

THÈSE

Présentée à

L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE (SCIENCES)

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PAUL SABATIER

Spécialité : BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VEGETALES

Par

François Xavier COTE

**PHOTOSYNTHÈSE ET PHOTORESPIRATION
D'UNE PLANTE A MÉTABOLISME ACIDE
CRASSULACEEN : *Ananas comosus* (L.) MERR
ÉTUDES DES ÉCHANGES GAZEUX**

Soutenue le 18 janvier 1988 devant la commission d'examen

MM. G. CAVALIÉ	Professeur Université Paul Sabatier	Président
M. ANDRÉ	Directeur de Recherche CEA Cadarache	
P. AURIOL	Professeur Université Paul Sabatier	
P. GADAL	Professeur Université Paris-Sud	
J. MARCHAL	Directeur de Recherche IRFA-CIRAD	
B. MILLET	Professeur Université Besançon	

A mes parents.

Ce travail a été réalisé dans le service de Radioagronomie du centre d'étude nucléaire de Cadarache dans le cadre d'une collaboration entre le laboratoire d'Agrophysiologie et l'Institut de Recherche sur les Fruits et Agrumes.

Je remercie vivement Michel FOLLIOU pour l'efficacité et le dynamisme de sa collaboration

Je remercie l'équipe du laboratoire d'Agrophysiologie, Jacqueline MASSIMINO, Christiane RICHAUD, Marcel ANDRE, Pierre BAGARRI, Alain DAGUENET, Alain GERBAUD, Daniel JUST, Daniel MASSIMINO, Jean PINTENA pour l'aide indispensable qu'ils m'ont apportée au cours de ce travail et pour l'amitié qu'ils m'ont témoignée.

Je remercie également :

- Monsieur ANDRE qui a encadré ces travaux de recherche et m'a initié à la physiologie de la plante entière,
- Monsieur le professeur CAVALIE qui a accueilli et suivi ma formation de troisième cycle,
- Monsieur MARCHAL, initiateur de ces travaux avec Monsieur ANDRE,
- Monsieur le professeur KLUGE pour l'honneur qu'il me témoigne en acceptant d'être le rapporteur de cette étude,
- Monsieur le professeur AURIOL, Monsieur le professeur GADAL, Monsieur le professeur MILLET qui ont accepté de juger cette thèse,
- Madame DEBIAS pour la réalisation pratique de ce mémoire,
- celles et ceux qui ont contribué, à différents niveaux, à la réalisation de cette étude.

ABREVIATIONS ET SYMBOLES

ADP	: Adénosine diphosphate
APG ou 3-PGA	: Acide-3-phosphoglycérique
ATP	: Adénosine triphosphate
CAM	: Métabolisme acide crassulacéen
CHO	: Carbohydate
DHAP	: Dihydroxyacétone phosphate
DPGA	: Acide-1,3-diphosphoglycérique
FADH ₂	: Flavine adénine dinucléotide
FDP	: Fructose-1,6-bisphosphate
F-6-P	: Fructose-6-phosphate
FS O ₂ /CO ₂	: Facteur de spécificité O ₂ /CO ₂ de la RUBISCO
GAP	: Glyceraldéhyde-3-phosphate
K _m	: Constante de Michaelis-Menten
MF	: Masse de matière fraîche
MS	: Masse de matière sèche
NAD (NADH)	: Nicotinamide adénine dinucléotide
NADP (NADPH)	: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
OAA	: Acide oxaloacétique
PCR	: Cycle photosynthétique réductif
PEP	: Phosphoénolpyruvate
PEP-Case	: Phosphoénolpyruvate carboxylase
2-PGA	: Acide-2-phosphoglycérique
QP	: Quotient photosynthétique (O ₂ émis/CO ₂ fixé)
QR	: Quotient respiratoire
RUBISCO	: Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase
RuBP	: Ribulose-1,5-bisphosphate
TCA	: Cycle des acides tricarboxyliques
V _c	: Vitesse de carboxylation du RuBP
V _o	: Vitesse d'oxygénation du RuBP

Symboles des échanges gazeux

PC	: Echange diurne net de CO ₂
PN	: Fixation nocturne nette de CO ₂
PO	: Emission nette d'O ₂
RO	: Fixation nocturne d'O ₂
U	: Fixation d'O ₂ sous lumière
E	: Emission brute d'O ₂
TR	: Transpiration

Symboles des phases d'échanges nets de CO₂ du métabolisme CAM (d'après Osmond, 1978)

Phase I	: Phase nocturne de fixation de CO ₂
Phase II	: Phase de fixation de CO ₂ à la transition nuit/jour
Phase III	: Phase d'arrêt de fixation de CO ₂ pendant la première partie du jour
Phase IV	: Phase de fixation de CO ₂ pendant la seconde partie du jour

TABLE DES MATIERES

	Page
INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES.....	7
I.I : Matériel végétal et conditions de culture.....	7
I.I.1 : Matériel végétal.....	7
I.I.2 : Conditions de culture.....	8
I.I.3 : Evolution de quelques caractéristiques botaniques au cours du développement d'ananas issus de culture in vitro.....	9
I.II : Détermination des échanges gazeux en conditions contrôlées.....	11
I.II.1 : Description du système expérimental.....	11
I.II.2 : Quantification des échanges gazeux.....	14
I.III : Principales autres techniques expérimentales et méthodes utilisées.....	19
I.III.1 : Echantillonnage des plants.....	19
I.III.2 : Dosage de malate.....	19
I.III.3 : Rappel sur la loi de diffusion des gaz.....	19
CHAPITRE II : FIXATION NETTE DE CO₂ PAR L'ANANAS : RYTHME ET CAPACITES PHOTOSYNTHÉTIQUES.....	21
II.I : Rythme de fixation nette de CO₂ et intensité du métabolisme CAM.....	22
II.I.1 : Ananas issus de rejets.....	22
II.I.2 : Ananas issus de culture in vitro.....	26
II.II : Capacités photosynthétiques et efficience de l'eau de l'ananas.....	29
II.II.1 : Evolution des capacités photosynthétiques en fonction de l'intensité du métabolisme CAM chez des ananas issus de culture in vitro.....	29
II.II.2 : Capacités photosynthétiques de l'ananas.....	31
II.II.3 : Transpiration et efficience de l'eau de l'ananas.....	33
II.III : Conclusions.....	36

CHAPITRE III	: ECHANGES NETS D'O₂ PAR L'ANANAS, CARACTERISATION DE L'ASSIMILATION DE CO₂ PENDANT LES DIFFERENTES PHASES DU METABOLISME CAM.....	38
III.I	: Echanges nets d'O₂ pendant la phase nocturne.....	39
III.I.1	: Amplitude des échanges, calcul de la fixation brute nocturne de CO₂.....	39
III.II	: Echanges nets d'O₂ pendant la phase diurne.....	40
III.II.1	: Calcul des quotients photosynthétiques journaliers et horaires.....	42
III.II.2	: Assimilation de CO₂ lorsque les valeurs des quotients photosynthétiques horaires sont supérieurs à 1.....	43
III.II.3	: Assimilation de CO₂ lorsque les valeurs des quotients photosynthétiques horaires sont proches de 1.....	47
III.II.4	: Assimilation de CO₂ lorsque les valeurs des quotients photosynthétiques horaires sont inférieures à 1.....	48
III.II.5	: Echanges nets d'O₂ par une feuille adulte d'ananas issu de rejet.....	52
III.III	: Calcul de la cinétique de variation de concentration de malate à partir des échanges d'O₂ et CO₂.....	52
III.III.1	: Exemple et vérification des hypothèses de calcul.....	52
III.IV	: Conclusions.....	55
CHAPITRE IV	: FIXATION D'O₂ SOUS LUMIERE PAR L'ANANAS : RYTHME, AMPLITUDE ET CONTRIBUTION A L'ETUDE DES PROCESSUS IMPLIQUES.....	57
IV.I	: Photoconsommation d'O₂ au cours des différentes phases diurnes du cycle CAM.....	58
IV.I.1	: Rythme et amplitude.....	58
IV.I.2	: Nature du rythme.....	61
IV.II	: Réponse de la photoconsommation d'O₂ et de la photosynthèse à des variations de l'intensité de l'éclairement et de concentration de CO₂ et d'O₂.....	63
IV.II.1	: Protocole d'étude retenu.....	64
IV.II.2	: Influence de l'intensité de l'éclairement, des concentrations de CO₂ et d'O₂.....	65
IV.III	: Hypothèses sur la nature de la photoconsommation d'O₂, part attribuable à la photorespiration.....	69
IV.III.1	: Modèle biochimique de régulation des activités enzymatiques de la RUBISCO.....	69
IV.III.2	: Nature possible de la photoconsommation d'O₂.....	75
IV.IV	: Conclusions.....	80

