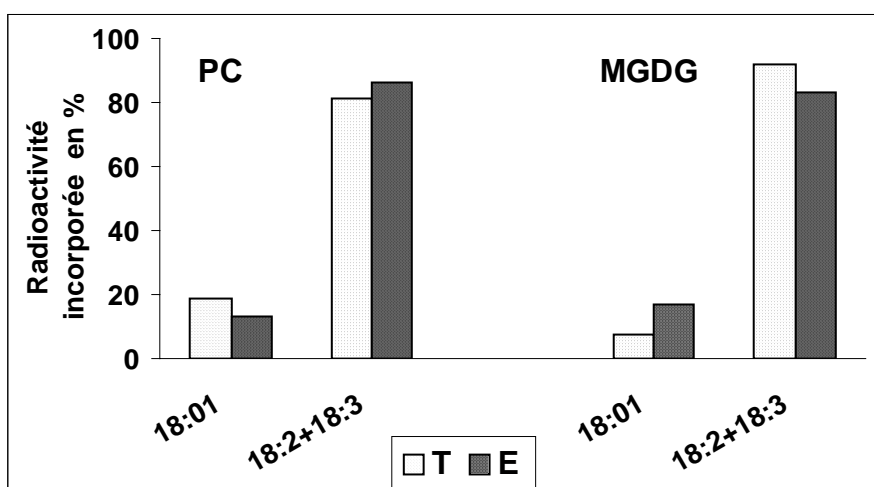


Figure 57 : Effet du norflurazon sur la désaturation du [1-<sup>14</sup>C] oléate dans PC et MGDG des feuilles de soja après 24 heures de marquage.

Dans le MGDG des feuilles des plantules témoins, 92% d'acide oléique sont désaturés en acides linoléique et linoléique contre 83% seulement dans le MGDG des feuilles des plantules traitées au norflurazon.

##### 4.1 - Acides gras de PC

Aussi bien chez les plantules témoins que chez les plantules traitées par l'herbicide (Fig. 58), dès 2 heures de marquage le plus fort pourcentage de radioactivité se retrouve dans l'oléate (64.6% et 67.6% respectivement dans les plantules témoins et

les plantules traitées). Par la suite le pourcentage de radioactivité décline progressivement dans le résidu oléate atteignant après 24 heures de marquage 18.9 % dans les plantules témoins et 13.3% dans les plantules traitées.

Les proportions de linoléate radioactif sont légèrement plus faibles dans les plantules traitées.

Après 2 heures de marquage, le niveau de linoléate radioactif est sensiblement le même dans les plantules témoins et traitées ; au delà, le taux de linoléate radioactif est pratiquement doublé dans les plantules traitées.

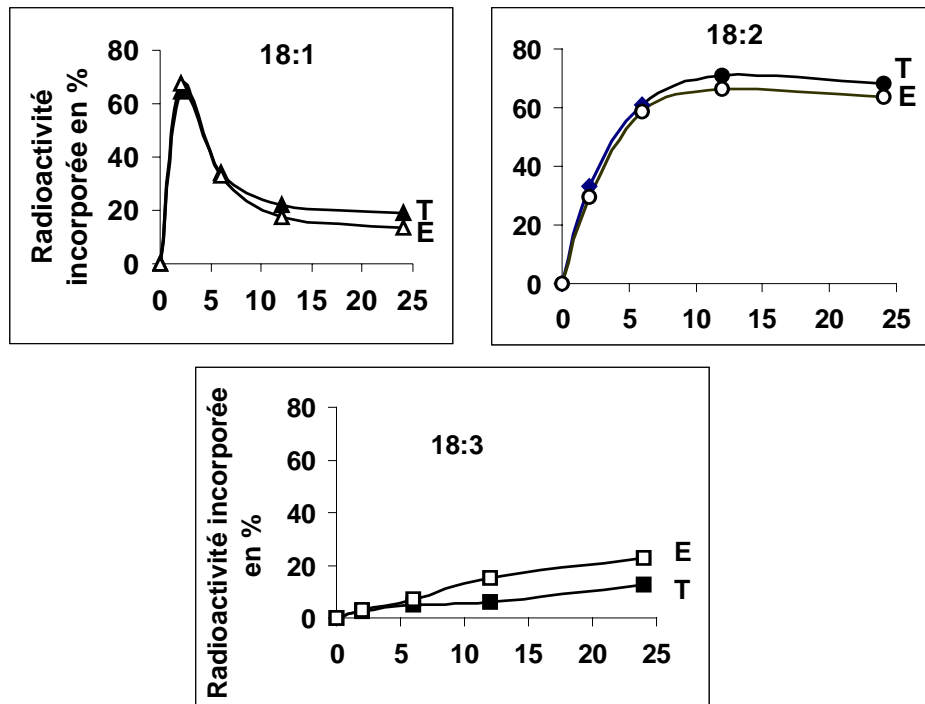


Figure 58 : Effet du norflurazon sur l'incorporation du [1-<sup>14</sup>C] oléate dans les acides gras de PC des feuilles de soja. (Radioactivité incorporée en %).

L'indice de désaturation de l'oléate (Tab. XXXIV), est sensiblement le même chez les plantules témoins et les plantules traitées pour les temps courts de marquage (2 heures et 6 heures ), pour les temps longs, l'indice de désaturation est plus élevé chez les plantules traitées.

L'indice de désaturation du linoléate (Tab. XXXIV), est plus élevé chez les plantules traitées et ceci pour tous les temps de marquage : après 24 heures de dépôt du précurseur radioactif, l'indice de désaturation du linoléate est multiplié par deux sous l'effet de l'herbicide, ce qui dénote une activation de la désaturation du linoléate lié à la PC.

Tableau XXXIV : Indice de désaturation de l'oléate et du linoléate dans PC des feuilles de plantules de soja après marquage au [1-<sup>14</sup>C] oléate: Effet du norflurazon.

Indice de désaturation		2 h	6 h	12 h	24 h
18 :2+18 :3/18 :1	T	0.54	1.93	3.47	4.28
	E	0.47	1.99	4.62	6.48
18 :3/18 :2	T	0.07	0.08	0.08	0.18
	E	0.09	0.12	0.23	0.35

#### 4.2 - Espèces moléculaires de PC

La proportion de l'espèce moléculaire 18:3/18:3 radioactive est quatre fois plus élevée dans les feuilles des plantules traitées que dans les témoins alors que le taux de l'espèce moléculaire 18:2/18:3 radioactive est réduit de moitié dans les feuilles des plantules traitées.

Une légère augmentation du niveau des espèces moléculaires 18:1/18:3 et 18:2/18:2 est également observée en présence du norflurazon parallèlement à une réduction du niveau de l'espèce moléculaire 18:1/18:2 radioactive. La proportion de l'espèce moléculaire 18:1/18:1 radioactive ne varie presque pas sous l'effet de l'herbicide (Fig. 59)

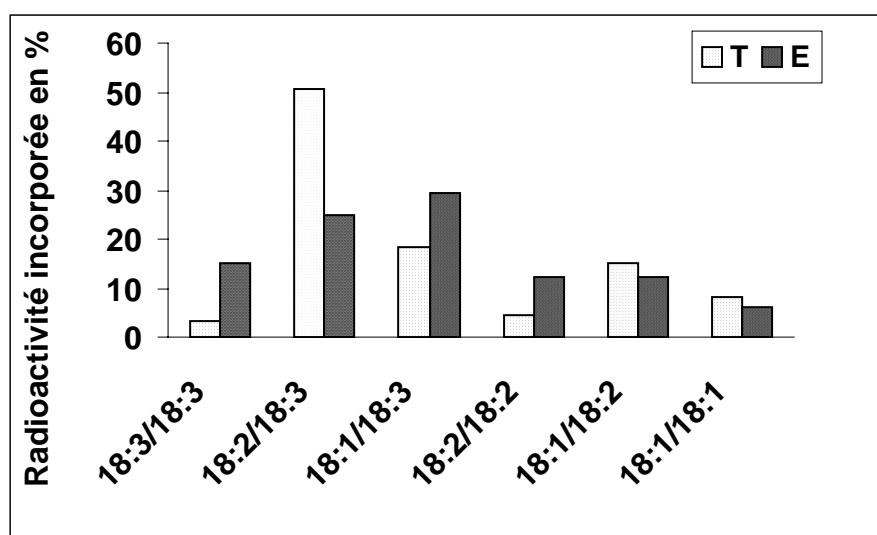
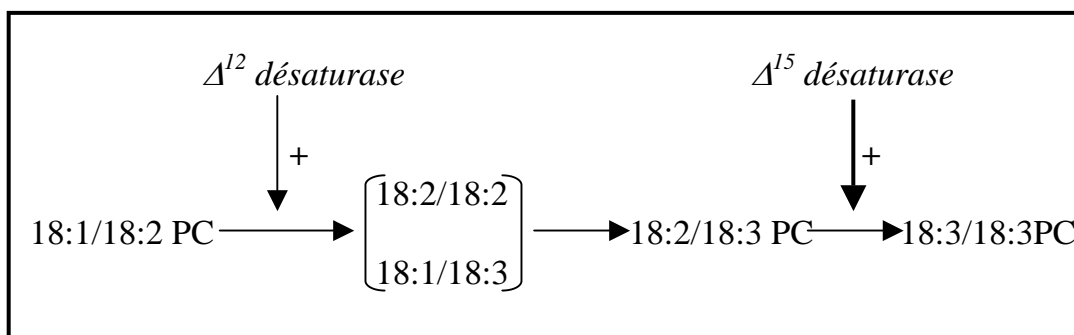


Figure 59 : Effet du norflurazon sur l'incorporation du [1-<sup>14</sup>C] oléate dans les espèces moléculaires de PC des feuilles de soja 24 heures après le dépôt du précurseur. (Radioactivité incorporée en %).



L'ensemble de ces résultats suggèrent une stimulation par le norflurazon de l'oléate désaturase ( $\Delta^{12}$ ) et de la linoléate désaturase ( $\Delta^{15}$ ) liées à la PC avec cependant un effet plus prononcé sur l'activité linoléate désaturase.

### 4.3 - Acides gras du MGDG

La figure 60, représente le suivi des acides oléique, linoléique et linoléique radioactifs liés au MGDG dans les feuilles de soja témoins et traitées au norflurazon.

Le taux d'oléate radioactif lié au MGDG est plus important dans les plantules traitées que dans les plantules témoins pour tous les temps de marquage.

Dès 2 heures de marquage, le MGDG présente un taux d'oléate radioactif de 29% chez les plantules témoins contre 33% chez les plantules traitées). Au delà, le pourcentage d'oléate radioactif diminue dans les deux types de plantules tout en étant plus élevé chez les plantules traitées. En effet après 24 heures de marquage le pourcentage d'oléate radioactif lié au MGDG est le double de celui du MGDG des plantules témoins suite probablement à une diminution de l'activité de désaturation de cet acide gras.

Dans les plantules traitées, l'oléate est acylé plus rapidement à la molécule de MGDG mais il y est moins désaturé

La proportion de linoléate radioactif est presque la même dans les plantules témoins et les plantules traitées après 2 heures de marquage. Pour les temps de marquage plus longs, le taux de linoléate radioactif est plus élevé dans les plantules traitées.

Le taux d'acide linoléique radioactif augmente en fonction du temps de marquage chez les deux types de plantules mais les niveaux de cet acide gras triinsaturé sont plus réduits dans les plantules traitées : ainsi après 24 heures de marquage, la radioactivité de l'acide linoléique liée au MGDG est réduite de 22% sous l'effet du norflurazon.

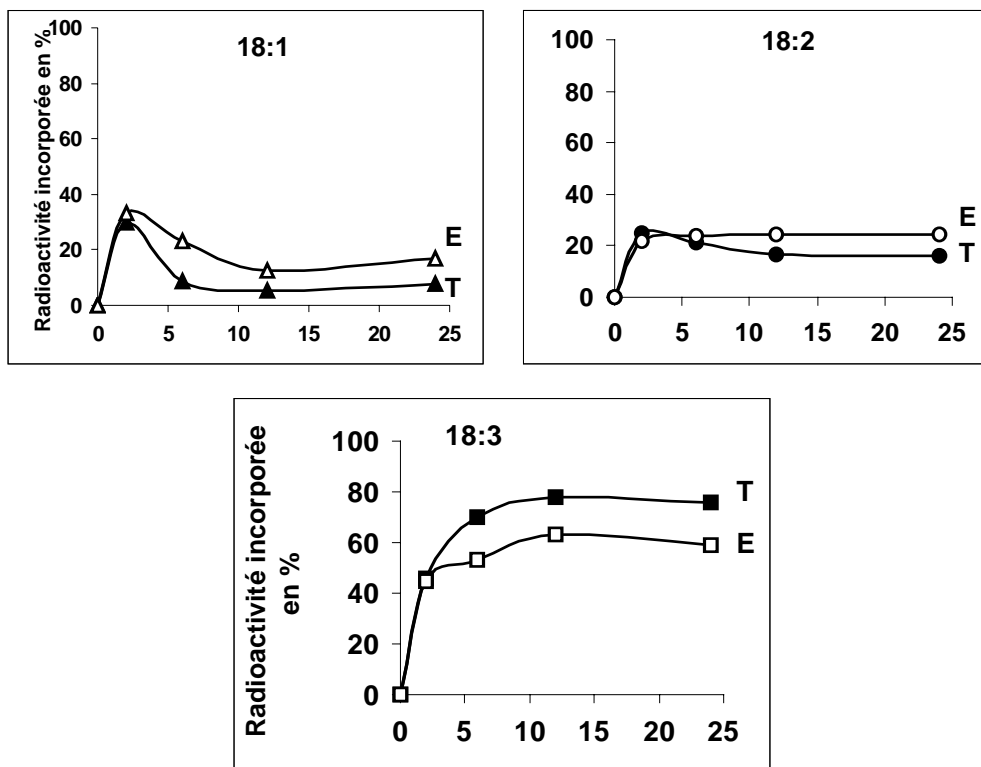


Figure 60 : Effet du norflurazon sur l'incorporation du  $[1-^{14}\text{C}]$  oléate dans les acides gras du MGDG des feuilles de soja. (Radioactivité incorporée en %).

Les indices de désaturation de l'oléate sont réduits sous l'effet du norflurazon pour tous les temps étudiés (Tab. XXXV). L'indice de désaturation du linoléate dans les plantules témoins augmente en fonction du temps ; dans les plantules traitées, il est pratiquement stable pendant toute la durée du marquage tout en étant réduit sous l'effet du norflurazon.

Tableau XXXV : Indices de désaturation de l'oléate et du linoléate dans le MGDG des feuilles de plantules de soja après marquage au [1-<sup>14</sup>C] oléate: Effet du norflurazon.

Indice de désaturation		2 h	6 h	12 h	24 h
18 :2+18 :3/18 :1	T	2.37	10.60	17.84	11.80
	E	2.00	3.29	7.05	4.87
18 :3/18 :2	T	1.84	3.26	4.73	4.68
	E	2.04	2.25	2.60	2.42

La diminution des indices de désaturation des résidus oléate et linoléate dans le MGDG des plantules traitées dénote une inhibition des activités oléate et linoléate désaturase chloroplastiques.

#### 4.4 - Espèces moléculaires du MGDG

Après 24 heures de marquage (Fig. 61), la proportion de l'espèce moléculaire la plus insaturée 18:3/18:3 est plus réduite en présence de l'herbicide : elle passe de 77 % dans les plantules témoins à 43 % dans les plantules traitées soit 44 % de réduction sous l'effet de l'herbicide.

En revanche, le niveau des espèces moléculaires précurseurs 18:2/18:3 et 18:1/18:3 est respectivement doublé et quadruplé dans les plantules traitées.

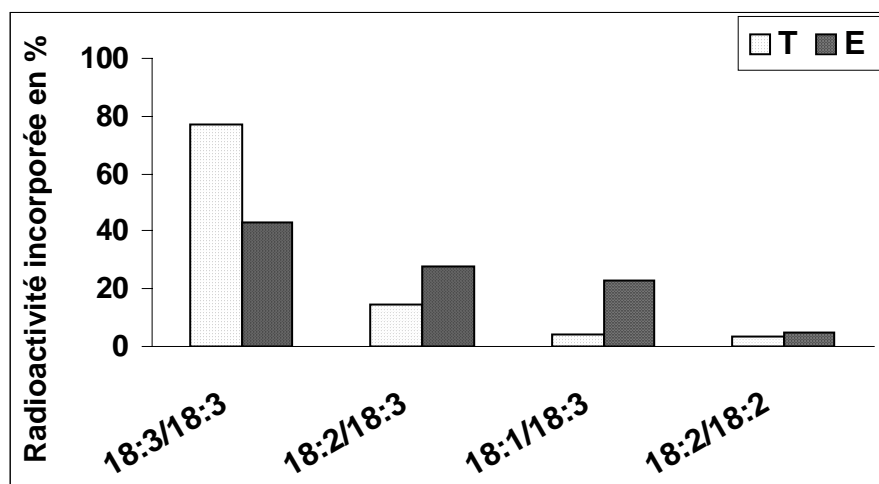
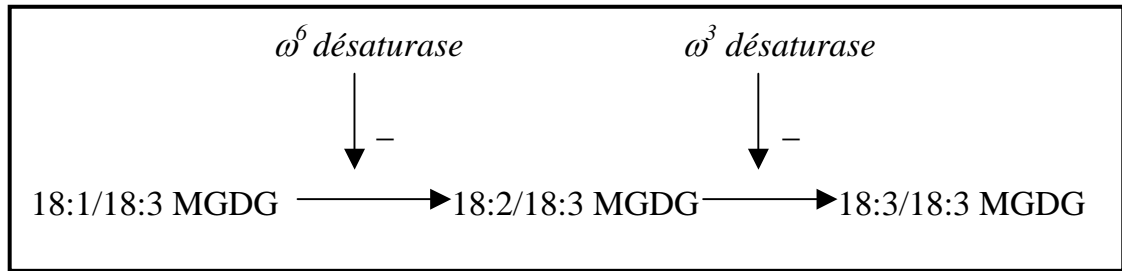


Figure 61 : Effet du norflurazon sur l'incorporation du [1-<sup>14</sup>C] oléate dans les espèces moléculaires du MGDG des feuilles de soja 24 heures après le dépôt du précurseur. (Radioactivité incorporée en % ).



Le calcul des indices de désaturation et les variations des niveaux des espèces moléculaires du MGDG en présence du norflurazon montrent que ce dernier inhibe les  $\omega^6$  et  $\omega^3$  désaturases liées au MGDG.

Le norflurazon semble donc agir différemment sur les désaturases des lipides foliaires du soja : dans le compartiment chloroplastique il inhibe les  $\omega^6$  désaturase et  $\omega^3$  désaturase liées au MGDG, dans le compartiment extrachloroplastique, il stimule les  $\Delta^{12}$  désaturase et  $\Delta^{15}$  désaturase liées à la PC.

### Discussion

Plusieurs travaux ont montré que les modifications du métabolisme lipidique provoquées par les pyridazinones substitués dépendent des espèces végétales étudiées (Willemot et *al.*, 1982 ; Murphy et *al.*, 1985).

De tous les pyridazinones étudiés, le BASF 13-338 ou San 9785 est celui qui est le plus utilisé pour l'étude des désaturases liées aux lipides (Lem et Williams 1981 ; Norman et *al.*, 1987).

Cette molécule n'interférant pas avec la biosynthèse des caroténoïdes son action sur la désaturation du linoléate en linoléate liée au MGDG est donc indéniable.

Concernant le norflurazon, d'aucuns rapportent qu'il n'a pas d'effets significatifs sur les désaturases liées aux lipides (Sandelius et Dahlin 1990); certains ont montré qu'il inhibe à la fois les désaturases chloroplastiques et extrachloroplastiques (St John, 1982) ; d'autres ont observé une inhibition des désaturases chloroplastiques seulement  $\Delta^3$  trans désaturase liée au PG et linoléate désaturase liée au MGDG (Davies et Harwood, 1983).

Les résultats obtenus après utilisation du  $[1-^{14}\text{C}]$  oléate complètent ceux obtenus suite à la fourniture du  $[1-^{14}\text{C}]$  acétate sur les activités de désaturation des acides gras liés à la PC et au MGDG.

L'étude de la cinétique d'incorporation du  $[1-^{14}\text{C}]$  oléate dans la PC et le MGDG montre que le norflurazon augmente le pourcentage de radioactivité dans la PC en favorisant l'acylation de l'oléate radioactif dans cette molécule lipidique alors qu'il le réduit au niveau du MGDG entravant ainsi le transfert des radicaux acyls de la PC vers le MGDG.

Le norflurazon augmente le taux de PG chloroplastique radioactif après fourniture du  $[1-^{14}\text{C}]$  oléate suite soit à une augmentation de l'acylation du résidu oléate sur cette classe lipidique soit à une inhibition de la désaturation de l'oléate. le PG étant

entièrement synthétisé dans le chloroplaste par la voie procaryote, la détection de la radioactivité dans ce lipide après marquage au [1-<sup>14</sup>C] oléate signifie que ce résidu est introduit dans le compartiment chloroplastique.

Le norflurazon favorise l'acylation ou l'accumulation de l'oléate dans la molécule de MGDG (dès 2 heures de marquage il est constaté 33.5% d'oléate radioactif estérifié au MGDG des plantules traitées contre 29 % dans les plantules témoins mais il freine la désaturation de ce dernier en linoléate.

A notre connaissance, seuls les travaux de Norman et ST John (1987) ont étudié la formation des espèces moléculaires très insaturées en présence du BASF 13 338 ou san 9785 herbicide appartenant à la même famille que le norflurazon. Le travail que nous avons effectué grâce à la séparation des espèces moléculaires par HPLC et grâce à la comparaison des cinétiques de marquage des lipides *in vivo* par le [1-<sup>14</sup>C] oléate précurseur direct des acides plus insaturés linoléate et linoléate, constitue donc un complément dans la compréhension du mode d'action du norflurazon sur le métabolisme lipidique.

Le norflurazon réduit le degré d'insaturation du MGDG en baissant les proportions de linoléate lié au MGDG et de l'espèce moléculaire 18 :3/18 :3 MGDG ; cette diminution est consécutive à une augmentation du linoléate mais aussi des espèces moléculaires pentaènes et tétraènes 18 :2/18 :3 et 18 :1/18 :3 suite à l'inhibition de la  $\omega^3$  désaturase.

L'effet inverse est observé dans le compartiment extrachloroplastique où il est constaté une élévation de la proportion de 18:3 PC et de l'espèce moléculaire 18 :3/18 :3PC suite à une stimulation de la  $\Delta^{15}$  désaturase et/ou à une réduction du turn over de la PC.

Ces résultats sont bien corroborés par les calculs des indices de désaturation du linoléate qui est réduit dans le chloroplaste alors qu'il est augmenté dans le compartiment extrachloroplastique au niveau de la PC.

L'élévation de l'espèce moléculaire 18 :3/18 :3 PC induirait une plus forte fluidité des membranes du réticulum endoplasmique et une augmentation de l'intégrité des protéines membranaires compatible avec des activités biochimiques normales.

Nos résultats montrent une certaine flexibilité du métabolisme lipidique : la déficience du compartiment chloroplastique fragilisé par l'herbicide semble compensée par le compartiment extrachloroplastique, réaction identique à celle observée dans des cas de mutation (Kurst *et al.*, 1988) ou de stress (Aïd *et al.*, 1998).

L'augmentation de PC radioactive peut également découler de l'augmentation de sa biosynthèse par le norflurazon suite à l'activation de la CDP-choline phosphotransférase ou de la LysoPC acyltransférase. Aussi, nous avons étudié l'activité *in vitro* de ces deux enzymes impliquées dans la biosynthèse de la PC sur des microsomes extraits de feuilles de plantules témoins et des feuilles de plantules traitées par le norflurazon.

Nous avons également procédé à l'étude de l'expression des gènes *FAD3* et *FAD7* codant respectivement pour les  $\Delta^{15}$  désaturase et  $\omega^3$  désaturase.

**Effet du norflurazon sur l'activité *in vitro* de  
deux enzymes liées à la synthèse de PC**

Lors de l'étude de la composition en lipides des feuilles de soja, nous avons observé une augmentation de la PC aussi bien en masse qu'en proportion dans les feuilles des plantules de soja traitées par le norflurazon  $10^{-4}$ M.

Par la suite, l'étude de la biosynthèse des lipides après fourniture du  $[1-^{14}\text{C}]$  acétate a montré une réduction de la biosynthèse de la PC en présence de norflurazon  $10^{-4}$ M.

Par ailleurs l'étude de l'acylation et de la désaturation *in vivo* du résidu oléate après fourniture du  $[1-^{14}\text{C}]$  oléate a montré une augmentation de l'acylation et des activités de désaturation liées à la PC en présence du norflurazon.

Nous avons voulu vérifier ces résultats par une étude des activités *in vitro* de deux enzymes liées au métabolisme de la PC : activité CDP-choline phospho-transférase et activité lysoPC acyltransférase. Ces deux activités ont été étudiées sur des fractions de microsomes extraits de feuilles de plantules de soja témoins et traitées.

### 1 – Activité *in vitro* de la CDP-choline phosphotransférase

La CDP-Choline : 1,2 DAG choline phosphate transférase (EC 2.7.8.2) catalyse la synthèse de la PC en déplaçant le CMP de la CDP-choline et en transférant le phosphocholine sur le DAG.

Nous avons observé une réduction de synthèse de la PC radioactive après fourniture du  $[1-^{14}\text{C}]$  acétate dans les feuilles des plantules de soja traitées par le norflurazon dès 6 heures de marquage (Fig 47 A).

La figure 62, montre l'activité de synthèse *in vitro* de la PC via la CDPcholine phospho-transférase dans les microsomes provenant de feuilles de plantules témoins et dans ceux provenant des feuilles de plantules traitées par le norflurazon en fonction de la quantité de protéines microsomales ; le temps d'incubation est de 20 min et la quantité de CDP choline  $[1-^{14}\text{C}]$  méthyl est la même (265 pmoles).

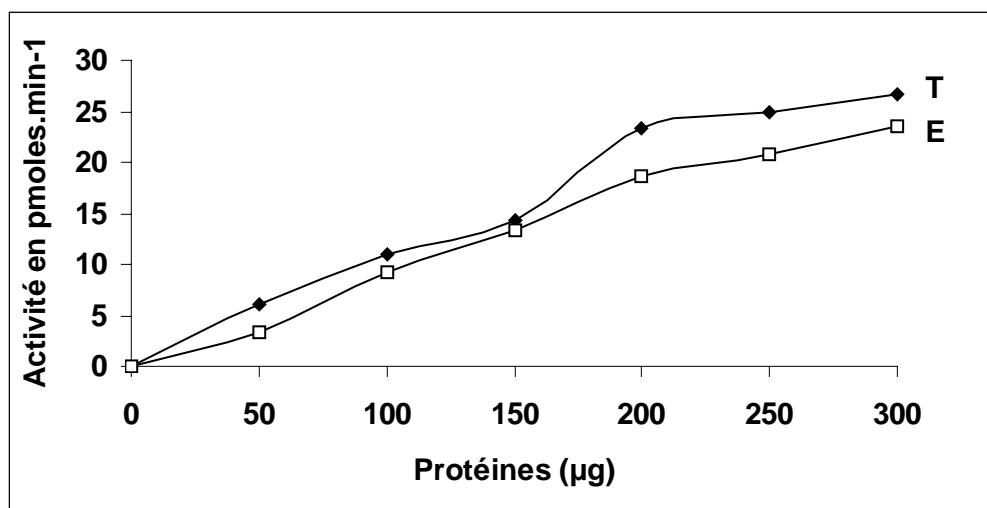


Figure 62 : Variation en fonction de la quantité de protéines microsomales de l'activité *in vitro* de la CDP-choline phosphotransférase des microsomes de feuilles de plantules de soja témoins (T) et traitées (E) par le norflurazon. (Activité en pmoles de choline radioactive incorporée dans la PC.min<sup>-1</sup>). Le milieu d'incubation contient du tampon Tris 50 mM, pH 8, 265 pmoles de CDP-[méthyl  $1-^{14}\text{C}$ ] choline. L'incubation est réalisée à 30°C pendant 20 min. (Chaque valeur est la moyenne de trois expériences).

Jusqu'à 150  $\mu\text{g}$  de protéines microsomales, l'activité CDP-choline phosphotransférase est pratiquement la même dans les plantules témoins et les plantules traitées. Pour des quantités de protéines microsomales plus élevées (allant de 200 à 300  $\mu\text{g}$ ), l'activité CDPcholine phosphotransférase est réduite d'environ 20% dans les plantules traitées.

Ce résultat est en accord avec celui obtenu sur la biosynthèse *in vivo* de la PC après fourniture du  $[1-^{14}\text{C}]$  acétate et qui a montré une réduction de la biosynthèse de PC dans les plantules traitées.

L'augmentation en masse de la PC que nous avons observée dans les plantules traitées résulte vraisemblablement du blocage par le norflurazon du transfert des molécules de PC vers le chloroplaste.

## 2- Activité *in vitro* de la lysoPC acyl transférase

La lysoPC acyl transférase ou acylCoA : lysoPC acyltransférase (EC 2.3.1.23) permet l'acylation des résidus oléoylCoA sur la lysoPC formant ainsi des molécules de PC.

En présence de norflurazon, l'acylation de l'oléate dans la lysoPC des plantules traitées est légèrement plus importante que celle que soit la quantité en protéines microsomales utilisées (Fig. 63). Le pourcentage d'augmentation sous l'effet du norflurazon est en moyenne de 20% comparativement au témoin.

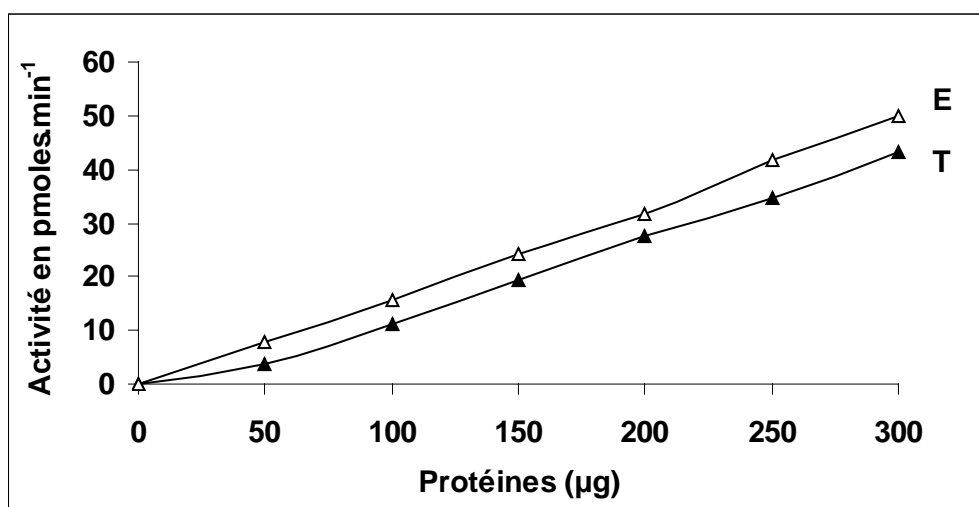


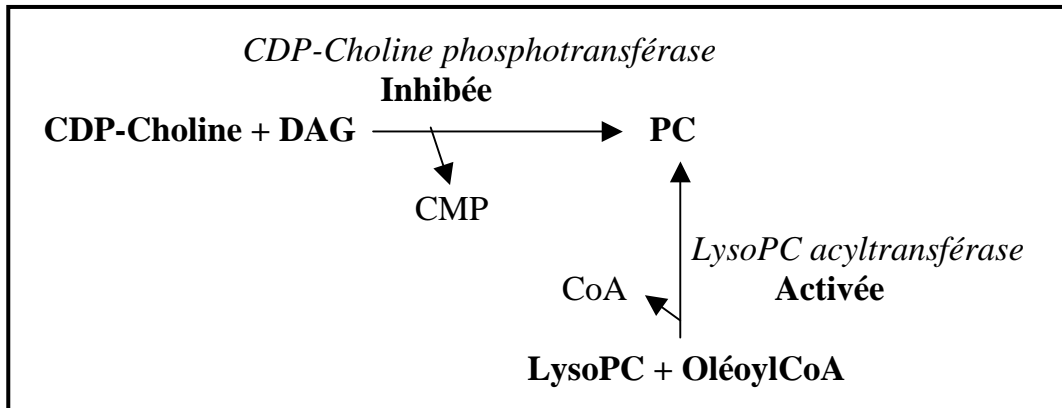
Figure 63 : Variation en fonction de la quantité de protéines microsomales de l'activité *in vitro* de la Lyso-PC acyl transférase des microsomes de feuilles de plantules de soja témoins (T) et traitées (E) par le norflurazon. (Activité en pmoles d'oléoyl radioactif incorporé dans la PC.  $\text{min}^{-1}$ ). Le milieu d'incubation contient du tampon phosphate 0.1M, pH 7.2, 630 pmoles de  $[1-^{14}\text{C}]$  oléoyl CoA. L'incubation est réalisée à 30°C pendant 6 min. (Chaque valeur est la moyenne de trois expériences).

Ce résultat rejoint celui obtenu *in vivo* après fourniture du  $[1-^{14}\text{C}]$  oléate d'ammonium et qui a montré une acylation plus importante du résidu oléate dans les plantules traitées.

La lysoPC acyltransférase catalysant le transfert du reste oléoyl à partir de l'oléoylCoA sur la lysoPC fait partie du système oléate désaturase chez les végétaux (Frentzen, 1986).

L'augmentation de cette activité sous l'effet du norflurazon expliquerait donc en partie l'augmentation de l'insaturation de la PC dans les plantules traitées.

Le norflurazon exerce donc un effet différent sur les enzymes impliquées dans le métabolisme de la PC : il inhibe l'activité *in vitro* de la CDPcholine phosphotransférase et active par contre celle de la lysoPC acyltransférase.



Effet du norflurazon sur l'expression des gènes *FAD7* et *FAD3* des feuilles de soja

Les études de biosynthèse et de désaturation des lipides foliaires de soja après fourniture de [1-<sup>14</sup>C] acétate et du [1-<sup>14</sup>C] oléate ont montré une inhibition de la formation du linoléate lié au MGDG et une activation de la formation du linoléate lié à la PC.

Il nous a donc paru intéressant d'étudier l'expression des gènes des désaturases codant pour la  $\omega^3$  désaturase impliquée dans la formation du linoléate lié au MGDG dans le compartiment chloroplastique et la  $\Delta^{15}$  désaturase catalysant la formation du linoléate lié à la PC dans le compartiment extrachloroplastique.

L'augmentation du linoléate lié à la PC dans le compartiment extrachloroplastique serait elle due à une augmentation de l'activité de la  $\Delta^{15}$  désaturase et/ou à une augmentation du taux de transcrits du gène codant pour cette enzyme?

Les séquences des gènes codant pour la  $\Delta^{15}$  désaturase du réticulum endoplasmique ont été déterminées chez *Glycine max* L. et *Brassica napus* (Yadav et al., 1993), chez *Nicotiana tabacum* (Hamada et al., 1996), chez *Arabidopsis thaliana* (Arondel et al., 1992) et chez *Oryza sativa* (Kodama et al., 1997). Celles des gènes *FAD7* et *FAD8* codant pour les  $\omega^3$  désaturases plastidiales ont été déterminées chez *Glycine max* L. (Van de Loo et Somerville, 1994), *Arabidopsis thaliana* (Iba et al., 1993 ; Gibson et al., 1994) et *zea maïs* (Berberich et al., 1998).

La protéine *FAD7* de soja (n° d'accension AAA61776.1) est constituée de 453 acides aminés et la protéine *FAD3* (n° d'accension AAA61777.1) de 380 acides aminés.

Le produit du gène *FAD7* contient un peptide transit dans la région N terminale (Iba et al., 1993), ce que nous avons confirmé en utilisant le logiciel d'adressage Predotar (<http://www.mra.fr/Internet>). Mise à part cette région, la séquence amino acides produite par le gène *FAD7* présente de fortes homologues avec le produit *FAD3* ce qui indique que les deux gènes dérivent d'un ancêtre commun (Yadav et al., 1993).

L'expression des gènes n-3 désaturases (*FAD7* et *FAD3*) est fortement régulée par une série de stimuli liés au développement et à l'environnement. Pour exemple, il existe généralement une relation inverse entre la température de croissance et la teneur en acides gras polyinsaturés des membranes (Brockman et al., 1990 ; Berberich et al., 1998).

De telles réponses à différents stress (thermique, salin ou hydrique) constituent une adaptation de la fluidité membranaire requise pour le maintien d'une activité biologique optimale (Murphy et Piffanelli, 1998)

Le gène *FAD7* est le facteur majeur régulant la formation du  $\alpha$  linoléate dans les tissus photosynthétiques à température normale. Le rôle biologique de ce gène est l'approvisionnement en acide  $\alpha$  linoléique pour la production des molécules signal ou oxylipines. L'importance des  $\omega^3$  désaturases plastidiales dans la résistance des plantes aux pathogènes et aux pesticides a été montrée par l'extrême sensibilité du triple mutant *fad3-fad7-fad8* d'*Arabidopsis* à l'attaque par les insectes (McConn et al., 1997).

**1-Séquençage et alignement des fragments amplifiés des gènes *FAD3* et *FAD7* des feuilles de soja**

Une région des deux gènes *FAD3* et *FAD7* de soja *Glycine max* L. codant respectivement pour les désaturases cytosolique et chloroplastique est amplifiée par PCR en utilisant des oligonucléotides spécifiques déterminés à partir de séquences de mRNAs de soja *Glycine max* L. alignées avec une séquence génomique d'arabidopsis (n° accession L22931).

Les oligonucléotides ont été choisis dans une zone conservée pour les deux désaturases et la séquence reverse leur est commune (cf. matériel et méthodes).

Après séquençage des fragments PCR, les séquences obtenues ont été comparées avec les séquences de la base de données EMBL/ GenBank.

La taille du fragment *FAD7* amplifié est de 420 pb et celui du fragment *FAD3* est de 459 pb. Alignés selon Myers et Miller, (1989), sur une séquence génomique de la *FAD7* d'arabidopsis (n° d'accension L22931), les deux fragments amplifiés présentent chacun un intron de 184 pb pour le fragment *FAD3* et 145 pb pour le fragment *FAD7* (Fig. 64).