CONCLUSIONS GENERALES.....	84
BIBLIOGRAPHIE.....	89

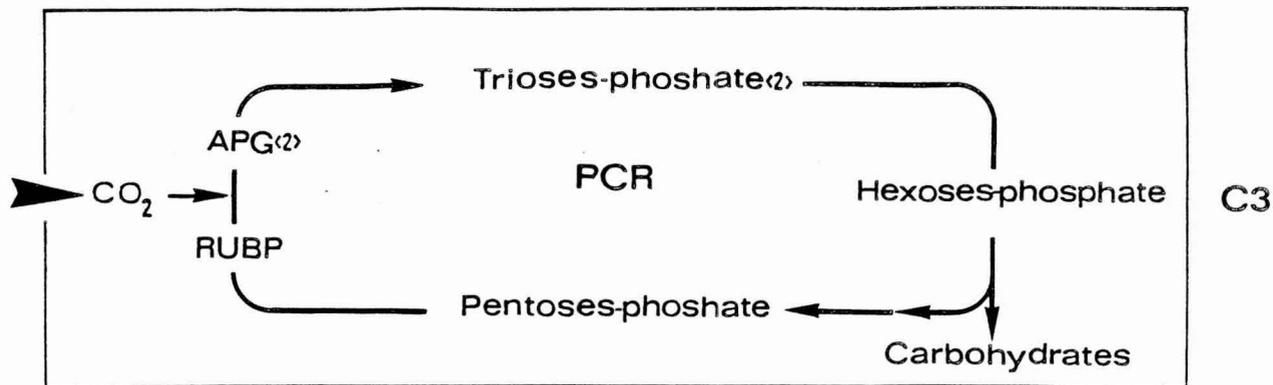


Figure 1a : Schéma de l'assimilation de CO₂ par le type photosynthétique C₃.

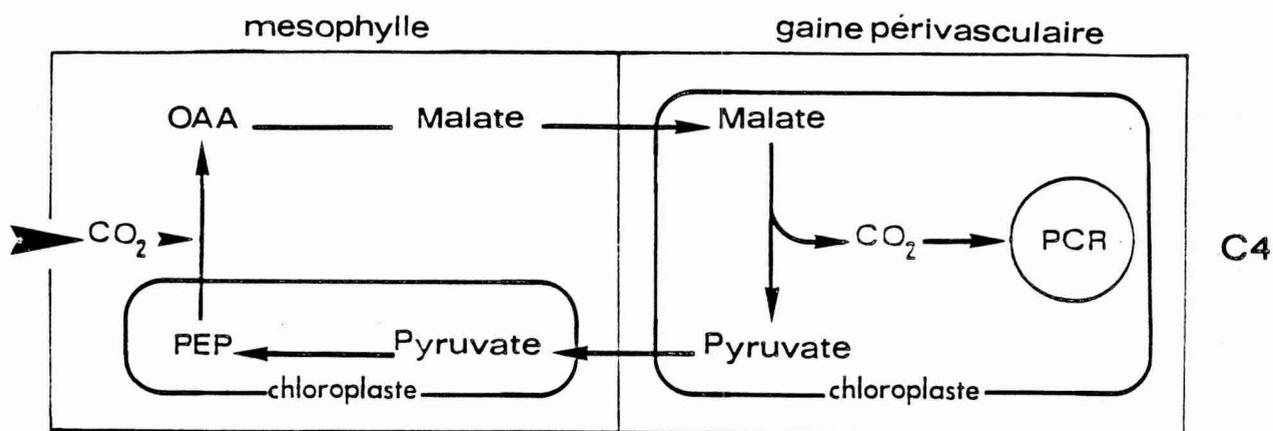


Figure 1b : Schéma de l'assimilation de CO₂ par le type photosynthétique C₄ (exemple de type C₄ à enzyme malique à NADP).

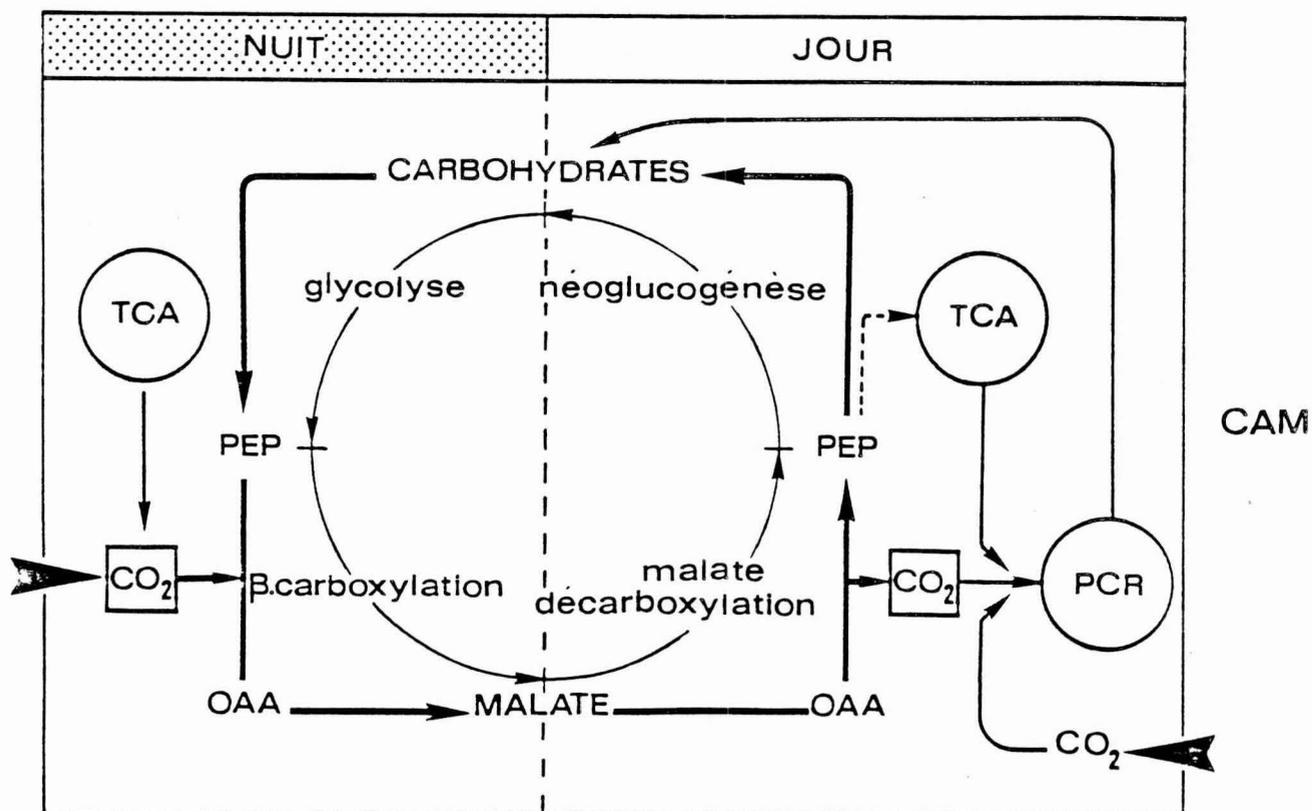


Figure 1c : Principales réactions biochimiques impliquées dans le métabolisme CAM.

INTRODUCTION GENERALE

La photosynthèse permet aux végétaux d'incorporer le carbone du CO₂ atmosphérique dans la matière organique. Le gaz carbonique est réduit en glucides, sa fixation est catalysée par une enzyme clef du cycle photosynthétique, la ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase-oxygénase (RUBISCO) (E.C.4.1.1.39). Les différentes réactions biochimiques impliquées dans cette assimilation consomment l'énergie produite par les réactions claires de la photosynthèse. Dans les limites imposées par la nécessité d'assimiler le CO₂ via la RUBISCO et sous lumière, les végétaux supérieurs se classent en trois principaux types photosynthétiques. Dans le type C₃, le plus largement répandu, le CO₂ est directement fixé par la RUBISCO (fig. 1a). Chez les végétaux de type C₄, principalement des graminées d'origine tropicale, l'assimilation de CO₂ est réalisée par deux carboxylations successives localisées dans deux types de tissu chlorophyllien (fig. 1b). Dans les cellules du mésophylle, la phosphoénol-pyruvate carboxylase (E.C.4.1.1.31) catalyse la première fixation de CO₂ et conduit à la synthèse d'acides à quatre carbones. Leur décarboxylation dans les cellules sous-jacentes de la gaine périvasculaire libère du CO₂ que refixe la RUBISCO. Cette étape est accompagnée d'une élévation de la concentration interne de CO₂ capable de stimuler la photosynthèse (Hatch, 1975). Une troisième catégorie de plantes présente un type photosynthétique original. Chez ces végétaux, la fixation primaire de CO₂, catalysée par la PEP-Case, est nocturne (fig. 1c). Les acides organiques synthétisés, principalement l'acide malique, sont stockés dans la vacuole. Le jour suivant, leur décarboxylation libère du CO₂ disponible pour le cycle de Calvin. Les trioses formés au cours de cette décarboxylation regagnent un pool de carbohydrates qui sera, la nuit, à l'origine du PEP, substrat de la β -carboxylation.