### Séquence du fragment *FAD3* amplifié

```
CATTGTTGGGTCAAGAATCCATGGAGATCCCTCAGTTATGTTCTCAGGGATGTGCTTGTAAATGCTGCATTGGTGGCTGCAGCAATT
CACTTCGACAACCTGGCTTCTCTGGCCAATCTATTGCCCCATTCAAGGCACAATGTTCTGGGCTCTCCTTGTCTTGGACATGATTGG
TAATAATTTTGTGTTTCTTACTCTTTTCTTTTGTGTTATGATATGAATCTCACACATTGTTCTGTTATGTCATTCTTCTTCATT
TGGCTTTAGACAACCTTAAATTTGAGATCTTTATTATGTTTTGCTTATATGGTAAAGTGATTCTTCATTATTTCAATCTTCATTGAT
TGAATTGAACAAGTGGCCATGGAAGCTTTTTCAGATAGCCCTTTGCTGAATAGCCTGGTGGGACACATCTTGCAATCTCAATCTTGT
GCCATACCATGGATGGAGAAT
```

### Intron du fragment *FAD3* amplifié

```
GTAATAATTTTGTGTTTCTTACTCTTTTCTTTTGTGTTATGATATGAATCTCACACATTGTTCTGTTATGTCATTCTTCTTCATT
TTGGCTTTAGACAACCTTAAATTTGAGATCTTTATTATGTTTTGCTTATATGGTAAAGTGATTCTTCATTATTTCAATCTTCATTGA
TTGAATTGAACAAGTGGCCATGGAAAGCTTTTTCAGATAGCCCTTTGCTGAATAGCCTGGTGGGACACATCTTGCAATCTCAATCTTGT
TGCCATACCATGGATGGAGAAT
```

### Séquence du fragment *FAD3* sans intron (cDNA)

```
CATTGTTGGGTCAAGAATCCATGGAGATCCCTCAGTTATGTTCTCAGGGATGTGCTTGTAAATGCTGCATTGGTGGCTGCAGCAATT
CACTTCGACAACCTGGCTTCTCTGGCCAATCTATTGCCCCATTCAAGGCACAATGTTCTGGGCTCTCCTTGTCTTGGACATGATTGT
GGCCATGGAAGCTTTTTCAGATAGCCCTTTGCTGAATAGCCTGGTGGGACACATCTTGCAATCTCAATCTTGTGCCATACCATGGA
TGAGAAT
```

### Séquence du fragment *FAD7* amplifié

```
CATTGCTGGGTGAAGGACCCTTTGAAGTCCATGAGTTATGTTGTTAGAGATGTCATTGTGGTTTTTGGGTTGGCTGTTGCTGCAGCT
TATCTCAACAATTTGGGTTGTTTGGCCCTCTCTATTGGGCTGCTCAGGGAACCATGTTCTGGGCCCTCTTGTCTTGGACATGATTGG
TAATAGTCAATTTCAATATGATTACTCCATCTTTTACTAATGTAGATCTAGATTCAATGTATAGATTGGCTTTTGGGGTGGTA
AAGTTGGATTTCAAAAGTTGTTATGATGATAACCATGGTTGGTGTGTTGGATGTTTCAAGTGGTCAATGGGAGCTTTTCAAACAACCC
CAAATTGAACAGTGTGTTGGGCATCTGCTGCATTCTTCAATCTAGTGCCATATCATGGATGGAGAAT
```

### Intron du fragment *FAD7* amplifié

```
AATAGTCAATTTCAATATGATTACTCCATCTTTTACTAATGTAGATCTAGATTCAATGTATAGATTGGCTTTTGGGGTGGTAA
AGTTGGATTTCAAAGTTGTTATGATGATAACCATGGTTGGTGTGTTTGGATGTTTCAAGTGGTCAATGGGAGCTTTTCAAACAACCC
AAATTGAACAGTGTGTTGGGCATCTGCTGCATTCTTCAATCTAGTGCCATATCATGGATGGAGAAT
```

### Séquence *FAD7* sans intron (cDNA)

```
CATTGCTGGGTGAAGGACCCTTTGAAGTCCATGAGTTATGTTGTTAGAGATGTCATTGTGGTTTTTGGGTTGGCTGTTGCTGCAGCT
TATCTCAACAATTTGGGTTGTTTGGCCCTCTCTATTGGGCTGCTCAGGGAACCATGTTCTGGGCCCTCTTGTCTTGGACATGATTGG
TGTGGTCAATGGGAGCTTTTCAAACAACCCAAATTGAACAGTGTGTTGGGCATCTGCTGCATTCTTCAATCTAGTGCCATATCAT
GGATGGAGAAT
```

Figure 64 : Séquences des fragments *FAD3* et *FAD7* amplifiés

Les deux régions amplifiées des deux gènes se sont révélées homologues des séquences L22965 correspondant à la séquence mRNA de la *FAD7* de soja (89%

d'homologie) et L22964 correspondant à la séquence mRNA de la *FAD3* de soja (98% d'homologie) (Fig. 65).

#### Blast du fragment *FAD3* sans intron

>gi|27902574|gb L22964 Glycine max microsomal omega-3-fatty acid desaturase (*FAD3B*) mRNA, complete cds; nuclear gene for microsomal product, Length = 1180, Identities = 266/269 (98%). (Query = fragment *FAD3* sans intron ; Sbjct= séquence mRNA).

```

Query= 1   CATTGTTGGGTCAAGAATCCATGGAGATCCCTCAGTTATGTTCTCAGGGATGTGCTTGTA 60
          |||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||
Sbjct: 136 CATTGCTGGGTCAAGAATCCATGGAGATCCCTCAGTTATGTTCTCAGGGATGTGCTTGTA 195

Query: 61  ATTGTCGATTGGTGGCTGCAGCAATTCACCTCGACAACCTGGCTTCTCTGGCCAATCTAT 120
          |||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||
Sbjct: 196 ATTGTCGATTGGTGGCTGCAGCAATTCACCTCGACAACCTGGCTTCTCTGGCTAATCTAT 255

Query: 121 TGCCCCATTCAAGGCACAATGTTCTCGGCTCTCCTTGTTCTTGGACATGATTGTGGCCAT 180
          |||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||
Sbjct: 256 TGCCCCATTCAAGGCACAATGTTCTCGGCTCTCCTTGTTCTTGGACATGATTGTGGCCAT 315

Query: 181 GGAAGCTTTTCAGATAGCCCTTTGCTGAATAGCTGGTGGGACACATCTTGCAATCCTCA 240
          |||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||
Sbjct: 316 GGAAGCTTTTCAGATAGCCCTTTGCTGAATAGCTGGTGGGACACATCTTGCAATCCTCA 375

Query: 241 ATTCTTGTCATACCATGGATGGAGAAT 269
          |||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||
Sbjct: 376 ATTCTTGTCATACCATGGATGGAGAAT 404

```

#### Blast du fragment *FAD7* sans intron

Gi|408791|gb L22965 soya FADD Glycine soja chloroplast omega-3 fatty acid desaturase (*FADD*) mRNA, complete cds, Length = 1675, Identities = 243/272 (89%). (Query = fragment *FAD7* sans intron ; Sbjct= séquence mRNA).

```

QUERY: 1   CATTGCTGGGTGAAGGACCCTTTGAAGTCCATGAGTTATGTTGTTAGAGATGTCATTGTG 60
          |||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||
SBJCT: 514 CATTGCTGGGTGAAGGACCCTTTGAGGTCCATGAGCTATGTGGTGAGGGATGTGATTGCT 573

QUERY: 61  GTTTTGGGTTGGCTGTTGCTGCAGCTTATCTCAACAATTGGGTTGTTTGGCCTCTCTAT 120
          |||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||
SBJCT: 574 GTCCTTGGTTTGGCTGCTGCTGCTGCGTATCTCAATAATTGGTTGGTTTGGCCTCTCTAT 633

QUERY: 121 TGGGCTGCTCAGGGAACCATGTTCTGGGCCCTCTTGTCTTGGACATGATTGGTGTGGT 180
          |||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||
SBJCT: 634 TGGGCTGCTCAAGGCACTATGTTCTGGGCTCTGTTTGTCTTGGTCATGATTG---TGGT 690

QUERY: 181 CATGGGAGCTTTTCAAACAACCCCAAATTGAACAGTGTTGTTGGGCATCTGCTGCATTCT 240
          |||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||
SBJCT: 691 CATGGAAGCTTTTCAAACAACCTCAAATTGAACAGTGTTGTTGGACATCTGCTGCATTCT 750

QUERY: 241 TCAATTCTAGTGCCATATCATGGATGGAGAAT 272
          |||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||
SBJCT: 751 TCAATTCTAGTGCCATATCATGGATGGAGAAT 782

```

Figure : 65 : Alignement (Blast) des séquences des fragments exoniques *FAD3* et *FAD7* avec les séquences mRNA de soja. (n° accession L22964 pour la séquence mRNA de la *FAD3* et L22965 pour la séquence mRNA de la *FAD7*).

Le pourcentage d'homologie entre les deux fragments amplifiés *FAD7/FAD3* en ne tenant compte que des exons est de 72,8 % (Fig. 66).

```

          10          20          30          40          50          60
FAD3  CATTGTTGGGTCAAGAATCCATGGAGATCCCTCAGTTATGTTCTCAGGGATGTGCTTGTA
      ::::: ::::: ::::: : :: : :: : :: : ::::: : ::::: : :::::
FAD7  CATTGCTGGGTGAAGGACCCTTTGAAGTCCATGAGTTATGTTGTTAGAGATGTCATTGTG
          10          20          30          40          50          60

          70          80          90          100         110         120
FAD3  ATTGCTGCATTGGTGGCTGCAGCAATTCACCTTCGACAACCTGGCTTCTCTGGCCAATCTAT
      :: :: :::: : :::: :::: : : :: ::::: ::::: : : ::::: :::::
FAD7  GTTTTTGGGTTGGCTGTTGCTGCAGCTTATCTCAACAATTGGGTTGTTTGGCCTCTCTAT
          70          80          90          100         110         120

          130         140         150         160         170
FAD3  TGCCCCATTCAAGGCACAATGTTCTGGGCTCTCCTTGTTCTTGGACATGATTG---TGGC
      :: : :::: : : :: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: :::::
FAD7  TGGGCTGCTCAGGGAACCATGTTCTGGGCCCTCTTTGTTCTTGGACATGATTGGTGTGGT
          130         140         150         160         170         180

          180         190         200         210         220         230
FAD3  CATGGAAGCTTTTTCAGATAGCCCTTTGCTGAATAGCCTGGTGGGACACATCTTGCATTCC
      ::::: ::::: ::::: : : :::: : ::::: : : : : : : : : : : : : : :
FAD7  CATGGGAGCTTTTTCAAACAACCCCAAATTGAACAGTGTTGTTGGGCATCTGCTGCATTCT
          190         200         210         220         230         240

          240         250         260
FAD3  TCAATTCTTGTGCCATACCATGGATGGAGAA-
      ::::: ::::: ::::: ::::: :::::
FAD7  TCAATTCTAGTGCCATATCATGGATGGAGAAT
          250         260         270

```

Figure 66 : Alignement des deux séquences nucléiques *FAD3/FAD7* (sans intron).  
 Sequence 1 :readline() on unopened filehandle at ./Exec\_html.pm line 626. Sequence personnelle :  
*FAD3* (Query 268 nt)  
 Sequence 2 :readline() on unopened filehandle at ./Exec\_html.pm line 626.Sequence personnelle :  
*FAD7* (Query 272 nt)  
 72.8% identity

Ce résultat est en accord avec celui avancé par Yadav et *al.*, (1993) et suggère un mécanisme conservé de l'enzyme et une zone structurale commune aux deux désaturases permettant de reconnaître le substrat commun à savoir l'acide linoléique.

## 2- Effet du Norflurazon sur les ARNs des feuilles de soja

La figure 67 , montre la séparation des différents types d'ARNs foliaires des plantules de soja témoins et traitées par le norflurazon.

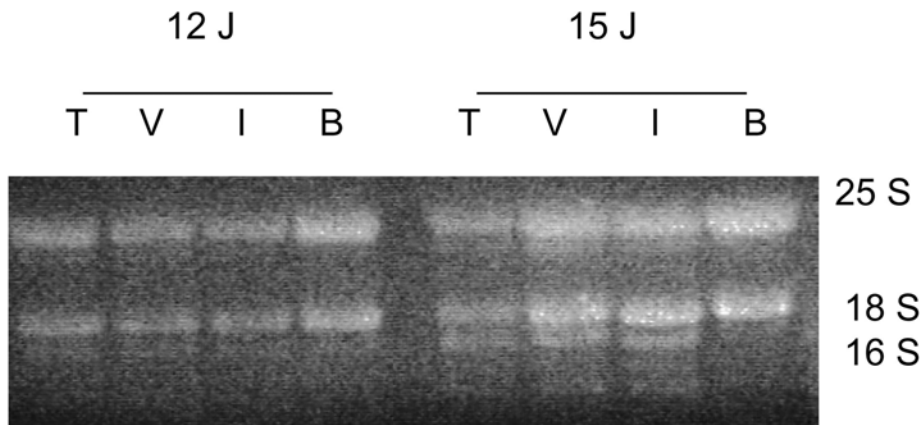


Figure 67 : Photographie sous UV d'un gel d'ARNs de feuilles de soja (témoins et traitées) coloré au bromure d'éthidium. (Un volume d'échantillon correspondant à 10 µg d'ARNs totaux est déposé par puit). T = témoin, V = verte, I = intermédiaire et B= blanche.

Il a été réalisé une cinétique d'extraction des ARNs (plantules âgées de 12 jours et 15 jours) à partir de feuilles de plantules témoins (T) et de feuilles de plantules traitées présentant divers phénotypes : plantules vertes (V), plantules panachées ou intermédiaires (I) ayant des feuilles à la fois vertes (ou jaunes) et blanches et des plantules blanches (B) avec des feuilles pratiquement albinos.

Il est observé dans les feuilles entièrement dépigmentées une disparition des ARNs ribosomiques chloroplastiques ; ce résultat est en accord avec ceux de Dalla Vecchia *et al.*, (2001) qui ont également observé une dégradation des ARNs ribosomiques chloroplastiques dans les feuilles de plantules de maïs traitées par le norflurazon.

Le norflurazon semble donc altérer fortement les chloroplastes agissant sur leur structure, leur composition et leur fonctionnement. En effet Reiss *et al.*, (1983) ont montré que les chloroplastes suite à une photooxydation sévère engendrée par le norflurazon, perdent leur activité photosynthétique et la plupart de leur structures internes tels les thylakoides et les ribosomes.

### 3 - Effet du norflurazon sur l'expression des gènes *FAD7* et *FAD3* dans les feuilles de soja

L'expression temporelle des deux gènes *FAD7* et *FAD3* dans les feuilles de plantules de soja témoins et traitées par le norflurazon est déterminée par le suivi des transcrits de ces deux gènes.

La figure 68, montre l'analyse par Northern blot du niveau de transcrits des gènes *FAD7* et *FAD3* dans les feuilles de plantules de soja témoins et traitées par le norflurazon.

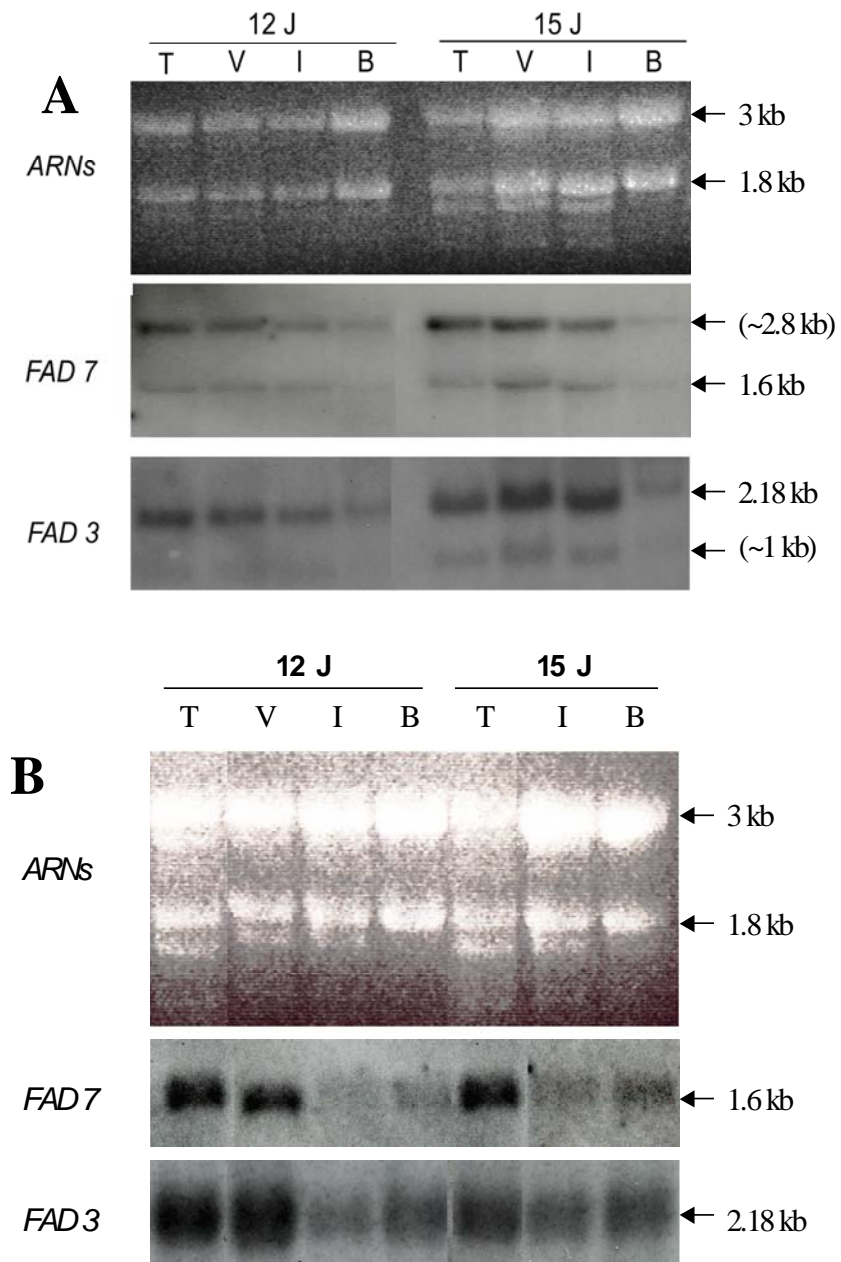


Figure 68 : Effet du norflurazon sur l'évolution du taux de transcrits des gènes *FAD3* et *FAD7* dans les feuilles de plantules de soja. (La charge relative des puits est montrée par la photographie sous UV du gel coloré au bromure d'éthidium).

### 3.1- Expression du gène *FAD7*

L'hybridation de la sonde radioactive *FAD7* révèle deux signaux l'un de 1.6 kb correspondant à la taille attendue et l'autre situé à un niveau plus élevé correspondant à environ 2.8 kb.

Dans les feuilles des plantules traitées mais demeurées vertes (V) ou partiellement dépigmentées mi blanches mi vertes (Intermédiaires ou I), le niveau de transcrits du gène *Fad7* est maintenu presque identique à celui des feuilles des plantules témoins (ou légèrement plus faible pour les plantules intermédiaires) et ceci aussi bien après 12 jours de croissance que 15 jours de croissance. Dans ces feuilles la protéine désaturase est donc toujours susceptible d'être synthétisée.

Dans les feuilles des plantules complètement dépigmentées par l'herbicide ou blanches (B) âgées de 12 et 15 jours, les transcrits *FAD7* sont fortement diminués voire même non détectables ce qui suggère une forte chute de la biosynthèse de la désaturase.

### 3.2- Expression du gène *FAD3*

L'hybridation de la sonde radioactive *FAD3* révèle également deux signaux (Fig. 68A) dont l'un de 2.18 kb correspondant à la taille attendue et un autre d'environ 1 kb.

Dans les feuilles vertes (V) et les feuilles mi vertes - mi blanches (I) des plantules âgées de 12 à 15 jours traitées par le norflurazon, il est constaté un certain maintien du niveau de transcrits du gène *FAD3* voire même une augmentation comparativement aux plantules témoins (Fig. 68A). Ceci suggère un maintien de la biosynthèse de la protéine ( $\Delta^{15}$  désaturase).