La présence de ce métabolisme n'exclut pas la possibilité d'une fixation diurne de CO₂, cette dernière intervient essentiellement après la phase de décarboxylation du malate (voir les revues de Kluge et Ting, 1978 ; Osmond, 1978 ; Winter, 1985). Ce type photosynthétique, qui implique des variations journalières de concentration d'acides organiques et qui est présent chez la plupart des espèces de la famille des crassulacées, a été appelé métabolisme acide crassulacéen (CAM). Une de ses principales caractéristiques est l'économie d'eau qu'il permet à la plante de réaliser : de jour, l'étape décarboxylation de malate-refixation du CO₂ libéré est accompagnée d'une augmentation de la résistance à la diffusion gazeuse qui, outre les échanges de CO₂, limite également la transpiration. Grâce à cette particularité, les plantes à métabolisme CAM occupent des biotopes où la disponibilité en eau est réduite. Ce type photosynthétique est principalement représenté dans les familles des cactacées, agavacées, aizoacées, euphorbiacées et broméliacées (Kluge et Ting, 1978).

Parmi les plantes à métabolisme CAM, l'ananas (Ananas comosus (L.) Merr.) occupe une place particulière. C'est en effet le seul végétal appartenant à ce type photosynthétique à faire l'objet de cultures à très grande échelle (Py et al., 1984). Cette caractéristique n'a cependant pas conduit les chercheurs à utiliser l'ananas de façon préférentielle dans les études consacrées au métabolisme CAM. La taille importante de la plante, sa multiplication à partir de rejets de poids notable et son cycle de développement long sont des obstacles majeurs à son utilisation comme matériel de laboratoire. Les études d'échanges gazeux réalisées chez l'ananas ont conclu que la fixation de CO₂ était surtout nocturne (Nose et al., 1977 ; Sale et Neales, 1980 ; Neales et al., 1980 ; Bartholomew, 1982 ; Nose et al., 1986). Cependant, la multitude des conditions expérimentales et climatiques retenues dans les différents travaux consacrés à la photosynthèse de l'ananas ont empêché de

cerner de façon claire les caractéristiques du métabolisme CAM chez cette plante. Dans le cadre d'une coopération entre le laboratoire d'Agrophysiologie (Service de Radioagronomie - CEA) et l'Institut de Recherche sur les Fruits et Agrumes Tropicaux (IRFA-CIRAD), cette étude a pour premier objectif de préciser sur plante entière et par l'analyse des échanges gazeux de CO₂ les caractéristiques photosynthétiques de l'ananas placé dans des conditions de développement de type agronomique. Les techniques de multiplication par culture in vitro seront de plus en plus utilisées pour reproduire en grand nombre des cultivars d'ananas présentant des caractères à sélectionner dans le cadre de recherches sur l'amélioration de la qualité (Py et al., 1984). Au premier stade de leur développement, les plants obtenus par ces méthodes se distinguent de l'image classique de l'ananas par leur taille réduite (photos 1, 2, 3). En conditions naturelles (et au champ) en effet, la reproduction de cette plante est principalement réalisée par multiplication végétative de rejets portés pendant plusieurs mois par la plante-mère ; ces rejets présentent une taille importante au moment de leur sevrage. L'étude de la photosynthèse d'ananas issus de culture in vitro n'a pas à notre connaissance encore été entreprise. Plusieurs travaux témoignent d'une intensité du métabolisme crassulacéen faible chez les jeunes feuilles de différentes plantes CAM (Lerman et al., 1974 ; Jones, 1975 ; Nishida, 1978 ; Amagasa, 1982 ; Brulfert et al., 1982). Par référence à ces observations, nous avons cherché si les caractéristiques photosynthétiques de plants d'ananas issus de culture in vitro différaient de celles des plants issus de rejets.

Les différentes études consacrées au rythme des échanges nets de CO₂ des plantes à métabolisme acide crassulacéen, celles des variations circadiennes d'activité enzymatique et de concentration de pool de métabolites impliqués dans cette voie biochimique, permettent aujourd'hui une perception synthétique de la photosynthèse CAM (Kluge et Ting, 1978 ; Osmond, 1978 ;

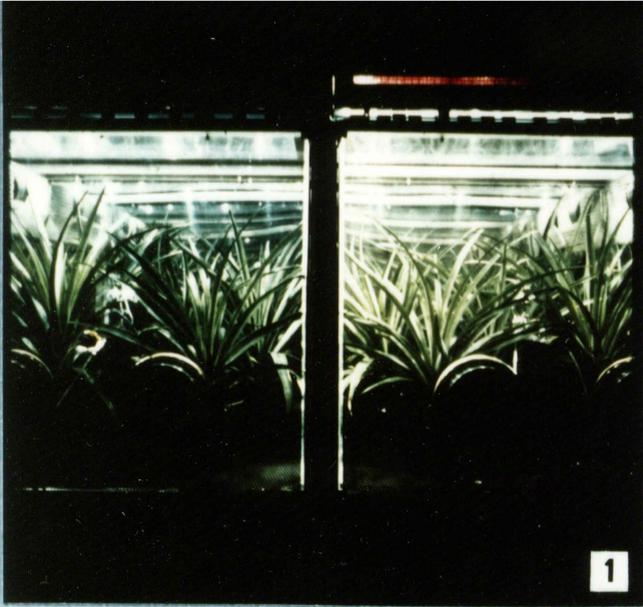
Winter, 1985). Cependant, les caractéristiques de l'assimilation dans le cycle photosynthétique du CO₂ fixé pendant la nuit et les relations entre métabolisme CAM et photorespiration restent peu connues.

Dans le métabolisme crassulacéen, l'assimilation totale de CO₂ (dans la suite de ce mémoire, nous réserverons le terme "d'assimilation de CO₂" à son incorporation via la RUBISCO dans le cycle photosynthétique de Calvin, le terme de "fixation de CO₂" désignera lui l'ensemble des prises de CO₂, nocturnes ou diurnes) est égale à l'assimilation de CO₂ "externe" fixé pendant la phase diurne et celle du CO₂ "interne" libéré par la décarboxylation du malate. Par référence à la disparition du pool de cet acide organique, on a déduit que le CO₂ "interne" était fixé par la RUBISCO pendant la première partie du jour (Kluge et Ting, 1978 ; Osmond, 1978 ; Winter, 1985). L'augmentation de la concentration intracellulaire de CO₂ qui accompagne la décarboxylation du malate chez les plantes CAM (Spalding et al., 1979 ; Cockburn et al., 1979) suggère également que le CO₂ "interne" est assimilé à des vitesses élevées. Pour préciser ces caractéristiques, une méthode possible consiste à déterminer les échanges nets d'O₂ et de CO₂. L'assimilation de CO₂ par la RUBISCO étant associée à un dégagement équivalent d'oxygène (Kaplan et Björkman, 1980), la différence entre ce dégagement et la fixation diurne nette de gaz carbonique doit être équivalente à la quantité de CO₂ "interne" assimilé dans le cycle photosynthétique. A l'appui de cette proposition, les déterminations d'échanges nets d'O₂ réalisées chez différentes plantes CAM témoignent d'une émission d'oxygène supérieure à la fixation nette de CO₂ pendant la première partie du jour (Brünnhofer et al., 1968 ; Marcelle, 1975 ; André et al., 1979 ; Thomas et André, 1987). Ces recherches ont cependant été handicapées par des difficultés méthodologiques liées aux faibles précisions de mesure ou au choix du matériel végétal et n'ont pas permis de caractériser l'assimilation de CO₂ "interne" pendant les différentes phases

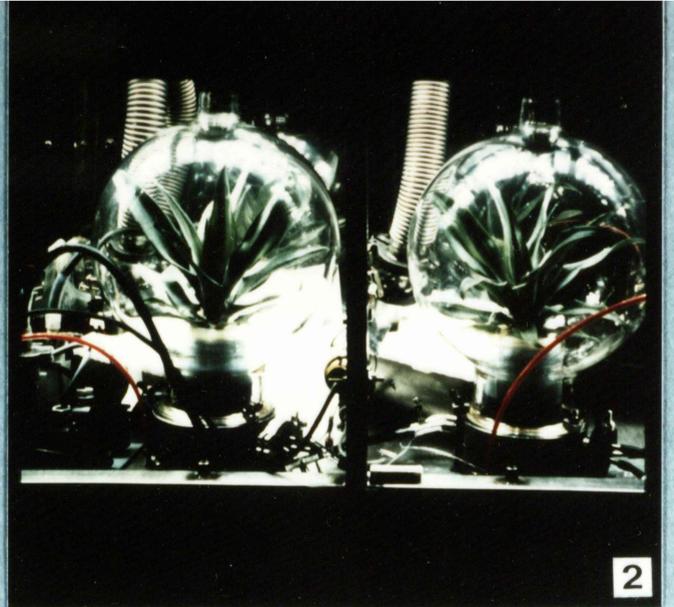
diurnes du métabolisme CAM. Bénéficiant de techniques d'analyse de la concentration d'oxygène par spectrométrie de masse, la deuxième partie de ces travaux est consacrée à l'étude du rythme et de l'amplitude de l'assimilation dans le cycle photosynthétique du CO₂ libéré par la décarboxylation du malate.

La présence de la photorespiration chez les plantes CAM est indiquée par différents types d'investigations : incorporation de ¹⁴C dans les métabolites de la voie du glycolate chez Bryophyllum tubiflorum et Kalanchoe daigremontiana (Kluge, 1969 ; Osmond, 1975), sensibilité de la photosynthèse à la concentration d'oxygène chez Kalanchoe daigremontiana et Ananas comosus (Osmond et Björkman, 1975 ; Moradshahi et al., 1977), présence d'un pic post-illuminatoire de dégagement de CO₂ chez Aloe vera et Ananas comosus (Crews et al., 1975), mesure de fixation d'O₂ sous lumière par ¹⁸O chez Sempervivum tectorum, Prenia sladeniana, Kalanchoe blossfeldiana (André et al., 1979 ; Thomas et André, 1987 ; Thomas et al., 1987). Pendant la première partie du jour, le mécanisme de concentration de CO₂ que constitue l'étape décarboxylation de malate-refixation du CO₂ libéré devrait diminuer l'activité du cycle photorespiratoire par répression de l'activité oxygénasique de la RUBISCO. Cette hypothèse n'a pas pu être confirmée par les méthodes indirectes de caractérisation de la photorespiration (sensibilité de la photosynthèse à l'O₂, incorporation de ¹⁴CO₂, étude du pic post-illuminatoire) compte tenu, pendant la première partie du jour, de l'absence (ou de la faible intensité) de fixation nette de CO₂ et de l'existence d'un dégagement de CO₂ associé à la dégradation de malate aux transitions lumière-obscurité (Crews et al., 1975). Les mesures de fixation d'O₂ sous lumière récemment rapportées par Thomas et André (1987) permettent de distinguer chez Sempervivum tectorum une prise d'oxygène plus faible pendant la première partie du jour. Cette observation est un argument en faveur d'une modulation de l'activité oxygénasique de la RUBISCO par le métabolisme crassulacéen. La vérification de

cette hypothèse n'a cependant pas été entreprise dans l'étude précédente. Déterminée par la méthode isotopique utilisant ^{18}O , la photoconsommation d'oxygène de différentes plantes à métabolisme crassulacéen se distingue de celles des plantes C_3 par un rapport fixation d' O_2 /photosynthèse élevé à l'échelle du jour (André et al., 1979 ; Thomas et André, 1987 ; Thomas et al., 1987) et chez Sempervivum tectorum par une répression seulement partielle en présence de forte concentration de CO_2 (Thomas et al., 1987). Ces observations sont-elles compatibles avec l'attribution majoritaire des processus de fixation d' O_2 à l'activité du cycle photorespiratoire chez les plantes CAM comme c'est le cas chez les plantes C_3 (Gerbaud et André, 1979 ; Calvin et al., 1980) ? La troisième partie de ce travail a pour objectif de déterminer la fixation d' O_2 au cours des différentes phases diurnes du cycle CAM et préciser les relations entre photorespiration et métabolisme crassulacéen.



1



2



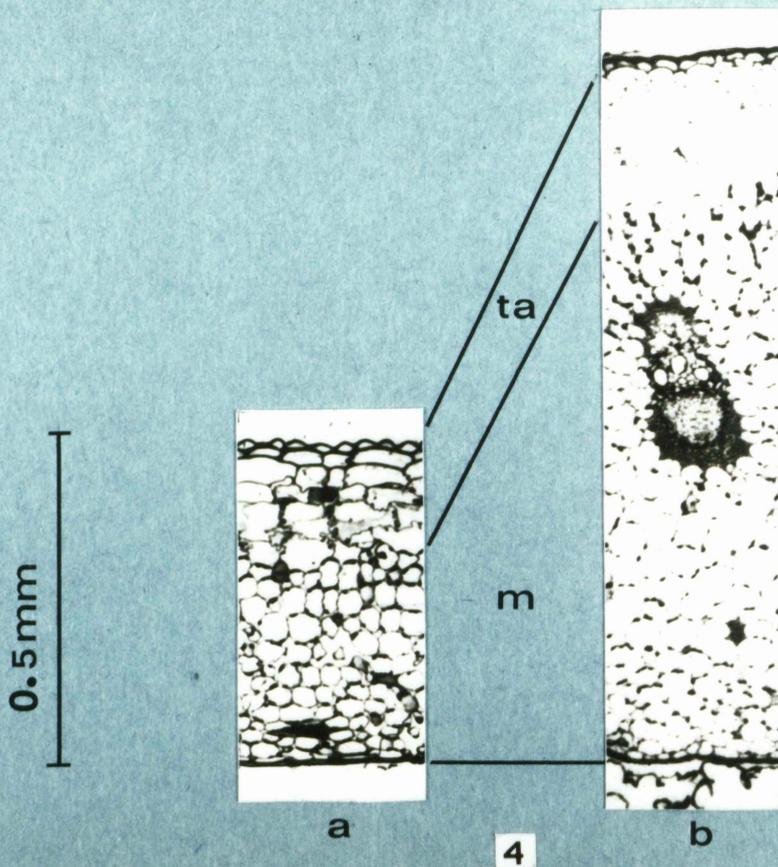
3

Photo 1 : Ananas issus de rejets en chambres de mesure de 700l.

Photo 2 : Ananas issus de culture in vitro en minichambres de mesure.

Photo 3 : Ananas issus de culture in vitro à différents stades de croissance : R+X (X=temps en mois après repiquage (R) des plants en chambre de culture)

Photo 4 : Coupes transversales de la feuille la plus développée à 2 stades de croissance de vitroplants
Photo 4a: stade R, photo 4b: stade R+7, m: mésophylle, ta: tissu aquifère.



4

CHAPITRE I

MATERIEL ET METHODES

I.I - Matériel végétal et conditions de culture

I.I.1 - Matériel végétal

Toutes les plantes utilisées au cours de cette étude sont issues d'un clône unique d'Ananas comosus (L.) Merr, Variété Cayenne lisse.

. Origine des ananas issus de rejets (photo 1). Avant leur transfert en chambre de culture, les ananas issus de rejets utilisés dans cette étude ont effectué les 5 à 6 premiers mois de leur développement (après repiquage) en serre tropicale à Montpellier pour un premier lot ou en station agronomique de Côte d'Ivoire pour un second lot. Au cours de ce développement, l'arrosage et la nutrition minérale ont été apportés en quantité non limitante.

. Origine des ananas issus de culture in vitro (photos 2, 3). Les jeunes plants d'ananas ont été régulièrement fournis par le laboratoire de culture in vitro du CIRAD (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, Montpellier). A leur sortie du tube de culture, les plantules de quelques grammes sont transférées sur terreau et conservées à une température proche de 20° et une intensité d'éclairement inférieur à 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. En fonction des nécessités expérimentales, elles sont repiquées sur substrat inerte et placées en chambre de culture. Le terme "vitroplant" sera parfois employé dans la suite de cet exposé pour désigner des ananas issus de culture in vitro. Précisons qu'il correspond à une facilité de langage mais ne caractérise pas un stade physiologique de développement particulier.

	Expérimentation	Croissance
Photopériode	12h/12h	
Eclairement ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	600 - 700	450 - 700
Température J/N (°C)	28 / 22	28-30 / 20-22
Humidité relative J/N (% de la saturation)	60-70/80	60-70/80-90
Nutrition minérale et hydrique	Hoagland n°2 ; pH 5	
Concentration CO ₂ ($\mu\text{l.L}^{-1}$)	340	340 - 500
Concentration O ₂ (%)	20,6 \pm 1,5	20,6