Dans les feuilles totalement dépigmentées par l'herbicide ou blanches (B), les transcrits *FAD3* sont très diminués voire même absents comparativement aux plantules témoins. Dans ces feuilles il n'y a plus de biosynthèse et il est fort probable que la protéine ( $\Delta^{15}$  désaturase) est très diminuée ou même carrément absente en fonction de sa demi vie.

Cependant dans une autre expérimentation (Fig. 68B), il est observé un maintien du niveau de transcrits dans les différents types de feuilles apparues après le traitement (vertes, mi-vertes mi-blanches et blanches).

Dans les feuilles mi-vertes mi-blanches (I), l'augmentation du niveau de transcrits autorisant une surexpression de la synthèse de l'enzyme pourrait représenter une réaction préventive avant la phase finale d'extinction dans la feuille appelée à devenir blanchâtre.

## Discussion

La diminution du niveau de C18 :3 lié au MGDG dans le chloroplaste sous l'effet du norflurazon serait dû non seulement à une inhibition de l'activité de la *FAD7* désaturase comme il est proposé dans la littérature mais aussi en partie à une répression de l'expression du gène codant pour cette désaturase et donc à la réduction de la quantité de l'enzyme.

Cependant dans certaines expérimentations (Fig. 68B), il est observé un certain maintien du niveau de transcrits dans les différents types de feuilles ce qui suggère que la protéine  $\omega^3$  désaturase continue d'être synthétisée dans les chloroplastes rudimentaires et que l'effet du norflurazon se manifeste à un niveau post transcriptionnel et post traductionnel. (Néanmoins l'extraction des lipides ayant été réalisée sur un mélange de feuilles moitié vertes ou intermédiaires et des feuilles entièrement blanches, l'extrapolation transcrits/activités s'avère difficile ; il se peut qu'en moyenne l'effet du norflurazon se manifeste aux différents niveaux, transcriptionnel et activité de l'enzyme).

La Rocca et *al.*, (1998) et Tamada et *al.*, (2003), travaillant respectivement sur des plantules d'orge et de maïs traitées par le norflurazon, ont montré que la destruction photooxydative des plantes entraîne une perte de l'expression de la plupart des gènes nucléaires codant pour les protéines des plastes ce qui appuie l'idée de Oelmüller et Mohr 1986 ; Susek et *al.*, 1993, Rodermel et *al.*, 2001 et Gray et *al.*, (2003), selon laquelle des facteurs plastidiaux libérés par les plastes intacts seraient nécessaires à la transcription des gènes nucléaires codant pour des protéines plastidiales.

La cible principale du norflurazon est la phytoène désaturase enzyme de la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste catalysant la désaturation du phytoène en phytofluène. La réaction de désaturation du linoléate en linoléinate liée au MGDG catalysée par la  $\omega^3$  désaturase est dans son ensemble une réaction de désaturation semblable à celle exercée par la phytoène désaturase. Nous essayons donc de faire un parallèle entre l'effet du norflurazon sur l'expression du gène *PDS* (phytoène désaturase) et celle du gène *FAD7*.

L'inhibition de la synthèse des caroténoïdes dans les plantules de tomate par des bleaching herbicides dont le norflurazon est accompagnée par une augmentation du niveau de mRNAs de la phytoène désaturase dans les feuilles blanches (Bartley et *al.*, 1992) ; Des observations similaires ont montré une accumulation de hauts niveaux de transcrits dans les tissus blancs de plantules de tomates traitées par le norflurazon (Giuliano et *al.*, 1993). Cette sur-accumulation de transcrits (up-regulation) n'est pas retrouvée lors des expériences menées par (Wetzel et Rodermel, 1998) sur les feuilles blanches de plantules d'*Arabidopsis* traitées par le norflurazon.

De leur côté, Simkin et *al.*, (2000) n'ont pas observé de grande différence du niveau de transcrits des gènes codant pour la phytoène synthétase (PSY), la phytoène désaturase (PDS) et la zeta carotène désaturase (ZDS) entre les feuilles des plantules de poivron témoins et celles devenues blanches après un traitement par le norflurazon. Ces données indiquent que la régulation de l'expression des principaux gènes codant pour les enzymes de biosynthèse des caroténoïdes n'est pas affectée par une diminution des caroténoïdes ou par une augmentation de leurs précurseurs dans les tissus.

La teneur en caroténoïdes et en chlorophylles ne paraît donc pas constituer des facteurs déterminants pour l'expression du gène *PDS* chez *Arabidopsis* vu qu'il n'y a pas de corrélation entre la pigmentation et le niveau de transcrits de certains gènes intervenant dans la biosynthèse des caroténoïdes.

Cependant Giuliano et *al.*, (1993) ont rapporté une augmentation d'un facteur 2 et 10 les niveaux de mRNAs de la phytoène synthétase et de la phytoène désaturase respectivement dans les plantules dépigmentées de tomates traitées par le norflurazon ; Simkin et *al.*, (2003) ont également observé une induction des gènes *PDS*, *ZDS* et *PTOX* (plastidial terminal oxidase) dans les plantules de tomates blanchies par un traitement au norflurazon.

Ces observations suggèrent un contrôle de l'expression des gènes *PDS* et *PSY* et *ZDS* régulé par le stress photooxydatif et/ou par les produits finaux de la caroténogénèse.

En définitive, la réduction du niveau d'acide linoléique lié au MGDG observé dans les feuilles des plantules traitées par le norflurazon a pour cause, donc à la fois la réduction du taux de transcrits du gène *FAD7* que nous avons observée dans les feuilles entièrement dépigmentées par l'herbicide donc à une perte de la protéine ( $\omega^3$  désaturase) mais aussi l'inhibition par l'herbicide de l'activité de cette enzyme (lorsqu'elle est présente), expérience faite avec l'oléate radioactif.

Dans certaines expérimentations, le taux de transcrits du gène *FAD7* ne varie pas de manière significative comparativement aux feuilles des plantules témoins. Dans ce cas, la diminution du C18 :3 lié au MGDG observée sous l'effet de l'herbicide serait plutôt due à la liaison de l'herbicide en des sites précis de cette enzyme l'empêchant de fonctionner ou encore au fait que l'enzyme ne trouve plus un environnement favorable à son activité : membranes chloroplastiques déstructurées (très forte chute des lipides galactolipides et PG et des caroténoïdes), ou encore à une diminution de l'activité photosynthétique et au manque d'énergie (feuilles albinos).

En ce qui concerne l'augmentation du taux de linoléate lié à la PC, nous avons émis l'hypothèse que cela pouvait provenir en partie de l'augmentation de l'expression du gène *FAD3* vu que nos résultats vont partiellement dans ce sens. En effet nous avons observé une accumulation des transcrits dans certaines feuilles avant le blanchiment total ce qui entraînerait une accumulation transitoire de la désaturase. Néanmoins l'extraction des lipides ayant été réalisée sur un mélange des feuilles à moitié blanches ou intermédiaires et des feuilles entièrement blanches, il est fort probable que l'effet du norflurazon se manifeste à différents niveaux.

L'augmentation sous l'effet du norflurazon, du C18 :3 lié à la PC et formé par l'action de la  $\Delta^{15}$  désaturase codée par le gène *FAD3* que nous avons observée serait liée en partie à une accumulation des transcrits du gène *FAD3* sous l'effet du norflurazon, à une augmentation du niveau de la protéine et/ou à une stimulation de l'activité de l'enzyme.

Shah et *al.*, (1997) ont observé une surexpression du gène *FAD3* désaturase chez un mutant d'*Arabidopsis* *ela<sub>1</sub>* (enhanced linolenate accumulation) contenant de hauts niveaux de linoléate et une réduction du niveau de linoléate (augmentation de 80% du niveau de transcrits par rapport au type sauvage). La majorité des mutants acides gras d'*Arabidopsis* isolés jusqu'à présent montrent une perte de la fonction du gène et une accumulation des produits intermédiaires aux dépens des lipides plus insaturés. L'exception du mutant *ela1* (Lemieux et *al.*, 1990) serait due à un linkage entre la mutation et le locus *FAD3* ce qui causerait une altération du promoteur ou

d'une autre région régulatrice du gène *FAD3* entraînant une augmentation de la transcription.

Chez les mutants *FAD7*, le compartiment extrachloroplastique présente également une déficience en acides gras insaturés liés aux phospholipides (Browse et *al.*, 1986) suite probablement à un blocage dans l'exportation des acides gras insaturés des plastes vers le réticulum endoplasmique.

Nos résultats par contre ont montré une augmentation du linoléate liée aux phospholipides dans le compartiment extrachloroplastique.

Il se peut donc que l'augmentation de PC 18 :3 sous l'effet du norflurazon découle de la forte détérioration du chloroplaste qui de ce fait ne sollicite plus les acides gras insaturés provenant de la PC et qui s'accumulent donc au niveau de ce phospholipide.

D'après nos résultats, nous proposons le schéma récapitulatif (Fig. 69), résumant les divers effets du norflurazon sur les activités de désaturation des lipides des feuilles de plantules de soja. Ces effets concernent l'aspect transcriptionnel des gènes *FAD7* et *FAD3* codant pour les deux désaturases, la quantité supposée de la protéine (désaturase) et le taux de C18 :3 MGDG et C18 :3 PC représentant les activités de désaturation.

La diminution du niveau de C18 :3 MGDG est due à une réduction du taux de transcrits du gène *FAD7* et donc probablement à la perte de la protéine ; il se peut aussi (dans les feuilles où la protéine est synthétisée) que cette diminution découle de l'inhibition de l'enzyme ( $\omega^3$  désaturase) par l'herbicide.

La présence d'un faible taux de transcrits du gène *FAD3* dans certaines feuilles dépigmentées indique que l'effet du norflurazon sur l'augmentation de C18 :3 PC se manifeste à un niveau post transcriptionnel et post traductionnel

Dans certaines feuilles dépigmentées où le niveau de transcrits du gène *FAD3* est relativement maintenu en présence de l'herbicide, l'augmentation du C18 :3 PC résulterait aussi de l'accumulation de la protéine par augmentation de son activité de synthèse.

## Discussion générale

Les feuilles de plantules de soja, à l'instar des feuilles des autres espèces végétales sont riches en galactolipides (52% des lipides foliaires). Ces lipides et plus particulièrement le MGDG, sont riches en acides gras insaturés : l'acide linoléique représente à lui seul 91% des acides gras du MGDG.

Dans les feuilles de soja, hormis le PG qui a une structure de type procaryote avec du C16 :1t en position sn-2 du glycérol, tous les autres lipides ont une structure de type eucaryote.

Les études de cinétique de marquage des molécules de PC et de MGDG après fourniture de précurseurs radioactifs [ $1-^{14}\text{C}$ ] acétate de sodium et [ $1-^{14}\text{C}$ ] oléate d'ammonium ont montré que PC est toujours le lipide le plus radioactif et que lorsque PC radioactive diminue dans le temps, le MGDG radioactif augmente, ce qui confirme l'idée avancée par de nombreux auteurs (Trémolières et *al.*, 1980 ; Drapier et *al.*, 1982 ; Roughan et Slack, 1982) du transfert de la PC via les DAG ou de la lysoPC (Bessoule et *al.*, 1995) vers le chloroplaste pour la synthèse du MGDG.

Le [ $1-^{14}\text{C}$ ] oléate d'ammonium fourni comme précurseur est acylé puis désaturé dans la molécule de PC qui représente bien le substrat préférentiel de l'oléoyl désaturase.; ce résultat est en accord avec plusieurs travaux menés sur les feuilles de diverses plantes : feuilles de pois (Trémolières et Mazliak, 1974 ; Serguini-Caid et *al.*, 1988), feuilles de fèves (Williams et *al.*, 1976), feuilles d'avoine (Ohnishi et Yamada, 1982) et feuilles d'olivier (Zarrouk et *al.*, 1990).

PG et MGDG sont également marqués après fourniture du [ $1-^{14}\text{C}$ ] oléate d'ammonium (dès 2 heures de marquage) ce qui suggère que l'acide oléique pénètre dans le chloroplaste et est acylé à ces deux molécules lipidiques. Pour le MGDG cependant, une partie de l'oléate proviendrait de la PC tel que montré par les courbes de cinétique d'incorporation du [ $1-^{14}\text{C}$ ] oléate dans PC et MGDG.

MGDG serait aussi substrat de l'oléoyl désaturase et linoléoyl désaturase vu que ce lipide présente de fortes proportions de C18 :2 et C18 :3 dès 2 heures après la fourniture du précurseur radioactif (résultats confirmés également par les calculs des indices de désaturations). A notre connaissance, seuls Zarrouk et ses collaborateurs (1990) ont évoqué le même mécanisme dans les feuilles d'olivier (plante également en C18 :3)

Alors, que de nombreux travaux stipulent que les acides linoléique et linoléique des galactolipides de type eucaryote proviennent de PC, nos résultats montrent donc que ces derniers sont largement synthétisés dans le chloroplaste ; les espèces moléculaires de PC à l'origine des DAG servant à la synthèse du MGDG ne sont donc pas toujours très insaturées comme c'est généralement rapporté dans la littérature ; les espèces moléculaires faiblement insaturées peuvent contribuer à la synthèse du MGDG.

Par ailleurs la comparaison des indices de désaturation dans les molécules de MGDG et PC montrent que ces derniers sont plus élevés dans le chloroplaste (en particulier l'indice de la linoléate désaturase) ce qui nous incite à avancer que le MGDG est le substrat préférentiel de la linoléate désaturase mais aussi qu'une part de 18 :3 acylé à la PC proviendrait du chloroplaste. L'exportation du linoléate à partir du chloroplaste a déjà été signalée par Browse et *al.*, (1993) dans des cas de mutation *Fad3*.

Les lipides constituent avec les protéines les éléments structuraux des membranes biologiques. Dans les membranes chloroplastiques, des pigments s'ajoutent à ces constituants structuraux. L'intégrité de ces membranes doit être maintenue pour qu'elles puissent assurer leurs fonctions. Des changements excessifs dans la composition en pigments, en lipides ou en leur acides gras constitutifs peuvent donc être néfastes pour la cellule.

Le traitement par le norflurazon (appliqué en présemis ou en préémergence) a montré que les faibles doses même si elles n'entraînent pas de modifications morphologiques apparentes peuvent diminuer les quantités de pigments caroténoïdes et chlorophylles.

La dose  $10^{-4}$ M (dose proche de celle utilisée en champs) fait apparaître divers phénotypes dont les plantules albinos. Ces plantules sont de taille réduite et sont pratiquement dépourvues de chlorophylles et de caroténoïdes.

Le norflurazon réduit donc drastiquement la synthèse des caroténoïdes en bloquant l'activité de la phytoène désaturase (Sandmann et Albrecht, 1990 ; Bramley, 1994). L'inhibition de cette biosynthèse entraîne un bleaching (albinisme) des feuilles nouvellement développées. Suite à cela, les protéines LHC des antennes collectrices d'énergie sont décomposées du fait de l'absence des pigments stabilisateurs (caroténoïdes et chlorophylles) (Yurina et Kloppstech 2001) ; la perte des caroténoïdes causant un stress photooxydatif important qui engendre la destruction des chlorophylles.

L'effet de cet herbicide est attribué non seulement à la perte de la photoprotection mais aussi au fait que l'accumulation massive du phytoène accélère la mort des cellules (Bramley, 1994 ; Jung et *al.*, 2000).

Outre son effet sur la biosynthèse des caroténoïdes, le norflurazon réduit les quantités des lipides des membranes chloroplastiques des feuilles de soja ce qui indique une atteinte des chloroplastes. Il augmente par contre les quantités des phospholipides PC et PE.

Les résultats obtenus suite à l'incorporation du [1-<sup>14</sup>C] acétate ont montré que entre 6 heures et 24 heures de marquage, le norflurazon réduit la quantité de lipides totaux radioactifs suite probablement à une diminution de la synthèse *de novo* de l'ensemble des acides gras dans les chloroplastes par freinage de l'acide gras synthétase. Pour des temps longs de marquage, le norflurazon semble plutôt accélérer la dégradation des lipides foliaires.

L'étude de la cinétique de marquage des classes lipidiques montre un effet identique du norflurazon sur les phospholipides PC, PE et PG : dans un premier temps (jusqu'à 24 heures de marquage) la synthèse de ces lipides est freinée par l'herbicide ; par la suite l'herbicide a tendance à accélérer la dégradation de ces lipides plus particulièrement celle du PG.

La radioactivité incorporée dans le MGDG continue d'augmenter jusqu'à 48 heures dans les feuilles des plantules traitées tout en étant freinée par l'herbicide particulièrement après 24 heures où il est noté une réduction de la biosynthèse du MGDG de 67%.

La réduction de la biosynthèse de l'ensemble des lipides polaires observée après marquage au [1-<sup>14</sup>C] acétate, peut découler du freinage de l'activité acide gras synthétase : de ce fait, il n'y a plus suffisamment d'acides gras disponibles pour estérifier les lipides polaires comme elle peut avoir pour cause un effet direct du norflurazon sur les enzymes impliquées dans leur biosynthèse (MGDG synthétase ou UDP galactose galactosyldiacylglycérol transférase, DGDG synthétase, CDPcholine phosphotransférase ect.....).

L'étude *in vitro* de la CDP-choline phosphotransférase sur des microsomes de feuilles de plantules témoins et de plantules traitées par le norflurazon confirme que ce dernier réduit la formation de la PC puisque l'activité CDP-choline phosphotransférase est réduite dans les plantules traitées.

L'augmentation en masse de PC que nous avons observée dans les plantules traitées serait donc due à un ralentissement de son acheminement vers le chloroplaste pour la fourniture des molécules de diacylglycérol.

Le norflurazon modifie également le degré d'insaturation des lipides membranaires des feuilles de soja. Il réduit le taux de 18 :3 MGDG ainsi que celui des espèces moléculaires 18 :3/18 :3 MGDG et élève les proportions des espèces moléculaires précurseurs 18 :2/18 :3 MGDG et 18 :2/18 :3 MGDG.

Le norflurazon réduit également les espèces moléculaires du PG ayant du C16 :1t.

Au niveau des phospholipides extrachloroplastiques, notamment au niveau de PC, le norflurazon augmente le niveau d'insaturation par augmentation du taux de 18 :3 et de la biosynthèse des espèces moléculaires 18 :3/18 :3 alors qu'il diminue le niveau des espèces moléculaires précurseurs 18:2/18:3, 18:2/18:2.

Ces résultats ont été clairement confirmés par l'utilisation du [1-<sup>14</sup>C] oléate d'ammonium qui montre une réduction du 18 :3 MGDG et des espèces moléculaires 18 :3/18 :3 MGDG ainsi qu'une augmentation du 18 :3 PC et des espèces moléculaires 18 :3/18 :3 PC.

Par ailleurs le norflurazon semble activer le système d'acylation et de déacylation au niveau de la PC. En effet il augmente l'activité *in vitro* de la lysoPC

acyltransférase dans les microsomes de feuilles des plantules traitées. Cette enzyme qui est liée au métabolisme de la PC dans le réticulum endoplasmique et qui fait partie du système de désaturation de l'oléate lié à la PC expliquerait en partie l'augmentation de l'insaturation de la PC dans les plantules traitées.

L'effet dépressif du norflurazon sur la désaturation du 18:2 MGDG en 18:3 MGDG est en accord avec celui de Norman et St John (1987); cependant alors que ces mêmes auteurs n'ont pas observé de modifications dans le niveau d'insaturation de la PC en présence de l'herbicide, nous avons obtenu une augmentation du 18:3 PC sous l'effet du norflurazon.