Tableau I : Conditions générales de culture

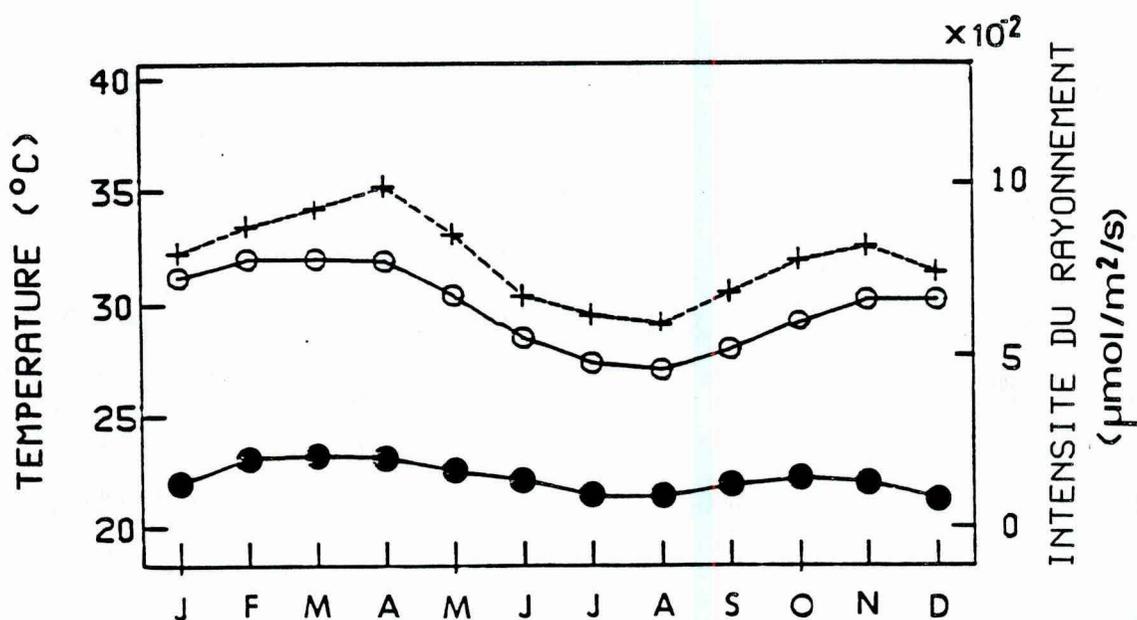


Figure 2 : Température et rayonnement journalier moyen d'une station agronomique de culture d'ananas de Côte d'Ivoire (Anguededou). Température mini : —●— ; température maxi : —○— ; rayonnement : --+-- (de 400 à 700nm ; pendant 12 h).

I.I.2 - Conditions de culture

Les conditions générales de culture sont résumées sur le tableau I.

. Conditions climatiques. Elles ont été choisies par référence au climat moyen d'une station agronomique de culture d'ananas en Côte d'Ivoire (fig. 2). Notons que Bartholomew (1982), dans ses travaux sur l'effet de la thermopériode sur le développement de l'ananas, rapporte une accumulation de matière sèche maximale pour des conditions de culture comparables à celles retenues dans notre étude (Température jour/nuit : 30°C/22°C ; photopériode : 12h/12h, éclairement : 500 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$).

L'éclairement (mesuré au sommet de la culture) a une valeur constante tout au long de la période diurne. Aux transitions lumière/obscurité; la température atteint sa valeur de consigne en 15 à 30 mn. La température diurne des feuilles, déterminée à l'aide d'un thermocouple, est en moyenne de 1 à 3°C supérieure à la température sous abri.

Au cours de certaines expérimentations, des conditions différentes de celles présentées dans le tableau I ont été utilisées, elles seront, le cas échéant, précisées dans le texte. Notons dès maintenant que, pour les ananas issus de rejets du lot "Serre de Montpellier", la température diurne était de 26°5 C et que, pour les expériences réalisées en chambre de mesure foliaire, l'éclairement a été diminué (pour faciliter la régulation de température) à 200 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ dans le cas des déterminations d'échanges gazeux de vitroplants de quelques grammes et à 400 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ pour les mesures sur feuilles attachées.

. Alimentation hydrique et minérale. L'alimentation hydrique est apportée par la solution nutritive pour les vitroplants et le lot d'ananas de "Côte d'Ivoire" ; par de l'eau pour le lot de plants "Serre" cultivés sur terreau. Le volume de l'apport représente environ 2 fois le volume transpiré dans

MACROELEMENTS (meq l ⁻¹)				
	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	PO ₄ ³⁻	Total
K ⁺	6,5			6,5
Mg ²⁺		4,0		4,0
Ca ²⁺	8,0			8,0
NH ₄ ⁺			1,0	1,0
H ⁺			2,0	2,0
Total	14,5	4,0	3,0	21,5
OLIGOELEMENTS (mg l ⁻¹)				
Cu SO ₄ 5H ₂ O				0,08
H ₃ BO ₃				2,86
Mn Cl ₂ 4H ₂ O				1,81
ZnSO ₄ 7H ₂ O				0,25
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O				0,25
EDTA ferrique (séquestrène)				3
PH = 5				

Tableau II : Composition de la solution nutritive Hoagland n° 2 (pH5).

le cas des plants issus de rejets. Pour les vitroplants, un apport par solution semi-coulante a été utilisé : toutes les quatre heures, 25 ml de solution nutritive sont fournis à chaque plant ; ce volume est doublé pour les plants âgés de 5 mois et plus. Dans tous les cas, il couvre les besoins de la plante quel que soit son âge.

L'alimentation minérale est apportée par une solution Hoagland n° 2 à pH 5 (Hoagland et Arnon, 1950) (tableau II) pour les vitroplants et le lot "Côte d'Ivoire". Dans le cas des plants cultivés sur terreau, 10 g par plant d'un engrais N, P, K (15, 15, 15) ont été fournis pour 4 mois de culture.

. Substrat de culture. Le lot d'ananas issus de rejets "Serre de Montpellier" a été cultivé sur terreau, celui de "Côte d'Ivoire" sur sable. Un substrat type perlite (Agriperl) s'est révélé le mieux adapté à l'enracinement rapide des vitroplants. Le volume des pots de culture était de 6 l pour les ananas issus de rejets, 0,5 l pour les vitroplants. Dans ces différentes situations, l'écoulement de l'arrosage excédentaire s'effectuait correctement. Pendant les déterminations d'échanges gazeux, lorsque les parties racinaires des vitroplants étaient isolées des parties aériennes, une aération du compartiment racinaire de 10 l/h était mise en place.

I.I.3 - Evolution de quelques caractéristiques botaniques au cours du développement d'ananas issus de culture in vitro

Le développement de jeunes plants d'ananas (issus de graines ou de culture in vitro) n'a pas à notre connaissance fait l'objet d'étude spécifique publiée. Nous rapportons ici l'évolution de quelques caractéristiques botaniques observées au cours de la croissance d'un lot limité de plants cultivés dans les conditions précédemment décrites.

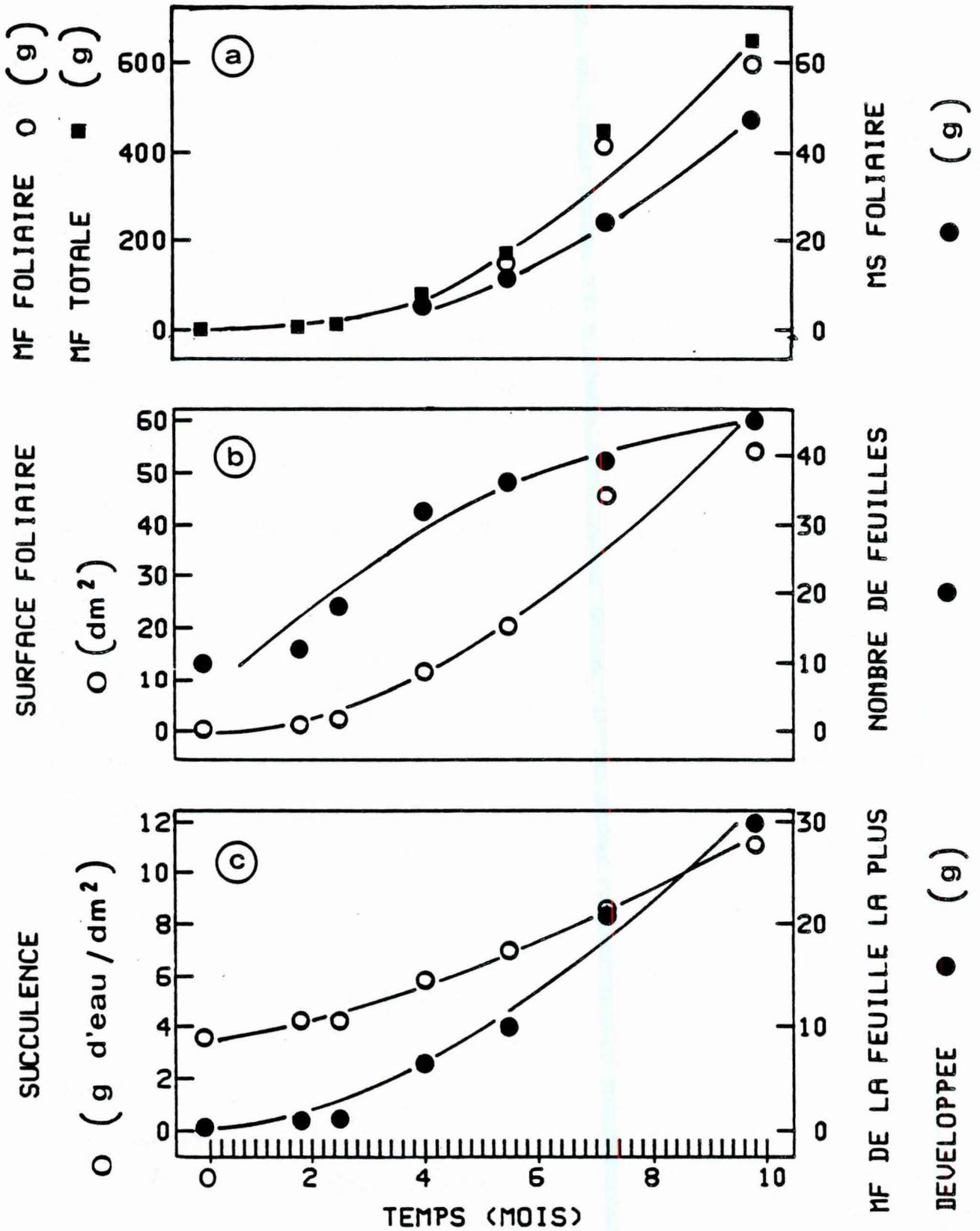


Figure 3 : Evolution de quelques caractéristiques botaniques au cours de la croissance de vitroplants d'ananas.