Notre étude du métabolisme lipidique a été complétée par une approche de biologie moléculaire portant sur l'expression des gènes *FAD7* et *FAD3* codant respectivement pour la  $\omega^3$  désaturase liée au MGDG et la  $\Delta^{15}$  désaturase liée à la PC intervenant dans la biosynthèse de l'acide linoléique.

L'analyse par northern blot a montré que les taux des transcrits des gènes *FAD7* et *FAD3* diminuent sous l'effet du norflurazon alors que l'effet du norflurazon sur les activités de désaturation est différent selon qu'il s'agisse du MGDG (inhibition) ou de la PC (activation). Cependant cet effet sur l'expression des gènes ne doit pas représenter le site de régulation majeure qui se situe probablement voire essentiellement à un niveau post transcriptionnel et/ou post traductionnel.

L'absence de travaux se rapportant à l'expression des gènes *FAD3* et *FAD7* en présence d'herbicide, nous a incités à discuter les résultats obtenus en comparaison avec ceux découlant de l'étude de l'expression du gène *PDS* codant pour la phytoène désaturase, cible principale du norflurazon.

Les nombreux travaux qui ont porté sur l'expression du gène *PDS* ont abouti à des résultats variables : certains menés sur les feuilles d'arabidopsis ont montré que le norflurazon ne varie pas le niveau de transcrits du gène codant pour la phytoène désaturase (Wetzel et Rodermel, 1998), d'autres effectués sur des plantules de tomates ont montré une augmentation du niveau d'expression du gène *PDS* (Giuliano et al., 1993) alors que l'enzyme est fortement inhibée par l'herbicide.

Par ailleurs comme le norflurazon agit sur les plantules en provoquant une destruction photooxydative des chloroplastes, l'expression de plusieurs gènes nucléaires codant pour des protéines destinées au chloroplastes (tels le gène *Rbcs* codant pour la petite sous unité ribulose 1,5 biphosphate carboxylase-/oxygénase ou le gène *Cab* codant pour le complexe chlorophylles a-b/proteines) est supprimée dans les plantules albinos suite à une interruption de signaux venant du chloroplaste en direction du noyau (Tamada et al., 2003 ; Gray et al., 2003).

Cependant comme le bleaching total n'est pas un événement courant dans la nature, l'induction ou la répression des gènes sous de telles conditions sévères ne doit pas refléter une situation physiologique significative.

Toutes les études menées *in vivo* et *in vitro* ont montré que le norflurazon agit de façon non compétitive sur l'activité de l'enzyme phytoène désaturase (Simkin et al., 2000 ; Breitenbach et al., 2001).

Concernant les désaturases liées au métabolisme lipidique, nous pensons que même si le norflurazon agit au niveau de l'expression des gènes, son action prédominante

se situerait au niveau des enzymes elles mêmes : les expériences avec l'oléate radioactif comme précurseur montrent bien cet impact au niveau de l'activité des désaturases chloroplastiques (du moins pour la  $\omega^3$  désaturase si nous faisons l'analogie avec la phytoène désaturase cible primaire du norflurazon).

Nous serions tentés de penser que cet effet sur les désaturases puisse être indirectement la conséquence de l'action de l'herbicide sur la voie de biosynthèse des caroténoïdes ; mais l'utilisation d'un pyridazinone substitué en l'occurrence le BASF 13 338 qui inhibe la  $\omega^3$  désaturase ( St John et *al.*, 1984 ; Norman et St John 1987) alors qu'il n'a pas du tout d'influence sur la biosynthèse des caroténoïdes élimine toute équivoque quant à l'action directe du norflurazon sur les désaturases chloroplastiques.

Le fait que l'ensemble de ces désaturases (phytoène désaturase et n-3 désaturases) qui sont codées par le génome nucléaire soient localisées dans l'enveloppe du chloroplaste (Ferro et *al.*, 2003) milite en faveur d'un effet direct et probablement semblable du norflurazon sur ces enzymes (les mécanismes de désaturation des acides gras sont dans leur ensemble identiques à ceux intervenant dans la désaturation du phytoène en phytofluène catalysée par la phytoène désaturase).

Les résultats obtenus sur les désaturases chloroplastiques (inhibition) et extrachloroplastique (activation) appuient l'idée rapportée dans plusieurs situations physiologiques (stress) ou génétiques (mutation) selon laquelle les plantes, du fait de l'organisation coopérative du métabolisme lipidique, sont capables de compenser une déficience dans la désaturation dans un compartiment (ici le compartiment chloroplastique) par une augmentation de ce mécanisme dans le compartiment non affecté (ici le réticulum endoplasmique) et donc de réguler la composition en acides gras.

L'augmentation du niveau de C18 :3 dans PC des plantes traitées peut résulter d'une augmentation des activités de désaturation dans le cytosol induite par l'inhibition de la voie de désaturation intrachloroplastique.

PC représente un pool lipidique actif distribuant les acides gras à différents autres lipides notamment les lipides chloroplastiques de type eucaryotes et en particulier le MGDG.

Il est probable également que l'augmentation de 18 :3PC sous l'effet du norflurazon découle de la forte détérioration du chloroplaste qui de ce fait ne sollicite plus les acides gras insaturés provenant de PC et qui s'accumulent donc au niveau de ce lipide.

La diminution de l'acide linoléique lié au MGDG peut découler aussi d'une accélération de la dégradation de cet acide gras suite au stress oxydatif engendré par l'herbicide : le MGDG « cracherait » le linoléinate sous l'action de lipases actives ; ce dernier serait alors soumis à l'action de lipoxigénases activées également par le stress oxydatif.

D'une façon générale, les lipides membranaires et leur degré d'insaturation sont le plus souvent modifiés par un changement des conditions externes de croissance des végétaux telles le stress thermique (Aid et *al.*, 1998), hydrique (Benhassaine-Kesri

et *al.*, 2002) salin (Sakamoto et Murata, 2002) ou encore chimique (Norman et St John., 1987).

Notre travail montre les répercussions du norflurazon sur un certain nombre d'enzymes impliquées dans les processus de biosynthèse des acides gras et des lipides (acide gras synthétase, MGDG synthétase, CDPcholine acyl transférase...), d'acylation du résidu oléate (acyl thiokinase et acyltransférase) et de sa désaturation ultérieure en acides linoléique et linoléinique (oléoyl désaturase et linoléoyl désaturase).

La diminution des lipides chloroplastiques et de leur insaturation provoque un dérèglement de l'organisation et du fonctionnement des membranes plastidiales : la fluidité membranaire étant régulée par les proportions relatives des lipides et des protéines mais aussi par la longueur et l'insaturation des chaînes d'acides gras composant ces lipides (Siegenthaller et Trémolières, 1998), toute modification dans l'insaturation peut réduire la fluidité membranaire ce qui à terme peut modifier certaines propriétés des membranes telles la perméabilité ou les activités enzymatiques.

## Conclusion générale

Le travail que nous avons effectué sur les plantules de soja, plante en C<sub>18:3</sub>, se veut une contribution à une meilleure compréhension du métabolisme lipidique de cette plante d'une part et d'autre part, du mode d'action du norflurazon sur ce métabolisme lipidique.

En définitive, le norflurazon induit un stress chimique qui entraîne l'inhibition des désaturases plastidiales phytoène désaturase (cible principale),  $\Delta^3$  PG trans désaturase et  $\omega^3$  désaturases. Le norflurazon semble intervenir sur les processus post transcriptionnels même si l'expression du gène codant pour la  $\omega^3$  désaturase est réduite dans les feuilles des plantules traitées.

L'ensemble des effets du norflurazon sur les enzymes chloroplastiques semblent surtout résulter d'un effet direct sur ces enzymes elles mêmes mais aussi du fait que ces dernières ne trouvent plus leur environnement naturel (déstructuration des membranes) ; il se peut qu'à ces mécanismes s'ajoute un manque d'énergie (ATP) du fait de la disparition quasi totale des pigments.

La diminution du linoléate dans le compartiment chloroplastique peut également provenir de l'accélération de son oxydation. Aussi, il serait intéressant d'approfondir la voie des oxylipines en présence du norflurazon.

De même qu'il serait intéressant d'étudier les mécanismes de détoxification mis en jeu par la plante pour faire face au stress oxydatif engendré par le norflurazon ainsi que l'expression des gènes codant pour des protéines impliquées dans des mécanismes de résistance au stress et de protection des plastes telles que la fibrilline (Chen et *al.*, 1998 ; Manach et Kuntz, 1999) et l'oxydase terminale plastidiale (Josse et *al.*, 2000).

Les grandes lignes du métabolisme lipidique des végétaux sont actuellement bien tracées ; cependant, les connaissances au niveau biochimique demeurent imprécises : de nombreuses enzymes (dont les désaturases membranaires) sont encore à isoler et le mécanisme final de leur régulation reste encore imparfaitement compris.

Les avancées dans le clonage et les manipulations des gènes des désaturases des acides gras ont été très importants ces dernières années.

L'utilisation d'herbicides inhibiteurs de la synthèse des acides gras insaturés tels les pyridazinones représente une autre approche dans l'étude du système de désaturation des acides gras.

Les herbicides représentent donc un outil de travail intéressant permettant une certaine approche des mécanismes physiologiques et biochimiques.

Ils sont également devenus incontournables dans la gestion de l'agriculture moderne mais leur utilisation doit impérativement tenir compte de leurs potentiels effets nuisibles.

Les enzymes de désaturation sont très importantes du point de vue biotechnologique car elles offrent des perspectives de production d'acides gras usuels dans des graines oléagineuses transgéniques (l'un des principaux buts de la biotechnologie est de produire des plantes accumulant de grandes quantités d'acides  $\gamma$  linoléique et arachidonique). La production d'une « huile designer » dans des plantes transgéniques peut devenir une réalité permettant de satisfaire la demande des industries chimiques et pharmaceutiques.

## **Références Bibliographiques**

- Abrous O., Benhassaine-Kesri G., Trémolières A. et Mazliak P. 1998** – Effect of norflurazon on lipid metabolism in soya seedlings. *Phytochemistry*, **49** (4), 979-985.
- Agnolucci L., Barbota R., Dalla Vecchia F., Tassani V., Ton E. et Rascio G., 1994** – Some effects of inhibited carotenogenesis on etioplasts membranes. *Giornale Botanico Italiano*, **128**, 577-578.
- Aid F., Kesri-Benhassaine G., Demandre C. et Mazliak P., 1998** – Modification of the biosynthesis of rape lipid molecular species by heat shock. *Phytochemistry*, **24** (7), 1195-1200.
- Alban C., Baldet P. et Douce R., 1994** – Localization and characterization of two structurally different forms of acetyl-CoA carboxylase in young pea leaves, of which one is sensitive to aryloxyphenoxypropionate herbicides. *Biochem. J.*, **300**, 557-565.
- Alban C., Jullien J., Job D. et Douce R., 1995** – Isolation and characterization of biotin carboxylase from pea chloroplasts. *Plant Physiol.*, **109**, 927-935.
- Anderson J.M. et Anderson B., 1982** – The architecture of photosynthetic membranes : lateral and transverse organization. *Trend Biochem. Sci.*, **7**, 288-292.
- Andrews J. et Mudd J.B. 1985** – Phosphatidylglycerol synthesis in pea chloroplasts. Pathways and localization. *Plant Physiol.*, **79**, 259-265.
- Andrews J., Ohlrogge J., et Keegstra K. 1985** - Final steps of phosphatidic acid synthesis in pea chloroplasts occurs in the inner envelope membrane. *Plant Physiol.*, **78**, 459-465.
- Ariizumi T., Kishitani S., Inatsugi R., Nishida I., Murata N et Toriyama K., 2002** – An increase in unsaturation of fatty acids in phosphatidylglycerol from leaves improves the rates of photosynthesis and growth at low temperatures in transgenic rice seedlings. *Plant Cell Physiol.*, **43** (7), 751-758.
- Aro E.M., Somersalo S. et Karunen P., 1987** – Membrane lipids in *Cearatodon purpureus* protonema grown at high and low temperatures. *Physiol. Plant.*, **69**, 65-72.
- Aronel V., Lemieux B., Hwang I., Gibson S., Goodman H.M. et Somerville C.R., 1992** – Map-based cloning of a gene controlling omega-3 fatty acid desaturation in *Arabidopsis*. *Science*, **258**, 1353-1355.
- Ashworth E.N., Christiansen M.N., St John J.B. et Patterson G.W., 1981** – Effect of temperature and BASF 13 338 on the lipid composition and respiration of wheat roots. *Plant Physiol.*, **67**, 711-715.
- Awai K., Marechal E., Block M.A., Brun D., Masuda T., Shimada H., Takamiya K., Ohta H. et Joyard J. 2001** – Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16 :3 and 18 :3 plants, differentially mediate galactolipid

syntheses in photosynthetic and non photosynthetic tissues in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98** (19), 10960-10965.

**Barbier-Brygoo H., Joyard J., Pugin A. et Ranjeva R., 1997** – Intracellular compartmentation and plant cell signalling. *Trends Plant Sci.*, **2**, 214-222.

**Barry P. et Pallet K.E., 1988** – In factors affecting herbicide activity and selectivity, Proc. EWRS, Symp., 51-56, *European Weed Research Society*, Wageningen.

**Bartels P.G. et Hyde A. 1970** – Chloroplast development in 4 chloro 5 dimethyl amino 2  $\alpha,\alpha,\alpha$ , trifluoro -m- tolyl 3-(2H) pyridazinone (Sandoz 6706) treated wheat seedlings. *Plant Physiol.*, **45**, 807-900.

**Bartley G.E., Viitanen P.V., Bacot K.O. et Scolnik P.A., 1992** – A tomato gene expressed during fruit rapening encodes an enzyme of the carotenoid nbiosynthesis pathway. *J. Biol. Chem.*, **267**, 5036-5039.

**Belbachir O., Matringe M., Tissut M. et Chevallier D., 1982** – Physiological action of dinoterb, a phenol derivative : 1 - Physiological effects on the whole plant and on tissue fragments of pea. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **14**, 303-308.

**Benhassaine-Kesri G., Aid F., Demandre C., Kader J.C. et Mazliak P., 2002** - Drought stress affects chloroplast lipid metabolism in rape (*Brassica napus*) leaves. *Physiol. Plant.*, **115**, 221-227.

**Bennoun P., 1998** –The molecular biology of chloroplasts and mitochondria in *Chlamydomonas*. In Rochais J.D., Goldschmidt M. et Merchant S., editors.. Dordrecht ; Kluwer Academic Publishers, 675-683.

**Bennoun P., 2001** – Chlororespiration and the process of carotenoid biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, **1506**, 133-142.

**Berberich T., Harada M., Sugawara K., Kodama H., Iba K. et Kusano T., 1998** - Two maize genes encoding  $\omega^3$  fatty acid desaturase and their differential expression to temperature. *Plant Mol. Biol.*, **36**, 297-306.

**Bessoule J.J., Testet E. et Cassagne C., 1995** – Synthesis of phosphatidyl-choline in the chloroplast envelope after import of lysophosphatidylcholine from endoplasmic reticulum membranes. *Eur. J. Biochem.*, **228**, 490-497.

**Beste C.E. et Humberg N.E., 1989** – Herbicide Handbook of the weed Science Society of America. Sixth ed., *Weed Science of America*. Champaign, IL.

**Birnboim H.C. et Doly J., 1979** – A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Ac. Res.*, **7**, 1513-1523.

**Bishop D.G., Sparace S.A. et Mudd J.B., 1985** – Biosynthesis of sulfoquinovosyldiacyl-glycerol in higher plants : the origine of the diacyl moiety. *Arch. Biochem. Biophys.*, **240**, 851-858.

- Blechert S., Brodschelm W., Holder S., Kammerer L., Kutchan T.M., Mueller M.J., Xia Z.Q. et Zenk M.H., 1995** – The octadecanoic pathway : signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4099-4105.
- Blee E. et Joyard J., 1996** – Envelope membranes from spinach chloroplasts are a site of metabolism of fatty acid hydroperoxidases. *Plant Physiol.*, **110**, 445-454.
- Bligh E.G. et Dyer W.J. 1959** – A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917.
- Block M.A., Dorne A.J., Joyard J. et Douce R., 1983a** – Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. I- Electrophoretic and immunochemical analyses. *J. Biol. Chem.*, **258**, 13273-13280.
- Block M.A., Dorne A.J., Joyard J. et Douce R., 1983b** – Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. II- Biochemical characterization. *J. Biol.Chem.*, **258**, 13281-13286.
- Böger P. et Sandmann G., 1998** – Carotenoid biosynthesis inhibitor herbicides-Mode of action and resistance mechanisms. *Pestic. Outlook*, **9**, 29-35.
- Bradford M.M., 1976** – A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, **7**, 248-254.
- Bramley P.M., 1994** – Carotenoid biosynthesis : a target site for bleaching herbicides. *Lipid Biochem. And Pestic Action.*, **22**, 625-629.
- Breitenbach J., Zhu C. et Sandmann G., 2001** – Bleaching herbicide norflurazon inhibits phytoene desaturase by competition with the cofactors. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 5270-5272.
- Brockman J.A., Norman H.A. et Hildebrand D.F., 1990** – Effects of temperature, light and chemical modulator on linolenate biosynthesis in mutant and wild type arabidopsis calli. *Phytochem.*, **29**, 1447-1453.
- Browse J., Kunst L., Anderson S., Hugly S. et Somerville C., 1989** – A mutant of *Arabidopsis* deficient in the chloroplast 16 :1/18 :1 desaturase. *Plant Physiol.*, **90**, 522-529.
- Browse J., MConn M., James D. et Miquel M., 1993** – Mutants of *Arabidopsis* deficient in the synthesis of  $\alpha$ -linolenate. Biochemical and genetic characterization of the endoplasmic reticulum linoleoyl desaturase. *J. Biol. Chem.*, **268**, 16345-16351.
- Browse J., McCourt P. et Somerville C., 1986** – A mutant of *Arabidopsis* deficient in C18 :3 and C16 :3 leaf lipids. *Plant Physiol.*, **81**, 859-864.

**Browse J. et Somerville C.R., 1991** – Glycérolipid biosynthesis : Biochemistry and regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **42** 467-506.

**Cahoon E.B., Lindqvist Y., Schneider G. et Shanklin J., 1997** – Redesign of soluble fatty acid desaturases from plants for altered substrate specificity and double bond position. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **94**, 4872-4877.

**Caiveau O., Fortune D., Cantrel C., Zachowski A. et Moreau F. 2001**-Consequences of omega-6- oleate desaturase deficiency on lipid dynamics and functional properties of mitochondrial membranes of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.*, **276**, 5788-5794.

**Carreau J.P. et Dubacq J.P., 1978** – Adaptation of the microscale method to microscale for fatty acid methyl transesterification of biological lipid extracts. *J. Chromatogr.*, **151**, 384-390.

**Chamovitz D., Pecker I. et Hirschberg J., 1991** – The molecular basis of resistance to the herbicide norflurazon. *Plant Mol. Biol.*, **16**, 967-974.

**Chen H.C., Klein A., Xiang M., Backhaus R.A. et Kuntz M., 1998** - Drought and wound induced expression in leaves of a gene encoding a chromoplast carotenoid-associated protein. *Plant J.*, **14**, 317-326.

**Chen L.J. et Li H., 1998** – A mutant deficient in the plastid lipid DGD is defective in protein import into chloroplasts. *Plant J.*, **16**, 33-39.

**Chung CT, Niemela SL. Et Miller RH. 1989** – One-step preparation of competent *Escherichia coli* transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 2172-2175.

**Citharel B., 1983** – Effets du calcium sur le fonctionnement des systèmes d'acylation et de désaturation des acides gras dans les racines d'une plante calcifuge. Thèse de 3<sup>ième</sup> cycle, Paris VI.

**Clarke I.E., Sandmann G., Bramley P.M. et Böger P. 1982** – Carotene biosynthesis with isolated photosynthetic membranes. *FEBS Lett.* **140**, 203- 206.

**Cline K., Andrews J., Mersey B., Newcomb E.H. et Keegstra K., 1981** – Separation and characterization of inner and outer envelope membranes of pea chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3595-3599.

**Cline K. et Keegstra K. 1983** - Galactosyl transferase involved in galactolipid synthesis are located in the outer membrane of pea chloroplast envelope. *Plant Physiol.*, **71**, 366-372.

**Cohen Z., Norman H.A. et Heimer Y.M., 1993** – Potential use of substituted pyridazinones for selecting polyunsaturated fatty acid overproducing cell lines of algae. *Phytochemistry*, **32** (2), 259-264.

- Covès J., Block M.A., Joyard J. et Douce R., 1986** – Solubilization and partial purification of UDP-galactose :diacylglycerol galactosyl transferase activity from spinach chloroplast envelope. *FEBS Lett.*, **208**, 401-406.
- Covès J., Pineau B., Block M.A., Joyard J. et Douce R., 1987** – Solubilization and partial purification of chloroplast envelope proteins : Application to UDP-galactose :diacylglycerol galactosyl transferase. In : Leaver C and Sze H (eds.) *Plant Membranes : Structure, Function, Biogenesis*, 103-112. Alan R. Liss, New York.
- Dahlin C., 1993** – Import of nuclear-encoded proteins into carotenoid-deficient young etioplasts. *Physiol. Plant.*, **87**, 410-416.
- Dahlin C. et Franzén L.G., 1997** – Carotenoid-deficient young wheat etioplasts are able to bind precursor protein on the plastid surface but are impaired in their translocation ability. *Physiol. Plant.*, **99**, 279-285.
- Dalla Vecchia F., Barbato R., La Rocca N., Moro I. et Rascio N., 2001**– Response to bleaching herbicides by leaf chloroplasts of maize plants grown at different temperatures. *Journal of Experimental Botany*, **52** (357), 811-820.
- Davies A.O. et Harwood J.L. 1983** – Effect of substituted pyridazinones on chloroplast structure and lipid metabolism in greening barley leaves. *J. Exp. Bot.*, **34**, 1089-1100.
- Dellaporta S.L., Wood J. et Hicks J.B. 1983** –A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Reporter*, **1** (4), 19-21.
- Demandre C., Trémolières A., Justin A.M. et Mazliak P. 1985** – Analysis of molecular species of plant polar lipid by high performance and gas chromatography. *Phytochem.*, **24**, 381-385.
- Demandre C., Trémolières A., Justin A.M. et Mazliak P. 1986** – Molecular desaturation in six phosphatidylcholine molecular species from potato tuber microsomes. *Biochem. Biophys. Acta*, **877**, 380-386.
- Demmig-Adams B. et Adams W.W. 1992** – Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**, 599- 626.
- Di Baccio D., Quartacci M.F., Dalla Vecchia F., La Rocca N., Rascio N. et Navari-Izzo F., 2002** – Bleaching herbicide effects on plastids of dark-grown plants : lipid composition of etioplasts in amitrole and norflurazon-treated barley leaves. *Journal of Experimental Botany*, **53** (376), 1857-1865.
- Dörmann P., Balbo I et Benning C., 1999** – *Arabidopsis* galactolipid biosynthesis and lipid trafficking mediated by DGD1. *Science*, **284**, 2181-2184.
- Dörmann P. et Benning C., 2002** – Galactolipids rule in seed plants. *Trends Plant Sci.*, **7** (3), 112-118.

- Dörmann P., Hoffmann-Benning S., Balbo I et Benning C., 1995** – Isolation and characterization of an *Arabidopsis* mutant deficient in the thylakoid lipid digalactosyl diacylglycerol. *Plant Cell*, **7**, 1801-1810.
- Dorne A.J., Block M.A., Joyard J. and Douce R., 1982** - The galactolipid-galactolipid galactosyl-transferase is located on the outer surface of the chloroplast envelope. *FEBS Lett.*, **145**, 30-34
- Dorne A.J. et Heinz E., 1989** – Position and pairing of fatty acids in phosphatidylglycerol from pea leaf chloroplasts and mitochondria. *Plant Sci.*, **60**, 39-46.
- Dorne A.J., Joyard J., Block M.A. et Douce R., 1985** – Localization of phosphatidylcholine in outer envelope membrane of spinach chloroplasts. *J. Cell. Biol.*, **100**, 1690-1697.
- Dorne A.J., Joyard J. et Douce R., 1990** – Do thylakoids really contain phosphatidylcholine? *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.*, **87**, 71-74.
- Douce R. et Joyard J., 1980** - Chloroplast envelope lipids : detection and biosynthesis. *Methods Enzymol.*, **69**, 290-301.
- Drapier D., Dubacq J., Trémolières A. et Mazliak P. 1982a** – Cooperative pathway for lipid biosynthesis in young pea leaves : oleate exportation from chloroplasts and subsequent integration into complex lipids of added microsomes. *Plant Cell Physiol.*, **23**, 125-135.
- Dubacq J.P., Drapier D. et Trémolières A., 1983** – Polyunsaturated fatty acid synthesis by mixture of chloroplasts and microsomes from spinach trienoic acids. *Plant Cell Physiol.*, **24**, 1-9.
- Dubacq J.P., Miquel M., Drapier D., Trémolières A. et Kader J.C., 1984**- Some aspects of the role of chloroplast envelope membranes in lipid metabolism. In : Siegenthaler P.A. and W. Eichenberger (eds.) :Structure, Function and Metabolism of Plant Lipids, 311-314, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Dubacq J.P. et Trémolières A., 1983** – Occurrence and function of phosphatidylglycerol containing  $\Delta^3$ - *trans*- hexadecenoic acid in photosynthetic lamellae. *Physiol.vég.*, **21**, 293-312.
- Dubertret G. Mirshahi A., Mirshahi M., Gerard Hirne C. et Trémolières A., 1994** – Evidence from *in vivo* manipulations of lipid composition in mutants that the  $\Delta^3$ - *trans*-hexadecenoic acid - containing phosphatidylglycerol is involved in the biogenesis of the light harvesting chlorophyll *a/b*- protein complex of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Biochem.*, **226**, 473-482.
- Duke S.O., 1985** – Effects of herbicides on non photosynthetic biosynthetic processus. Vol. II *Herbicide physiology*. S.O. Duke, Edt., 1985, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.

- Duke S.O., 1990** – Overview of herbicide mechanisms action. *Environnemental health perspectives*, **87**, 263-271.
- El Hafidi L., Pham Thi A.T., Zuily-Fodil Y. et Viera da Silva J., 1989** – Enzymatic breakdown of polar lipids in cotton leaves under water stress. I – degradation of monogalactosyldiacylglycerol. *Plant Physiol. Biochem.*, **27**, 495-502.
- El Maani A., Dubertret G., Delrieu M.J., Roche O. et Trémolières A., 1998** – Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* affected in phosphatidylglycerol metabolism and thylakoid biogenesis. *Plant Physiol. Biochem.*, **36** (8), 609-619.
- Fedtke C., 1982** – Pyridazinones In : Biochemistry and Physiology of Herbicide Action, Fedtke C., ed., Springer-Verlag, Heidelberg, 108-110.
- Ferro M., Salvi D., Brugière S., Miras S., Kowalski S., Louwagie M., Garin J., Joyard J. et Rolland N., 2003** – Proteomics of the chloroplast envelope membranes from *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Cell Proteomics*, **2**(5), 325-345.
- Feussner I. et Wasternack C., 2002** – The lipoxygenase pathway. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **53**, 275-297.
- Fox B.G., Shanklin J., Somerville C. et Munck E., 1993** – Stearoyl-acyl carrier  $\Delta^9$  desaturase from *Ricinus communis* is a diiron oxo proteine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 2486-2490.
- Frentzen M., 1993**- Acyltransferase and triacylglycerol. In : Moore ST Jr (ed) Lipid Metabolism in Plants, 195-230. CRC Press, Boca Raton
- Frentzen M., Heinz E., McKeon T.A. et Stumpf P.K., 1983** – Specificities and selectivities of glycerol-3-phosphate acyltransferase and monoacylglycerol-3-phosphate acyltransferase from pea and spinach chloroplasts. *Eur. J. Biochem.*, **129**, 629-636.
- Froehlich J.E., Benning C ; et Dörmann P., 2001** – The digalactosyldiacylglycerol (DGDG) synthase DGD1 is inserted into the outer envelope membrane of chloroplasts in a manner independent of the general import pathway and does not depend on direct interaction with monogalactosyldiacylglycerol synthase for DGDG biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **276** (34), 31806-31812.
- Gallis J.G., Watts J.L. et Browse J., 2002** – Polyunsaturated fatty acid synthesis : what will they think of next ? *TRENDS Biochem. Sci.*, **27** (9), 467-473.
- Gardiner S.E., Roughan P.G. et Browse J., 1984** – Glycerolipid labeling kinetics in isolated intact chloroplasts. *Biochem. J.*, **224**, 637-643.
- Garnier J., Wu B., Maroc J., Guyon D. et Trémolières A., 1990** – Restoration of both an oligomeric form of the light harvesting antenna CPII and a fluorescence state II-state I transition by  $\Delta^3$ -*trans* hexadecenoic acid- containing phosphatidylglycerol, in cells of a mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1020**, 153-162.

- Gee R.W., Beyrrum R.U., Gerber D.W. et Tolbert N.E., 1988a** – Dihydroxyacetone phosphate reductase in plants. *Plant Physiol.*, **86**, 98-103.
- Gee R.W., Goyal A., Gerber D.W., Beyrrum R.U. et Tolbert N.E., 1993** – Two isoforms of dihydroxyacetone phosphate reductase from the chloroplasts of I. *Plant Physiol.*, **103**, 243-249.
- Gharsalli M. et Cherif A., 1984** – Effect of sodium chloride on the sunflower plants lipids. In : *Structure, Function and Metabolism of Plant Lipid*. Siegenthaler P.A. and Eichenberger W. Eds. Elsevier Neuchâtel, Switzerland, 601-604.
- Gibson S., Arondel V., Iba K. et Somerville C., 1994** – Cloning of a temperature-regulated gene encoding a chloroplast  $\omega^3$  desaturase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, **106**, 1615-1621.
- Gibson S., Falcone DL, Browse J. et Somerville C, 1994** – Use of transgenic plants and mutants to study the regulation and function of lipid composition. *Plant Cell. and environment*, **17**, 627-637.
- Giuliano G., Bartley G.E. et Scolnik P.A., 1993** – Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *Plant Cell*, **5**, 379-387.
- Gounaris K. et Barber J., 1983** – Monogalactosyldiacylglycerol : The most abundant polar lipid in nature. *Trends Biochem. Sci.*, **9**, 378-381.
- Gray J.C., Sullivan J.A., Wang J.H., Jerome C.A. et MacLean D., 2003** – Coordination of plastid and nuclear gene expression. *Philos. Trans. R. Soc. Biol. Sci.*, **358**, 135-144.
- Gundlach H., Müller M.J., Kutchan T.M. et Zenk M.H., 1992** – Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor induced plant cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 2389-2393.
- Gut H., et Matile Ph., 1989** – Breakdown of galactolipids in senescent barley leaves. *Botanica Acta*, **102**, 31-36.
- Hamada T., Nishiuchi T., Kodama H., Nishimura M. et Iba K., 1996** – Cloning of wounding-inducible gene encoding a plastid  $\omega^3$  fatty acid desaturase from tobacco. *Plant Cell Physiol.*, **37**, 606-611.
- Hamrouni I., Hammadi B.S. et Marzouk B., 2001** – Effects of water-deficit on lipids of safflower aerial parts. *Phytochemistry*, **58**, 277-280.
- Hartel H. et Benning C., 2000** – Can digalactosyldiacylglycerol substitute for phosphatidylcholine upon phosphate deprivation in leaves and roots of *Arabidopsis* ? *Biochem. Soc. Trans.*, **28**, 729-732.
- Hartel H., Dörmann P. et Benning C., 2000** – DGD1-independent biosynthesis of extraplastidic galactolipids after phosphate deprivation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97** (19), 10649-10654.

**Hartel H., Lokstein H., Dormann P., Grimm B. et Benning C., 1997** – Changes in the composition of the photosynthetic apparatus in the galactolipid-deficient *dgd1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, **115** (3), 1175-1184.

**Hartel H., Lokstein H., Dörmann P., Grimm B. et Benning C., 2000** – Changes in the composition of the photosynthetic apparatus in the galactolipid-deficient *dgd1* mutant. *Plant Physiol.*, **115**, 1178-1184.

**Hartel H., Lokstein H., Dörmann P., Trethewey N.T. et Benning C., 1998** – Photosynthetic light utilization and xanthophyll cycle activity in the galactolipid deficient *dgd1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.*, **36**, 407-417.

**Harwood J.L., 1980** – Fatty acid synthesis. In Biogenesis and function of plant lipids. Mazliak P., Benvediste P., Costes C. et Douce R. eds., Elsevier, Amsterdam, 143-152.

**Harwood J.L., 1991a** – Herbicides affecting chloroplast lipid synthesis. In : baker NR and Percival M.P. (eds) Herbicides 209-246, Elsevier, Amsterdam.

**Harwood J.L., 1996** – Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta*, **1301**, 7-56.

**Havaux M., 1998** – Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends in Plant Science*, **3**, 147-151.

**Heemskerk J.W.M., Story T., Schmidt R.R. et Heinz E., 1990** – Biosynthesis of digalactosyldiacylglycerol in plastids from 16 :3 and 18 :3 plants. *Plant Physiol.*, **93**, 1286-1294.

**Heemskerk J.W.M. et Wintermans J.F.G.M. 1987** – Role of the chloroplast in leaf acyl synthesis. *Physiol. Plantarum*, **70**, 558-568.

**Heemskerk J.W.M., Wintermans J.F.G.M., Joyard J., Block M.A., Dorne A.J. et Douce R., 1986** – Localization of galactolipid : galactolipid galactosyltransferase and acyltransferase in outer envelope membrane of spinach chloroplasts. *Biochem. Biophys. Acta*, **877**, 281-289.

**Heinz E., 1977** – Enzymatic reactions in galactolipid biosynthesis. In Tevini M and Lichtenthaler H.K. eds, Lipids and Lipid polymers, 102-120. Springer Verlag, Berlin.

**Heinz E., 1993** – Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. In : Moore ST Jr (ed) Lipid Metabolism in Plants, 34-89, CRC Press, Boca Raton.

**Heinz E. et Roughan P.G., 1983** – Similarities and differences in lipid metabolism of chloroplasts isolated from 18 :3 and 16 :3 plants. *Plant Physiol.*, **72**, 273-279

**Heppard E.P., Kinney A.J., Stecca K.L. et Miao G.H., 1996** – Developmental and growth temperature regulation of two different microsomal  $\omega^6$  desaturase genes in soybeans. *Plant Physiol.*, **110**, 311-319.

- Hills M.J., Dann R., Lydiate D. et Sharpe A., 1994** – Molecular cloning of a cDNA from *Brassica napus* L. for a homologue of acyl-CoA-binding protein. *Plant Mol. Biol.*, **25**, 917-920.
- Hitz W.D., Carlson T.J., Booth R., Kinney A.J., Stecca K.L. et Yadav N.S., 1994** – Cloning of a higher plant plastid  $\omega^6$  fatty acid desaturase cDNA and its expression in a cyanobacterium. *Plant Physiol.*, **105**, 635-641.
- Hobe S., Prytulla S., Külbrandt W. et Paulsen H., 1994** – trimerization and crystallization of reconstituted light-harvesting chlorophyll *a/b* complex. *EMBO J.*, **13**, 3423-3429.
- Horrobin DF., 1992** – Nutritional and medical importance of gamma linolenic acid. *Prog. Lipid Res.*, **31**, 163-194.
- Hubac C., Guerrier D., Ferran J. et Trémolières A., 1989** – Change of leaf lipid composition during water stress in two genotypes of *Lupinus albus* resistant or susceptible to drought. *Plant Physiol. Biochem.*, **27** (5), 737-744.
- Hugly S. et Somerville C., 1992** – A role for membrane lipid polyunsaturation in chloroplast biogenesis at low temperature. *Plant Physiol.*, **99**, 197-202.
- Iba K., Gibson S., Nishiuchi T., Fuse T., Nishimura M., Arondel V., Hugly S. et Somerville C., 1993** – A gene encoding a chloroplast  $\omega^3$  fatty acid desaturase complements alterations in fatty acid desaturation and chloroplast copy number of the *fad7* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry*, **268** (32), 24099-24105.
- Innis SM., 1993** - Essential fatty acid requirements in human nutrition. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **71** (9), 699-706.
- Ishiguro S., Kawai-Oda, A., Ueda K., Nishida I. and Okada K., 2001.** The defective in anther dehiscence gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **13**, 2191–2209
- Jäger-Vottero P., Dorne A.J., Jordanov J., Douce R. et Joyard J., 1997** – Redox chains in chloroplast envelope membranes: spectroscopic evidences for the presence of electron carriers, including iron-sulfur centers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 1597-1602.
- Jarvis P., Dörmann P., Peto C.A., Lutes J., Benning C. et Chory J., 2000** – Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the *Arabidopsis MGD synthase 1* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97** (14), 8175-8179.
- Jaworsky J.G., 1987** – Biosynthesis of monoenoic and polyenoic fatty acids, in : P.K. Stumpf (ED.), *The Biochemistry of Plants*. Vol. **9**, Academic Press, Orlando, FL, 159-174.

- Jolliot A., Justin AM., Bimont E. et Mazliak P., 1982** – Regulation by lipids of plant microsomal enzymes. III. Phospholipid dependence of cytidine-diphosphocholine phosphotransferase of potato microsomes. *Plant Physiol.*, **70**, 206-210.
- Josse E.M., Simkin A.J., Gaffe J., Labouré A.M., Kuntz M. et Carol P, 2000** - A plastid terminal oxidase associated with carotenoid desaturation during chromoplast differentiation. *Plant physiol.*, **123**, 7427-7436.
- Jouhet J., Marechal E., Bligny R., Joyard J. et Block M.A., 2003** - Transient increase of phosphatidylcholine in plant cells in response to phosphate deprivation. *FEBS Lett.*, **544**(1-3), 63-68.
- Joyard J., Blée E., et Douce R., 1986** – Sulfolipid synthesis from  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  and  $[1-^{14}\text{C}]$  acetate in isolated intact spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, **879**, 78-87.
- Joyard J., Block M.A. et Douce R. 1991** – Molecular aspects of plastid envelope biochemistry. *Eur. J. Biochem.*, **199**, 489-501. FEBS
- Joyard J. et Douce R., 1979** – Characterization of phosphatidate phosphohydrolase activity associated with chloroplast envelope membranes. *FEBS Lett.*, **102**, 147-150.
- Joyard J. et Douce R., 1987** – Galactolipid biosynthesis. In : Stumpf P.K. (ed) *The Biochemistry of Plants, Vol 9, Lipids : Structure and function*, 215-274. Academic Press, New York.
- Joyard J. et Stumpf P.K., 1981** – Synthesis of long-chain acyl CoA in chloroplast envelope membranes. *Plant Physiol.*, **67**, 250-256.
- Joyard J., Teyssier E., Miège C., Berny-Seigneurin D., Maréchal E., Block M.A., Dorne A.J., Rolland N., Ajlani G. et Douce R., 1998** – The biochemical machinery of plastid envelope membranes. *Plant Physiol.*, **118**, 715-723.
- Jung S. Y., Kernodle S.P., et Scandalies J.G., 2001**- Differential antioxidant responses to norflurazon induced oxidative stress in maize. *Redox Rep.* **6** (5), 311-317.
- Jung S.Y., Kim J.S., Cho K.Y., Tae G.S. et Kang B.G., 2000** – Antioxidant responses of cucumber (*Cucumis sativus*) to photoinhibition and oxidative stress induced by norflurazon under high and low PPFDs. *Plant Science*, **153**, 145-154.
- Kader J.C., 1996** – Lipid transfert proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **47**, 627-654.
- Kader J.C., Julienne M. et Vergnolle C., 1984** – Purification and characterization of a spinach leaf protein capable of transferring phospholipids from liposomes to mitochondria or chloroplasts. *Eur. J. Biochem.*, **139**, 411-416.
- Kanervo E., Aro, E.M., et Murata N. 1995** – Low insaturation level of thylacoid membrane lipids limits turnover of the D<sub>1</sub> protein of photosystem II at high irradiance. *FEBS Lett.*, **364** (2), 239-242.