Les augmentations de masse et surface foliaire présentent en première approximation des courbes d'allures exponentielles à l'échelle de temps étudiée (fig. 3a, b, c). Comme chez le plant adulte " (Py et al., 1984), la masse de matière foliaire représente chez le vitroplant la part essentielle de la masse totale (pour les différents âges présentés, les feuilles représentent 90 à 93 % de la masse de matière fraîche totale, les racines et la tige se partagent à part comparable le pourcentage complémentaire). La masse de matière fraîche totale des parties aériennes atteinte par un vitroplant de 10 mois est voisine de celle rapportée par Lacoeuilhe (1976a) pour des plants issus de rejets (de 200 à 250 g) 4 à 5 mois après leur repiquage en station agronomique. L'augmentation de la succulence (masse d'eau par unité de surface foliaire) au cours du développement est attestée par la détermination directe présentée en figure 3c et par des coupes anatomiques de feuilles (photo 4). Ces coupes indiquent que c'est principalement le mésophylle qui est responsable, par le développement du nombre et de la taille de ses cellules, de cette augmentation de succulence.

Des plants de masse foliaire fraîche comprise entre 100 et 250 g ont été le plus souvent employés pour l'étude des échanges gazeux photosynthétiques et photorespiratoires : à ce stade de développement, un compromis satisfaisant est atteint entre la facilité de détermination des échanges gazeux (volume d'échange suffisant) et l'intensité du métabolisme CAM (pour une comparaison possible avec des plants adultes, voir chapitre II).

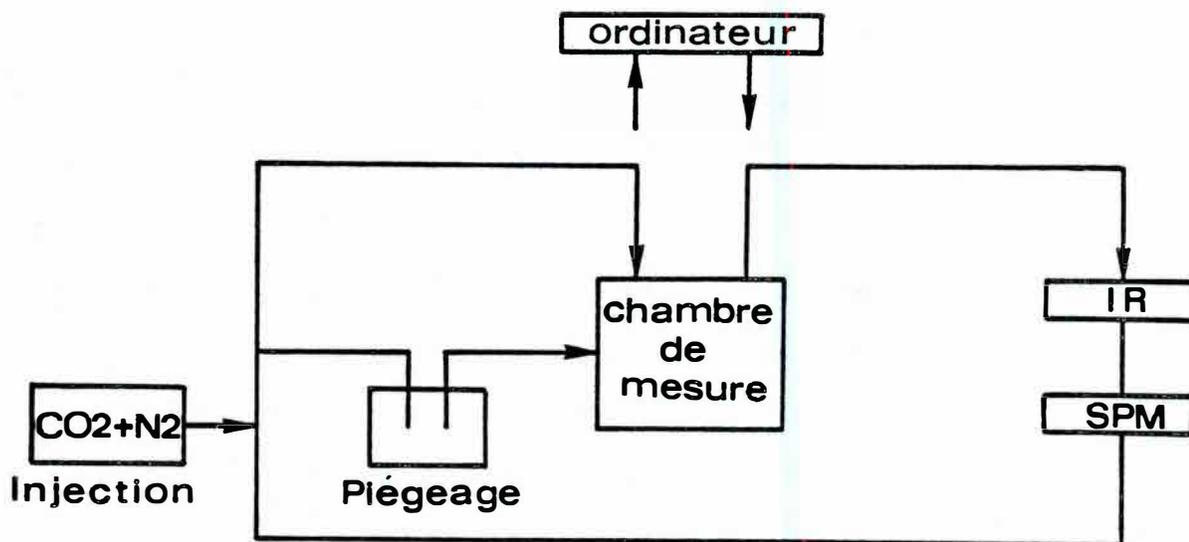


Figure 4 : Schéma d'organisation du système C23A.

La chambre de mesure est connectée à un circuit d'analyse gazeux incluant un analyseur de CO₂ à infrarouge (IR) ; un circuit de régulation de la concentration en CO₂ par injection d'un mélange CO₂ + N₂ ou piégeage de CO₂ sur chaux sodée ; un spectromètre de masse (SPM) pour l'analyse de ¹⁶O₂ ; ¹⁸O₂ ; ²⁰Ne. La gestion de l'ensemble du système est assurée en temps réel par informatique.

I.II - Détermination des échanges gazeux en conditions contrôlées

I.II.1 - Description du système expérimental

Les échanges gazeux plante-atmosphère (photosynthèse, respiration, transpiration) ont été déterminés en chambre de culture automatique en atmosphère artificielle (système C₂3A). Ce dispositif expérimental répond à un double objectif :

- Maîtrise de la culture de végétaux en conditions contrôlées (paramètres climatiques, alimentation hydrique, nutrition minérale, atmosphère gazeuse).

- Quantification en continu, à l'échelle de l'heure ou du cycle de développement complet des échanges entre le végétal et son milieu (échanges gazeux, nutrition minérale).

La description de ce système a fait l'objet de plusieurs publications détaillées (André et al. 1979a, 1979b, 1985). Nous nous contenterons d'en rappeler ici le principe de fonctionnement général en précisant que cet équipement est modulable et adaptable aux particularités de chaque type d'expérimentation et qu'il est en évolution permanente.

Un système C₂3A se compose principalement de (fig. 4) : a) une chambre de mesure (pouvant inclure un compartiment aérien et racinaire) ; b) un circuit d'analyse et régulation des concentrations gazeuses ; c) un système informatique assurant en temps réel la gestion du dispositif expérimental (commande d'actions et archivage des données).

a) Les chambres de mesure

. Ce sont des enceintes étanches de volume variable, associées par paires, maintenues à la pression atmosphérique par utilisation d'un siphon débulleur. Les échanges gazeux de lots d'ananas issus de rejets ont été déterminés dans des chambres de culture de 700 l et 0,5 m² de surface utile (photo 1), celle des vitroplants dans des minichambres constituées par des cloches

de verre de 6 à 25 litres (photo 2). Un troisième type d'enceinte, constitué de cylindres de verre (diamètre 50 mm ; 0,8 l) a été mis au point pour permettre la détermination des échanges gazeux de feuilles attachées ou de très jeunes vitroplants.

- . L'éclairage des enceintes est assuré par 1 à 12 lampes à décharges (Osram HQI 400W) recréant au mieux le spectre lumineux solaire visible. Les performances des lampadaires permettent un choix d'intensité lumineuse dans la gamme 100-1600 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. L'intensité de l'éclairage utile (400-800nm) est régulièrement contrôlée à l'aide d'un quantum sensor (Licor). Dans la chambre de mesure, les écarts maximums par rapport à l'éclairage moyen sont de l'ordre de 10 %.
- . La climatisation des chambres de mesure de 700 l est obtenue par ventilation régulée d'un flux d'air sur un échangeur calorifique (batterie de radiateurs) dans lequel circule un réfrigérant. Les minichambres de mesure et chambres d'assimilation foliaire sont disposées dans une chambre thermorégulée de 700 l et possèdent de plus leur propre échangeur calorifique. La température du réfrigérant fixe le point de rosée. Une précision de régulation de $\pm 0,5^\circ \text{C}$ par rapport à la consigne de température choisie est obtenue par ce système. Le débit d'air dans la cellule, mesuré à la sortie de l'échangeur calorifique, est de l'ordre de 0,5 m/s dans les chambres de 700 l.
- . Chaque chambre de mesure est équipée d'un système d'arrosage. Le dispositif est pneumatique pour les grandes enceintes (Gerbaud et Daguinet, 1984) ; ou assuré par une pompe péristaltique pour les minichambres. La vapeur d'eau émise par la plante est condensée sur l'échangeur calorifique, puis recueillie par gravité.

b) Le circuit d'analyse et régulation des concentrations gazeuses

Mesure et régulation de la concentration de CO₂. La concentration en CO₂ de l'atmosphère de la chambre de culture est mesurée par analyse infra rouge. Les analyseurs utilisés (ADC MKII ou MAIHAK UNOR 6N) couvrent la gamme de mesure 0-5000 µl/l avec une précision de l'ordre de 1 à 25 µl/l. La fixation de CO₂ par la plante est compensée par injection d'un mélange CO₂ + N₂ (injection à pression constante et par électrovanne calibrée). Le dégagement de CO₂ respiratoire est compensé par dérivation sur un piège à CO₂ (chaux sodée) d'une partie de l'air de l'enceinte de culture (piégeage à débit constant pendant un temps contrôlé). Le programme informatique de régulation commande les actions d'injection ou piégeage de CO₂ nécessaires au maintien stable de la concentration de CO₂ à la valeur choisie. Il anticipe, par référence à ses commandes antérieures, les échanges de la plante. Par ce procédé, l'écart de concentration de CO₂ avec la consigne n'excède pas en moyenne 4 %.