**Kelly A.A. et Dörmann P., 2002** – *DGD2*, an *Arabidopsis* gene encoding a UDP-galactose dependent digalactosyldiacylglycerol synthase is expressed during growth under phosphate limiting conditions. *J. Biol. Chem.*, **227**, 1166-1173.

**Kleppinger-Sparace K.F., Mudd J.B. et Bishop D.J., 1985** – Biosynthesis of sulfoquinovosyl-diacylglycerol in higher plants: The incorporation of  $^{35}\text{SO}_4$  by intact chloroplasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **240**, 859-865.

**Knowles J.R., 1989** – The mechanism of biotin-dependent enzymes. *Ann. Rev. Biochem.*, **58**, 195-221.

**Khan M.U., Lem N.W., Chandorkar K.R. et Williams J.P. 1979** – Effects of substituted pyridazinones (San 6706, San 9774, San 9785) on glycerolipids and their associated fatty acids in the leaves of *Vicia faba* and *Hordeum vulgare*. *Plant Physiol.*, **64**, (2), 300-305.

**Klaus D., Härtel H., Fitzpatrick L.M., Froehlich J.E., Hubert J., Benning C. et Dörmann P., 2002** – Digalactosyldiacylglycerol synthesis in chloroplast of the *Arabidopsis* *dgd1* mutant. *Plant Physiol.*, **128**, 885-895.

**Kodama H., Hamada T., Horiguchi G., Nishimura M. et Iba K., 1994** – Genetical enhancement of cold tolerance by expression of a gene for chloroplast omega-3 fatty acid desaturase in transgenic tobacco. *Plant Physiol.*, **105**, 601-605.

**Koiwai A., Matsuzaki T. et Suzuki F., 1981** – Changes in total polar lipids and their fatty acid composition in tobacco leaves during growth and senescence. *Plant Cell Physiol.*, **22**, 1059-1065.

**Krieger-Liszkay A. et Rutherford A.W., 1998** – Influence of herbicide binding on the redox potential of the quinone acceptor in photosystem II: relevance to photodamage and phytotoxicity. *Biochemistry*, **37**, 17339-17344.

**Kunst L., Browse J., et Somerville C., 1988** – Altered regulation of lipid biosynthesis in a mutant of *Arabidopsis* deficient in chloroplast glycerol-3-phosphate acyltransferase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 4143-4147.

**Kunst L., Browse J., et Somerville C., 1989a** – A mutant of *Arabidopsis* deficient in desaturation of palmitic acid in leaf lipids. *Plant Physiol.*, **90**, 943-947.

**Kunst L., Browse J., et Somerville C., 1989b** – Enhanced thermal tolerance in a mutant of *Arabidopsis* deficient in palmitic acid unsaturation. *Plant Physiol.*, **91**, 401-408.

**La Rocca N., Bonora A., Dalla Vecchia F., Barbato R. et Rascio N., 1998** – Effects of amitrole and norflurazon on carotenogenesis in barley plants grown at different temperatures. In Garab G. (ed) photosynthesis: mechanisms and effects, vol V. Kluwer, Dordrecht, 3459-3462.

**La Rocca N., Rascio N., Oster U. et Rüdiger W., 2001** – Amitrole treatment of etiolated barley seedlings leads to deregulation of tetrapyrrole synthesis and to reduced expression of *Lhc* and *RbcS* genes. *Planta*, **213**, 101-108.

- Lee A.G., 2000** – Membrane lipids : it is only a phase. *Curr. Biol.*, **10**, 377-380.
- Lem N.W. et Williams J.P., 1981** – Desaturation of fatty acids associated with monogalactosyldiacylglycerol : the effects of San 6706 and San 9785. *Plant Physiol.*, **68**, 944-949.
- Lem N.W. et Williams J.P., 1983** – Changes in the <sup>14</sup>C-labelling of molecular species of 3 monogalactosyl 1,2 diacylglycerol in leaves of *Vicia faba* treated with compound San 9785. *Biochem. J.*, **209** (2), 513-518.
- Lemieux B., Miquel M., Somerville C. et Browse J., 1990**- Mutants of *Arabidopsis* with alterations in seed lipid fatty acid composition. *Theor. Appl. Genet.*, **80**, 234-240.
- Lepage M. 1967** – Identification and composition of turnip root lipids. *Lipids*, **2**, 244-250.
- Li C., Liu G., Xu C., Lee G.I., Bauer P., Ling H.Q., Ganai M.W. et Howe G.A., 2003** – The tomato suppressor of prosystemin-mediated response 2 gene encodes a fatty acid desaturase required for the biosynthesis of jasmonic acid and the production of a systemic wound signal for defense gene expression. *Plant Cell*, **15** (7), 1646-1661.
- Lichtenthaler H.K. 1987** – Chlorophylls and carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methodes in enzymology*, **148**, 350-382.
- Lichtenthaler H.K., 1999** – The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **50**, 47-65.
- Lightner J., James D.W. Jr., Dooner H.K. et Browse J., 1994b** – Altered body morphology is caused by increased stearate levels in a mutant of *Arabidopsis*. *Plant J.*, **6**, 401-412.
- Linden H., Sandmann G., Chamovitz D., Huiseberg J. et Böger P. 1990** – Biochemical characterization of *synecchococcus* mutants selected against the bleaching herbicide norflurazon. *Pest. Biochem. Physiol.*, **36**, 46-51.
- Lindqvist Y., Huang W., Schneider G. et Shanklin J., 1996** – Crystal structure of  $\Delta^9$  stearoyl-acyl carrier protein desaturase from castor seeds and its relationship to other di-iron proteins. *EMBO J.*, **15**, 4081-4092.
- Liu L. et Whrite M.J. 1998** – Ultraviolet B responses of nuclear genes encoding light harvesting complex II proteins in pea *Pisum sativum* are altered by norflurazon and photobleaching induced chloroplast changes. *Physiologia Plantarum*, **102**, 128-138.
- Madrid S.M. et Wettstein P., 1991** – Reconciling contradictory notions of lipid transfer protein in higher plants. *Plant Physiol. Biochem.*, **29**, 705-711.

**Manac'h N. et Kuntz M., 1999** – Stress induction of a nuclear gene encoding for a plastid protein is mediated by photo-oxidative events. *Plant Physiol. Biochem.*, **37**, 859-868.

**Mangold H.K. 1961** – Thin layer chromatography of lipids. *J. Am. Oil Chemist's Soc.*, **38**, 708-724.

**Mangold H.K. 1964** – Thin layer chromatography of lipids. *J. Am. Oil Chemist's Soc.*, **47**, 762-773.

**Maréchal E., Block M.A., Joyard J. et Douce R., 1994** – kinetic properties of monogalactosyldiacylglycerol synthase from spinach chloroplast envelope membranes. *J. Biol. Chem.*, **269**, 5788-5798.

**Markgraf T. et Oelmüller R., 1991** – Evidence that carotenoids are required for the accumulation of a functional photosystem II, but not photosystem I in the cotyledons of mustard seedlings. *Planta*, **185**, 97-104.

**Martinez –Ferez I. et Vioque A., 1992** – Nucleotide sequence of the phytoene desaturase gene from *Synechocystis sp.* PCC 6803 and characterization of a new mutation which confers resistance to the herbicide norflurazon. *Plant Mol. Biol.*, **18**, 981-983.

**Mayfield S.P., Nelson T. et Taylor W.C., 1986** – The fate of chloroplast proteins during photooxidation in carotenoid-deficient maize leaves. *Plant Physiol.*, **82**, 760-764.

**MCConn M. et Browse J., 1996** – The critical requirement for linolenic acid is for pollen development, not photosynthesis in an *Arabidopsis* mutant. *Plant Cell.*, **8**, 403-416.

**MCConn M. et Browse J., 1998** – Polyunsaturated membranes are required for photosynthetic competence in a mutant of *Arabidopsis* ; *Plant J.*, **15**, 521-530.

**MCConn M., Hugly S., Somerville C. et Browse J., 1994** – A mutant at the *fad8* locus of *Arabidopsis* identifies a second chloroplast  $\omega^3$  desaturase. *Plant Physiol.*, **106**, 1609-1614.

**McKeon T.A. et Stumpf P.K., 1982** – Purification of the stearyl-acyl carrier protein desaturase and the acyl-acyl carrier protein thioesterase from maturing seeds of safflower. *J. Biol. Chem.*, **257**, 12141-12147.

**Metcalf L.D., Shmitz A.A. et Pelka J.R., 1966** – Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatography analysis. *Anal. Chem.*, **38**, 514-515.

**Miège C., Marechal E., Shimojima M., Awai K., Block M.A., Ohta H., Takamiya K., Douce R. et Joyard J., 1999** –Biochemical and topological properties of type A MGDG synthase, a spinach chloroplast envelope enzyme catalysing the synthesis of both procaryotic and eucaryotic MGDG. *Eur. J. Biochem.*, **265**, 990-1001.

- Miquel M. et Browse J., 1992** – Arabidopsis mutants deficient in poly-unsaturated fatty acid synthesis. Biochemical and genetic characterization of a plant oleoyl-phosphatidylcholine desaturase. *J. Biol. Chem.*, **267**, 1502-1509.
- Miquel M. et Browse J., 1998** – Arabidopsis lipids : A fat chance. *Plant Physiol. Biochem.*, **36**, 187-197.
- Miquel M., James D., Dooner H ; et Browse J., 1993** – Arabidopsis requires polyunsaturated lipids for low temperature survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 6208-6212.
- Minoda A., Sato N., Nozaki H., Okada K., Sonoike K. et Tsuzuki M., 2002** – Role of sulfoquinovosyldiacylglycerol for the maintenance of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J ; Biochem.*, **269**, (9), 2353-2358.
- Mongrand S., Bessoule J.J. et Cassagne C., 1997** – A re-examination *in vivo* of the phosphatidylcholine-galactolipid metabolic relationship during plant lipid biosynthesis. *Biochem. J.*, **327**, 853-858.
- Mongrand S., Cassagne C. et Bessoule J.J., 2000** – Import of Lysophosphatidylcholine into chloroplasts likely at the origin of eucaryotic plastidial lipids. *Plant Physiol.*, **122**, 845-852.
- Monteiro de Paula F., Pham Thi A.T., Viera da Silva J., Justin A.M., Demandre C. et Mazliak P., 1990** – Effects of water stress on the molecular species composition of polar lipids from *Vigna unguiculata* L. leaves. *Plant science*, **66**, 185-193.
- Moore T.S., 1982** – Phospholipid biosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **33**, 235-239.
- Moore T.S., 1990** – Enzymes of phospholipids synthesis. *Methods Plant Biochem.*, **3**, 229-239.
- Mourad G. et King J., 1992** – Effect of four classes of herbicides on growth and acetolactate synthase activity in several variants of *Arabidopsis thaliana*. *Planta.*, **107**, 43-52.
- Mullis K.B., Faloona F.A., Scharf S.J., Saiki G., Horn G.T. et Erlich H.A., 1986** – Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro* : the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **51**, 263-273.
- Murata N., Sato N., Takahashi N et Hamazaki Y., 1982** – Composition and positional distributions of fatty acids in phospholipids from leaves of chilling-sensitive and chilling-resistant plants. *Plant Cell Physiol.*, **23**, 1071-1079.
- Murata N. et Wada H., 1995** – Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria. *Biochem. J.*, **308**, 1-8.
- Murphy D.J., Harwood J.L., Lee K.A., Roberto F., Stumpf P.K., et St John J.B., 1985a** – Differential responses of a range of photosynthetic tissues to a

substituted pyridazinone, Sandoz 9785. Specific effects on fatty acid desaturation. *Phytochem.*, **24**, 1923-1929.

**Murphy D.J., Mukherjee K.D. et Latzko E., 1983a** – Lipid metabolism in microsomal fraction from photosynthetic tissue. Effect of catalase and hydrogen peroxide on oleate desaturation. *Biochem. J.*, **213**, 249-252.

**Murphy D.J., Mukherjee K.D. et Latzko E., 1984a** – Oleate metabolism in microsomes from developing leaves of *Pisum sativum* L. *Planta*, **161**, 249-254.

**Murphy D.J. et Piffanelli P., 1998** – Fatty acid desaturases : structure, mechanism and regulation. In : Plant Lipid Biosynthesis : Fundamentals and Agriculture Application (Harwood J.L., ed) 95-130. Cambridge University. Press Cambridge.

**Murphy, D.J., Woodrow I.E. et Mukherjee K.D., 1985** – Substrate specificities of the enzyme of oleate desaturase system from photosynthetic tissue. *Biochem. J.*, **225**, 267-270.

**Myers E.W. et Miller W., 1989** – Optimal alignments in linear-space. *Comput. Appl.Biosci.*, **4**, 11-17.

**Napier J.A., Michaelson L.V. et Sayanova O., 2003** – The rôle of cytochrome b<sub>5</sub> fusion desaturases in the synthesis of polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **68**, 135-143.

**Napier J.A., Michaelson L.V. et Stobart K., 1999** – Plant desaturases : harvesting the fat of the land. *Current Opinion in Plant Biology*, **2**, 123-127.

**Napier J.A., Sayanova O., Stobart A.K. et Shewry P.R., 1997** - A new class of cytochrome b<sub>5</sub> fusion proteins. *Biochem. J.*, **328**, 717-720.

**Navari-Izzo F., Quartacci M.F. et Izzo R., 1989** – Lipid changes in maize seedlings in response to field water deficit. *Journal of Experimental Botany*, **40**, 675-680.

**Neuringer M., Anderson G.J. et Connor W.E., 1988** – The essentiality of n-3 fatty acids for the development and function of the retina and brain. *Ann. Rev. Nutr.*, **8**, 517-541.

**Nicolau B.J., Ohlrogge J.B. et Wurtele E.S., 2003** – Plant biotin-containing carboxylases. *Arch. Biochem. Biophys.*, **414**, 211-222.

**Norman H.A et St John J.B., 1986** - Metabolism of unsaturated monogalactosyldiacylglycerol molecular species in *Arabidopsis thaliana* reveals different sites and substrates for linolenic acid synthesis. *Plant Physiol.*, **81**, 731-736.

**Norman H.A, Pillai P. et St John J.B 1991** – *In vitro* desaturation of monogalactosyldiacylglycerol and phosphatidylcholine molecular species by chloroplast homogenates. *Phytochemistry*, **30** n° 7, 2217-2222.

- Norman H.A et St John J.B., 1987** – Differential effect of a substituted pyridazinone BASF 13 338 on pathways of monogalactosyldiacylglycerol synthesis. *Plant Physiol.*, **85**, 684-688.
- Norris S. R. , Barrette T.R. et Della Penna D., 1995** – Genetic dissection of carotenoid synthesis in *Arabidopsis* defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. *Plant Cell*. **7**, 2139-2149.
- Nussberger S., Dörr K., Wang D.N. et Kühlbrandt W., 1993** – Lipid-protein interactions in crystals of plant light-harvesting complex. *J. Mol. Biol.*, **234**, 347-356.
- Oelmüller R. et Mohr H., 1986** – Photooxidative destruction of chloroplasts and its consequences for expression of nuclear genes. *Planta*, **167**, 106-113.
- Ohlrogge J.B. et Browse J., 1995** – Lipid biosynthesis. *Plant Cell.*, **7**, 957-970.
- Ohlrogge J.B., Browse J. et Somerville C.R., 1991**- The genetics of plant lipids. *Biochem. Biophys. Acta.*, **1082**, 1-26.
- Ohlrogge J.B. et Jaworski J.G., 1997** - Regulation of fatty acid synthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **48**, 109-136.
- Ohlrogge J.B., Kuhn D.N. et Stumpf P.K., 1979** – Subcellular localization of acyl carrier protein in leaf protoplasts of *Spinacia oleracea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76**, 1194-1198.
- Ohnishi J.I., et Yamada M., 1980** – Glycerolipid synthesis in *Avena* leaves during greening of etiolated seedlings II.  $\alpha$  linolenic acid synthesis. *Plant Physiol.* **81**, 731-736.
- Okuley J., Lightner J., Feldmann K., Yadav N., Lark E. et Browse J., 1994** – The *Arabidopsis* *FAD2* gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis. *Plant Cell*, **6**, 147-158.
- Orlova I.V., Serebriskaya T.S., Popov V., Nosov A.M., Trunova T.I., Tsydendambaev V.D. et Los D.A. 2003** – Transformation of tobacco with a gene for the thermophilic acyl-lipid desaturase enhances the chilling tolerance of plants. *Plant Cell Physiol.*, **44**(4), 447-450.
- Oursel A., Escoffier A., Kader J.C., Dubacq J.P. et Trémolières A., 1987** – Last step in the cooperative pathway for galactolipid synthesis in spinach leaves : formation of monogalactosyldiacylglycerol with C18 polyunsaturated acyl groups at both carbon atoms of the glycerol. *FEBS Lett.*, **219**, 393-399.
- Podkowinski J., Jelenska J., Sirikhachornkit A., Zuther E., Haselkorn R. et Gornicki P., 2003** – Expression of cytosolic and plastid Acetyl-Coenzyme A carboxylase gene wheat plants. *Plant Physiol.*, **131**, 763-772.
- Quartacci M.F., Forli M., Rascio N., Dalla Vecchia F., Bochicchio A. et Navari-Izzo F., 1997** – Desiccation-tolerant *Sporobolus stapfianus* : lipid

composition and cellular ultrastructure during dehydration and rehydration. *Journal of Experimental Botany*, **48**, 1269-1279.

**Quinn P.J., Joo F. et Vigh L., 1989** – The role of unsaturated lipids in membrane structure and stability. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **53**, 71-103.

**Rascio N., Dalla Vecchia F., Ferretti M., Merlo L. et Ghisi R., 1993** – Some effect of cadmium on maize plants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **25**, 244-249.

**Rajasekharan R. et Sastry P.S., 1987** – Effect of pyridazinone herbicides on lipid metabolism in groundnut (*Arachis hypogaea*) leaves. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **29**, 163-175.

**Rangasamy, D. and Ratledge, C., 2000** - Compartmentation of ATPcitrate lyase in plants. *Plant Physiol.*, **122**, 1225-1230.

**Rawlyer A., Unnit M.D., Giroud C., Davies H., Mayor J.P., Harwood J.L. et Siegenthaler P.A., 1987** – The transmembrane distribution of galactolipids in chloroplast thylacoids is universal in a wide variety of temperature climate plants. *Photosynthesis Res.*, **11**, 3-13.

**Rawsthorne S., 2002**- Carbon flux and fatty acid synthesis in plants. *Progress in Lipid Research*, **41**, 182-196.

**Reifarth F., Christen G., Seeliger A.G., Dörmann P., Benning C. et Renger G., 1997** – Modification of the water oxidizing complex in leaves of the *dgd1* mutant of *Arabidopsis thaliana* deficient in the galactolipid digalactosyl-diacylglycerol. *Biochemistry*, **36**, 11769-11776.

**Reiss T., Bergfeld R., Link G., Thien W. et Mohr H., 1983** – Photooxidative destruction of chloroplasts and its consequences for cytosolic enzyme levels and plant development. *Planta*, **159**, 518-528.

**Rendina A.R. et Felts J.M., 1998** – Cyclohexanedione herbicides are selective and potent inhibitors of acetylCoA carboxylase from grasses. *Plant Physiol.*, **86**, 983-986.

**Reverdatto S., Beilinson V. et Nielsen N.C., 1999** - A multisubunit acetyl coenzyme A carboxylase from soybean. *Plant Physiol.*, **119**, 961-978.

**Rock, C. O. et Cronan, J. E., 1996** - *Escherichia coli* as a model for the regulation of dissociable (type II) fatty acid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* **1302**, 1-16.

**Rodermel S., 2001** – Pathways of plastid-to-nucleus signaling. *Trends Plant Sci.*, **6**, 471-478

**Roughan P.G. et Slack C.R., 1982** – Cellular organization of glycerolipid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **33**, 97-131

- Roughan P.G. et Slack C.R., 1984** – Glycerolipid synthesis in leaves. *Trends Biochem. Sci.*, **9**, 383-386.
- Routaboul J.M., Fischer S. F. et Browse J., 2000** – Trienoic fatty acids are required to maintain chloroplast function at low temperature. *Plant Physiol.*, **124**, 1697-1705.
- Sakamoto T. et Murata N., 2002** – Regulation of the desaturation of fatty acids and its role in tolerance to cold and salt stress. *Current Opinion in Microbiology*, **5**, 206-210.
- Sambrook J., Frisch E.F., et Maniatis T., 1989** – Molecular cloning : a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sandelius A.S. et Dahlin C., 1990** – Lipid composition of thylakoids with different contents of carotenoids and apoproteins of the light-harvesting complex of photosystem II. *J. Plant Physiol.*, **136**, 550-555.
- Sandmann G. et Albrecht M., 1990** – Accumulation of colourless carotenes and derivatives during interaction of bleaching herbicides with phytoene desaturation. *Z. Naturforsch.*, **45**, 487-491.
- Sandmann G. et Böger P., 1982** – Mode of action of herbicidal bleaching. In : Biochemical responses induced by herbicides. ACS Symp. Ser. 181, Moreland D.E., St John J.B. and Hess F.D. Eds., American Society, Washington, D.C.
- Sandmann G. et Böger P., 1997** - Phytoene desaturase as target for bleaching herbicides. In *Herbicide Activity : Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology* ; Roe R.M, Burton J.D., Kuhr R.J., Eds., IOS Press : Amsterdam, 1-10.
- Sandmann G., Bramley P.M. et Böger P., 1980** – The inhibitory mode of action of the pyridazinone herbicide norflurazon on a cell-free carotenogenic enzyme system. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **14**, 185-191.
- Sandmann G., Linden H. et Böger P., 1989** – Enzyme-kinetic studies on the interaction of norflurazon with phytoene desaturase. *Z. Naturforsch.*, **44c**, 787-790.
- Sanger F., Nicklen S. et Coulson A.R., 1977** – DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467.
- Sasaki Y., Hakamada K., Suama Y., Nagano Y., Furusawa I. et Matsuno R., 1993** – Chloroplast-encoded protein as a subunit of acetyl-coenzyme A carboxylase in pea plant. *J. Biol. Chem.*, **268**, 25118-25123.
- Sasaki Y., Konishi T., et Nagano Y., 1995** – The compartmentation of acetyl CoA carboxylase in plant. *Plant Physiol.*, **108**, 445-449.
- Sayanova O.V., Beaudoin F., Michaelson L.V., Shewry P.R. et Napier J.A., 2003** – Identification of primula fatty acid delta 6- desaturases with n-3 substrate preferences. *FEBS Lett.*, **542**, 100-104.

- Sayanova O., Smith M.A., Lapinskas P., Stobart A.K., Dobson G., Christie W.W., Shewry P.R. et Napier J.A., 1997** – Expression of a borage desaturase cDNA containing an N-terminal cytochrome b<sub>5</sub> domain results in the accumulation of high levels of  $\Delta^6$  desaturated fatty acids in transgenic tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 4211-4218.
- Salguero A., de la Morena B., Vigara J., Vega J.M., Vilchez C. et Leon R., 2003** – carotenoids as protective response against oxidative damage in *Dunaliella bardawil*. *Biomol. Engineer.*, **20**, 249-253.
- Scalla R., 1991** – Les herbicides : mode d'action et principes d'utilisation. INRA, Paris. ISBN.
- Serghini-Caid H., Demandre C., Justin A.M. et Mazliak P., 1988** - Oleoyl-phosphatidylcholine molecular species desaturated in pea leaf microsomes- Possible substrates of oleate desaturase in other green leaves. *Plant Sci.*, **54**, 93-101.
- Shanklin J. et Cahoon E.B., 1998** – Desaturation and related modifications of fatty acids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **49**, 611-641.
- Shorrosh B.S., Roesler K.R., Shintani D., Van de Loo F.J. et Ohlrogge J.B., 1995** – Structural analysis, plastid localization, and expression of the biotine carboxylase subunit of acetyl-coenzyme A carboxylase from tobacco. *Plant Physiol.*, **108**, 805-812.
- Siebertz H.P., Heinz E., Linscheid M., Joyard J. et Douce R., 1979** – Characterization of lipids from chloroplast envelopes. *Eur. J. Biochem.*, **101**, 429-438.
- Simkin A.J., Breitenbach J., Kuntz M., et Sandmann G., 2000** – *In vitro* and *in Situ* inhibition of carotenoid biosynthesis in *Capsicum annuum* by bleaching herbicides. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 4676-4680.
- Shmidt H., Dresselhaus T., Buck F. et Heinz E., 1994** – Purification and PCR-Based cDNA cloning of a plastidial n-6 desaturase. *Plant Mol. Biol.*, **26**, 631-642.
- Schnurr J.A., De Boer J.M. et Browse J.A. 2002** - Fatty acid export from the chloroplast. Molecular characterization of a major plastidial acyl-coenzymeA synthetase from Arabidopsis. *Plant Physiol.* **129** (4), 1700-1709.
- Schroeder J.I., Allen G.J., Hugouvieux V., Kwak J.M. et Waner D., 2001** – Guard cell signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **52**, 627-658.
- Shah S., Xin Z. et Browse J., 1997** – Overexpression of the *FAD3* desaturase gene in a mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **114**, 1533-1539.
- Smith W.L. et Borgeat P., 1985** – The eicosanoids : prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes and hydroxy-eicosanoic acids. In *Biochemistry of Lipids and Membranes*, D.E. Vance and J.E. Vance, eds. (Menlo Park, CA : Benjamin/Cummings), 325-360.

- Somerville C.R. et Browse J., 1991**- Plant lipids : metabolism, mutants, and membranes. *Science*, **252**, 80-87.
- Sprecher H., 1981**- Biochemistry of essential fatty acids. *Prog. Lipid Res.* **20**, 13-22
- Steinmüller D. et Tevini M., 1985** – Composition and function of plastoglobuli. I. Isolation and purification from chloroplasts and chromoplasts. *Planta*, **163**, 201-207.
- St John J.B. 1982** – Effects of herbicides on the lipid composition of plant membranes. In *Biochemical responses induced by herbicides*. ACS Symp. Ser. 181, Moreland D.E., St John J.B. and Hess F.D., Eds., American Society, Washington, D.C., Chap.6.
- St John J.B. 1984** – Action of R-40244 on chloroplast pigments and polar lipids. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **23**, 13-18.
- St John J.B., Ritting F.R. et Bleiholder H. 1984** – Interactions of chemicals with plant membranes. In Hilton J.L., ed *Agricultural Chemicals of the Future*. Rowman and Allanheld. Totowa, 212-222.
- Susek RE., Ausubel FM et Chory J., 1993** – Signal transduction mutant of arabidopsis uncouple nuclear *CAB* and *RBCS* gene expression from chloroplast development. *Cell*, **74**, 787-799.
- Tamada Y., Imanari E., Kurotani K.I., Nakai M., Andreo S.A. et Izui K., 2003** – Effect of photooxidative destruction of chloroplasts on the expression of nuclear genes for C<sub>4</sub> photosynthesis and for chloroplast biogenesis in maize. *J. Plant Physiol.*, **160**, 3-8.
- Taran N., Okannenko A. et Musienko N., 2000** – Sulfolipid reflects plant resistance to stress factor action. *Biochem. Soc. Trans.*, **28**, (6), 922-924.
- Taylor W.C., 1989** – Regulatory interactions between nuclear and plastid genomes. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **40**, 211-233.
- Taylor C.B. 1996** - Control of cyclic carotenoid biosynthesis : no lutein no problem. *Plant Cell*. **8**, 1447-1450.
- Thies F., Backhaus T., Bossmann B. et Grimme L.H., 1996** – Xenobiotic biotransformation in unicellular green algae : involvement of cytochrome P<sub>450</sub> in the activation and selectivity of the pyridazinone pro-herbicide metflurazon. *Plant Physiol.*, **112**, 361-370.
- Thomas P.S., 1980** - Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **77**, 5201-5205.

- Thomas D.J., Avenson T.J., Thomas J.B. et Herbert S.K., 1998** – A cyanobacterium lacking iron superoxide dismutase is sensitized to oxidative stress induced with methyl viologen but is not sensitized to oxidative stress induced with norflurazon. *Plant Physiol.*, **116**, 1593-1602.
- Thomas H., Giddings Jr. J. et hanson A.D., 1982** – Water stress provokes a generalized increase in phosphatidylcholine turnover in barley leaves. *Planta*, **155**, 493-501.
- Tietje C. et Heinz E., 1998** – Uridine-diphospho-sulfoquinovose : diacylglycerol sulfoquinovosyltransferase activity is concentrated in the inner membrane of chloroplast envelope. *Planta*, **206**, 72-78.
- Tissut M. et Séverin F., 1984** – Plantes, herbicides et désherbage. Association de coordination technique agricole, Paris.
- Trebst A, Depka B. 1997-** Role of carotene in the rapid turnover and assembly of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett.*, **400** (3), 359-62.
- Trémolières A., Drapier D., Dubacq J.P. et Mazliak P., 1980** – Cooperation between chloroplasts and extraplastidial compartment for the biosynthesis of leaf lipids. In *Biogenesis and Function of Plant Lipids*. Edited by P. Mazliak, C. Costes, P. Benveniste and R. Douce. Elsevier Amsterdam, 77-80.
- Trémolières A., Dubacq J.P., Drapier D., Muller M. et Mazliak P., 1980** – *In vitro* cooperation between plastids and microsomes in the biosynthesis of leaf lipids. *FEBS Letters*, **18**, 135-138.
- Trémolières A., Roche O., Dubertret G., Maroc J., Guyon D. et Garnier J., 1991-** Restoration of thylakoid appression by  $\Delta^3$ -trans-hexadecenoic acid-containing phosphatidylglycerol, in a mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. Relationship with the regulation of excitation energy distribution. *Biochim. Biophys. Acta*, **1059**, 286-292.
- Trémolières A. et Siegenthaler P.A., 1998** – Reconstitution of photosynthetic structures and activities with lipids, in : Siegenthaler P.A., Murata N. (Eds.), *Lipids in photosynthesis, function and genetics*, Kluwer Academic publishers, Dordrecht, pp.XV.
- Van Besouw A. et Wintermans J.F.G.M., 1978** – Galactolipid formation in chloroplast envelopes. 1. Evidence for two mechanisms in galactosylation. *Biochem. Biophys. Acta*. **529**, 44-53.
- Van de Loo F.J., Broun P., Turner S. et Somerville C., 1995** – An oleate 12-hydroxylase from *Ricinus communis* L. is a fatty acyl desaturase homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 6743-6747.
- Vishnevetsky M., Ovadis M. et Vainstein A., 1999** – Carotenoid sequestration in plants : the role of carotenoid-associated proteins. *Trends in Plant Science*, **4**, 232-235.

**Wada H., Schmidt H., Heinz E. et Murata N., 1993** – *In vitro* ferredoxin-dependent desaturation of fatty acids in cyanobacterial thylakoid membranes. *J. Bacteriol.*, **175**, 544-547.

**Wada H. et Murata N., 1998** – Membrane lipids in cyanobacteria. In : Siegenthaler P.A. and Murata N. (eds) *Lipids in Photosynthesis : Structure, Function and Genetics*, 65-81, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

**Wakil S.J., 1989** – Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. *Biochemistry*, **28**, 4523-4530.

**Wallis J. G. et Browse J., 2002** – Mutants of *Arabidopsis* reveal many roles for membrane lipids. *Progress in Lipid Research*, **41**, 254-278.

**Wallis J.G., Watts J.L. et Browse J., 2002** – Polyunsaturated fatty acid synthesis : What will they think of next. *TRENDS Biochem. Sci.* **27** (9), 467-473.

**Wang X.M. et Hildebrand D.F. 1988** – Biosynthesis and regulation of linolenic acid in higher plants. *Plant Physiol. Biochem.*, **26**, 777-792.

**Wang X.M., Hildebrand D.F., Norman H.A., Dahmer M.L., St John J.B. et Collins G.B., 1987a** - Reduction of linolenate content in soybean cotyledons by a substituted pyridazinone. *Phytochemistry*, **26**, 955-960.

**Wanner L., Keller. Et Matile P.H., 1991** – Metabolism of radiolabelled galactolipids in senescent barley leaves. *Plant Science*, **78**, 199-206.

**Wetzel C.M. et Rodermeil S.R., 1998** – Regulation of phytoene desaturase expression is independent of leaf pigment content in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, **37**, 1045-1053.

**Whitney H.M., Michaelson L.V., sayanova O., Pickett J.A. et Napier J.A., 2003** – Functional characterisation of cytochrome b (5)- fusion desaturase from *Anemone leveillei* : the unexpected identification of fatty acid delta(6)-desaturase. *Planta*, **217** (6), 983-992.

**Wilkinson R.E. 1985** - Carotenogenic inhibition by norflurazon in wheat. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **23**, 370-375.

**Wilkinson R.E., 1987** – Reversal of norflurazon carotenogenesis inhibition by isomers. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **28**, 381-388.

**Wilkinson R.E., 1991** – Reversal of norflurazon carotenogenesis inhibition by aminomethyl modified norflurazon molecules. *Biochem. Life Sci. Adv.*, **10**, 199-204.

**Wilkinson R.E., 1993** – Naphtalic anhydride partial reversal of carotenogenesis inhibition by norflurazon. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **47**, 81-86.

**Willemot C., 1977** – Simultaneous inhibition of linolenic acid synthesis in winter wheat roots and frost hardening by BASF 13 338, a derivative of pyridazinone. *Plant Physiol.*, **60**, 1-4.

- Willemot C., Hope H.J. et St Pierre J.C., 1979** – On the inhibition of frost hardening of winter wheat by BASF 13 338, a derivative of pyridazinone. *Can. J. Plant Sci.*, **59**, 249-251.
- Willemot C., Slack C.R., Browse J. et Roughan P.G., 1982** – Effect of BASF 13 338, a substituted pyridazinone on lipid metabolism in leaf tissue of spinach, pea, linseed and wheat. *Plant Physiol.*, **70**, 78-81.
- Williams J.P., Imperial V., Khan M.U ; et Hodson J.N., 2000** – the role of phosphatidylcholine in fatty acid exchange and desaturation in *Brassica napus* L. leaves. *Biochem. J.*, **349**, 127-133.
- Williams J.P. et Khan M.U., 1996** – Lipid metabolism in leaves of an 18 :4 plant, *Echium plantagineum* : A model of galactolipid biosynthesis in 18 :3 and 18 :4 plants. *Plant Physiol. Biochem.*, **34**, 93-100.
- Williams J.P., Williams K. et Khan M.U., 1992** – Low temperature-induced fatty acid desaturation in *Brassica napus* : thermal lability of the process. *Biochimica Biophysica Acta*, **1125**, 62-67.
- Wu J., James D.W.Jr., Dooner H.K. et Browse J., 1994** – A mutant of *Arabidopsis* deficient in the elongation of palmitic acid. *Plant Physiol.*, **106**, 143-150.
- Yadav N.S., Wierzbicki A., Aegerter M., Caster C.S., Peres-Grau L., Kinney A.J., Hitz W.D., Booth R. Jr, Schweiger B., Stecca K.L., Allen S.M., Blackwell M., Reiter R.S., Carlson T.J., Russell S.H., Feldmann K.A., Pierce J. et Browse J., 1993** – Cloning of higher plant  $\omega$ -3 fatty acid desaturases. *Plant Physiol.*, **103**, 467-476.
- Young A.J., 1991**- The photoprotective role of carotenoids in higher plants. *Physiologia Plantarum*, **83**, 702-708.
- Young A.J., Orset S. et Tsavolas A.J., 1998** – Carotenoids in higher plant photosynthesis. In : Pessaraki M., ed. *Handbook of photosynthesis*. New York : Marcel Dekker Inc., 575-596.
- Yurina N.P. et Kloppstech K., 2001** – Accumulation of plastid protein precursors under norflurazon-induced carotenoid deficiency and oxidative stress in barley. *Plant Physiology and Biochemistry*, **39** (9), 807-814.
- Zagnitko O., Jelenska J., Tevzadze G., Haselkorn R., et Gornicki P., 2001** – An isoleucine/leucine residue in the carboxyltransferase domain of acetyl CoA carboxylase is critical for interaction with aryloxyphenoxypropionate and cyclohexanedione inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci , USA*, **98**, 6617-6622.
- Zarrouk M., Marzouk B. et Cherif A., 1990** – Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in the glycerolipids of olive leaves. *Physiol. Plant.*, **79**, 45-50.

# ANNEXES

## **Tampon TEG**

<b>Tris HCl pH 8.0</b>	<b>25 mM</b>
Na <sub>4</sub> EDTA	10 mM
Glucose	50 mM

## Tampon TBE 10 X

Tris-borate pH 8.0	90 mM
acide borique	90 mM
Na <sub>2</sub> EDTA	50 mM

## Tampon TSB

<b>PEG</b>	<b>10%</b>
DMSO	5%
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM

## Tampon MOPS 10X

MOPS pH 7,0	0,2 M
acétate de sodium	50 mM
Na <sub>4</sub> EDTA	5 mM

## Tampon de dénaturation des ARNs (**dans du tampon MOPS 2X**)

Formamide	50%
Formaldéhyde	12%
Na <sub>4</sub> EDTA	5 mM

## Tampon de charge des ARNs (**dans du tampon MOPS 1X**)

<b>Glycérol</b>	<b>50%</b>
Bleu de bromophénol	0.2%

## Tampon de préhybridation/hybridation

Formamide	500 ml.l <sup>-1</sup>
Denhardt 50X	100 ml.l <sup>-1</sup>
Tampon SSC 20X	300 ml.l <sup>-1</sup>
<b>SDS</b>	<b>0.1%</b>
ADN de sperme de saumon soniqué dénaturé	0.1g.l <sup>-1</sup>

Denhardt 50 X	
PVP	1%
SBA	1%
Ficoll-400	1%
<b>Tampon SSC 20X</b> (pH 7.0 ajusté avec NaOH 10N)	
NaCl	3 M
citrate trisodique	0,3 M

**Milieu de culture bactérienne LB** (Luria et Bertani)

Bacto-tryptone	10g.l <sup>-1</sup>
Bacto-yeast extract	5g.l <sup>-1</sup>
NaCl	10g.l <sup>-1</sup>