Mesure de la concentration en oxygène et néon, maintien de la concentration O₂ égale à 20,6 %. Les mesures de concentration en oxygène (¹⁸O₂ et ¹⁶O₂), néon (gaz de référence utilisé pour la détermination de la fixation d'O₂ sous lumière) sont réalisées par un spectromètre de masse quadrupolaire (RIBER QMM17). L'analyse de l'atmosphère des chambres de culture est faite 1 à 6 fois par heure (prélèvement de 0,5 cm³ d'air à chaque analyse) par référence à celles de gaz étalons. L'erreur relative sur la mesure des gaz étalons est de l'ordre de 0,1 à 0,3 %.

En système clos, le dégagement photosynthétique d'O₂ par les plantes conduirait très rapidement la concentration de ce gaz à augmenter au-delà de sa concentration naturelle de 20,6 %. Pour maintenir cette concentration en chambre de mesure, chaque injection de CO₂ est accompagnée de celle simultanée d'azote. En pratique le quotient photosynthétique (O₂ net émis/CO₂

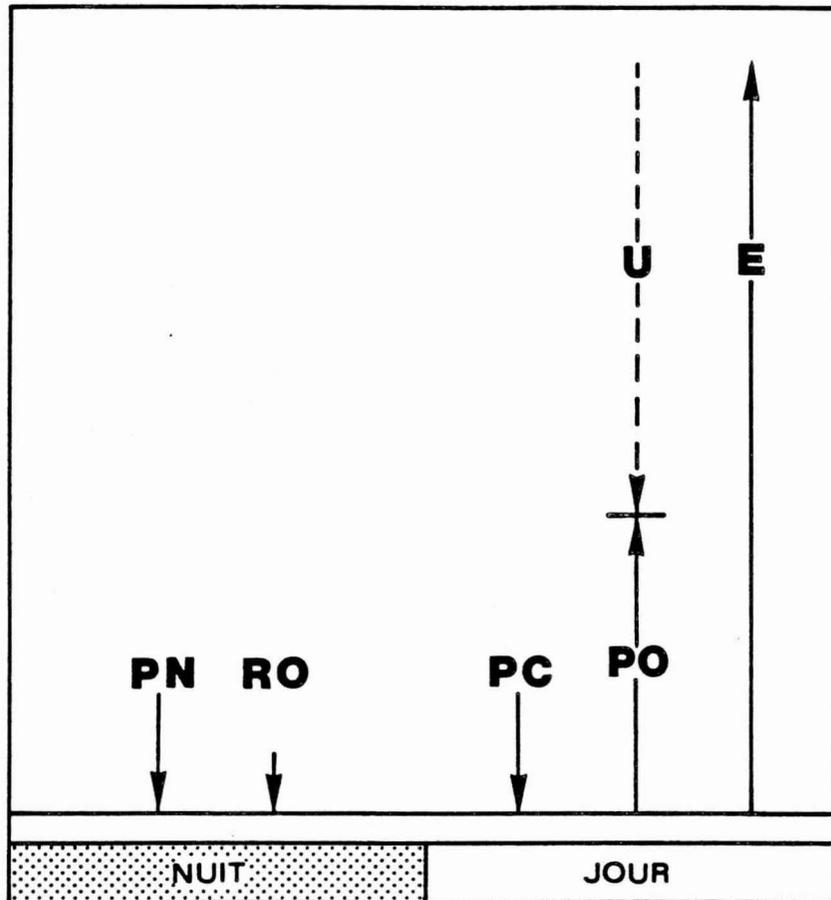


Figure 5 : Représentation schématique des échanges gazeux CO_2 et O_2 d'une plante à métabolisme CAM.

- . ↓ : Flux entrant dans la plante
- . ↑ : Flux sortant de la plante
- . Flux net PN : Fixation nocturne de CO_2
- RO : Fixation nocturne d' O_2
- PC : Echange (fixation) diurne de CO_2
- PO : Emission diurne d' O_2
- . Flux unidirectionnel U : Fixation d'oxygène sous lumière.
- . Flux calculé E : Emission photosynthétique brute d'oxygène $E = U + PO$

net fixé) étant voisin de 1, c'est un mélange précis contenant 20 % de CO₂ et 80 % d'azote qui est injecté par la régulation de CO₂. Avec l'ananas, ce procédé permet (y compris de nuit) de maintenir la concentration d'O₂ à 20,6 ± 1,5 %. Pour les expériences réalisées en hypoxie, un système calibré d'injection supplémentaire d'azote est utilisé.

c) Le système informatique et les séquences de scrutations

Un miniordinateur (Télémécanique T1600) gère en temps réel l'ensemble du dispositif expérimental. L'état de chaque chambre de mesure est analysé 6 à 12 fois par heure. Ces "scrutations" rendent compte de l'état physique de l'enceinte et des systèmes associés (température, éclairage, concentrations gazeuses) ainsi que des actions d'injection ou piégeage de CO₂ intervenues depuis la dernière saisie de données. Ces différentes valeurs sont condensées en moyenne horaire (base de calcul des échanges gazeux) puis journalière et peuvent être consultées ou éditées sous forme de tableaux et courbes (archives tournantes de 3 heures pour les scrutations ; de 3 à 6 jours pour les moyennes horaires). Les différentes données sont également archivables sur disquette informatique, un programme de calcul permet alors leur traitement ultérieur.

I.II.2 - Quantification des échanges gazeux

Les différents échanges de CO₂ et O₂ entre une plante à métabolisme crassulacéen et l'atmosphère, mesurables en C₂3A, sont résumés sur la figure 5. Pour des facilités de représentations graphiques, ces échanges ont été comptés en valeurs positives sauf l'émission nette de CO₂ et la fixation nocturne d'oxygène. Les échanges gazeux sont calculés à l'échelle de l'heure et représentent un débit. Pour des facilités de langage, nous emploierons parfois le terme de "vitesse horaire" ou de "flux".

a) Détermination du bilan net d'échange de CO₂

Chaque injection ou seconde de piégeage de CO₂ nécessaire au maintien stable de la concentration libre ou fixe une quantité déterminée de ce gaz. La fixation nette de CO₂ (β -carboxylation et photosynthèse) est déduite du nombre d'injections, le dégagement de CO₂ du temps de piégeage.

b) Mesure du bilan net d'oxygène

Dans la chambre de mesure, la variation de concentration d'oxygène est liée d'une part aux échanges de la plante, d'autre part à une dilution par l'injection du mélange CO₂ + 4 N₂. Cette variation (ΔO_2) pour un temps donné est telle que (Gerbaud, 1981)

$$V \times \Delta O_2 = P_0 \text{ (ou } R_0) - v O_2 \quad (1)$$

où V : volume total de la chambre de mesure et des circuits d'analyse.

. v : volume gazeux expulsé de la chambre de mesure par la régulation de CO₂; $v = 4P + P_0$ (ou $-R_0$), P étant le bilan net de CO₂ fixé par la plante.

O_2 concentration moyenne en oxygène pendant le temps d'analyse.

On déduit de cette équation l'émission diurne d'O₂ (P₀) ou la fixation nocturne d'O₂ (respiration) (R₀).

c) Détermination de la fixation d'oxygène sous lumière

Le flux unidirectionnel de fixation d'oxygène sous lumière est déterminé par une méthode isotopique utilisant l'isotope stable ¹⁸O₂ comme traceur. La validité de cette méthode pour la détermination de la photorespiration au sens large (la fixation d'O₂ sous lumière) est attestée par les considérations suivantes :

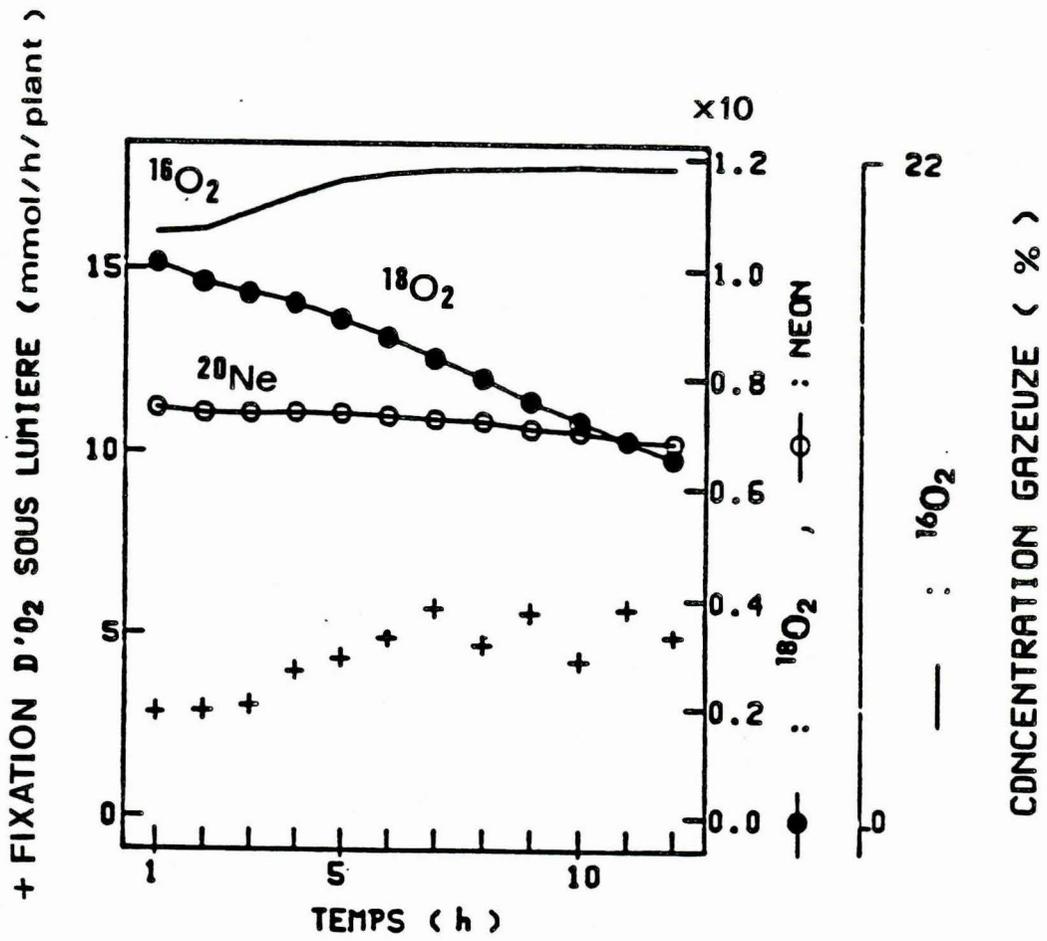


Figure 6 : Détermination de la fixation d' O_2 sous lumière par la méthode isotopique $^{18}O_2$. Exemple de mesure chez un vitroplant d'ananas.

- . Le fractionnement isotopique entre $^{18}\text{O}_2$ et $^{16}\text{O}_2$ par les végétaux est négligeable à l'échelle des flux mesurés (Dimon, 1977).
- . Une émission par la plante de $^{18}\text{O}_2$ qui témoignerait de la remobilisation de deux atomes de ^{18}O précédemment fixés (après photolyse de deux molécules de H_2^{18}O) n'a pas été observée après une période de marquage et chasse avec cet isotope.
- . Un échange entre atome d'oxygène ^{18}O de l'air et ^{16}O de la molécule d'eau n'est pas détectable à la température ordinaire à notre échelle de temps de mesure.
- . Le recyclage par la photorespiration de l'oxygène issu de la photolyse de l'eau (qui conduirait à une détermination par défaut du flux unidirectionnel de fixation d' O_2) est négligeable comparé à la valeur des flux mesurés (Gerbaud et André, 1987). Ce point, dans le cas précis de l'ananas, sera discuté au chapitre IV.

L'isotope $^{18}\text{O}_2$ est introduit dans la chambre de mesure à une concentration comprise entre 0,1 et 1 %. Cette concentration diminue par la consommation d'oxygène de la plante d'une part et par la dilution liée aux injections de la régulation de CO_2 d'autre part. Ce dernier phénomène est quantifié par la mesure de la diminution de la concentration d'un gaz de référence, le Néon (^{20}Ne) injecté simultanément avec $^{18}\text{O}_2$ (fig. 6). Cette méthode permet une détermination de la fixation d'oxygène même en cas de fuite résiduelle dans le circuit d'analyse gazeux ou la chambre de mesure. La consommation d' O_2 sous lumière U se calcule par l'équation suivante (Gerbaud, 1981) :

$$U = V \cdot O_2 \cdot \ln \frac{{}^{18}O_2 \text{ i} / {}^{20}Ne \text{ i}}{{}^{18}O_2 \text{ f} / {}^{20}Ne \text{ f}} \quad (2)$$

- où V : volume total de la chambre d'assimilation et des circuits d'analyse
 O_2 : concentration moyenne d'oxygène entre les instants initial (i) et final (f) de la mesure
 ${}^{18}O_2$, ${}^{20}Ne$: concentrations de ${}^{18}O_2$, ${}^{20}Ne$ aux instants initiaux (i) et finaux (f).

La consommation d'oxygène U ainsi déterminée on peut, connaissant la production nette P_0 , calculer la production brute d'oxygène $E = P_0 + U$. E est une mesure du flux d'électrons généré par les réactions claires de la photosynthèse au niveau des membranes chloroplastiques.

En présence de ${}^{18}O_2$, la production nette d'oxygène (P_0) est calculée par le système d'équations suivantes :

. Equation (2)

$$. V \cdot \Delta {}^{16}O_2 = E - U \cdot {}^{16}O_2 / ({}^{18}O_2 + {}^{16}O_2) - v \cdot {}^{16}O_2 \quad (3)$$

$$. P_0 = E - U \quad (4)$$

- où $\Delta {}^{16}O_2$: variation de la concentration de ${}^{16}O_2$ pendant le temps d'analyse
 ${}^{16}O_2$: concentration moyenne de ${}^{16}O_2$ pendant le temps d'analyse
 v : volume gazeux expulsé de la chambre de mesure par la régulation de CO_2

d) Détermination de la transpiration

La vapeur d'eau émise par la plante est condensée au niveau de l'échangeur calorifique puis recueillie et pesée. Cette pesée a été effectuée manuellement et quotidiennement au début de cette étude puis de façon automatique selon la séquence de scrutation par une balance électronique lors de la deuxième partie de l'étude. Avec ce système, compte tenu de la faiblesse des échanges de vapeur d'eau d'une plante à métabolisme CAM, seules les transpirations horaires de vitroplants de plus de 100 g sont déterminables avec suffisamment de précision.

é) Problèmes liés aux échanges gazeux des parties non chlorophylliennes.

Une étude des échanges gazeux photosynthétiques et photorespiratoires sur plante entière se heurte toujours aux problèmes posés par la respiration des parties non chlorophylliennes du végétal. Nous rappellerons ici l'interférence de cette respiration sur la détermination des échanges gazeux des tissus chlorophylliens et les moyens utilisés pour minimiser son influence.

- . Echanges gazeux du compartiment racinaire. Lors des expérimentations réalisées sur vitroplants les parties aériennes sont séparées des parties racinaires par un joint de mastic (Terostat) non toxique pour la plante (cet isolement n'est cependant pas réalisé sur les vitroplants de quelques grammes dont les racines sont très réduites). Ce type d'isolement ne peut pas être employé sur des ananas issus de rejets. Compte tenu de l'encombrement des multiples rangs foliaires présents à la base de ces plants. Dans ces conditions, pour déterminer les échanges gazeux des parties aériennes, on soustrait du bilan d'échange total la respiration du compartiment racinaire (respiration racinaire et éventuellement respiration du terreau dans le cas des ananas élevés en serre à Montpellier). Cette respiration est évaluée par la détermination en début et fin d'expérimentation des échanges gazeux de différents "pots témoins" dans lesquels les parties aériennes sont coupées.
- . Echanges gazeux des tissus non chlorophylliens de l'appareil aérien. Ces tissus, principalement la tige et la base des feuilles, peuvent présenter selon nos déterminations de 15 à 20 % de la masse fraîche des parties aériennes de l'ananas. La respiration de ces parties non chlorophylliennes conduit de jour à une sous-estimation de la photosynthèse et du dégagement photosynthétique d'O₂, une surestimation de la fixation d'O₂ ; de nuit, à une sous-estimation de la fixation de CO₂. Notons qu'avec un quotient respi-

ratoire proche de 1, cette respiration ne perturbera pas le calcul de la fixation brute nocturne de CO₂ (PN + R₀); de jour, elle diminuera d'une même valeur le dégagement net d'O₂ et la fixation nette de CO₂. Concernant la photorespiration, le problème de la respiration des tissus non chlorophylliens sera évoqué au chapitre IV lors de la comparaison de U et R₀ et des mesures d'échanges réalisées sur feuilles attachées.

I.III - Principales autres techniques expérimentales et méthodes utilisées

I.III.1 - Echantillonnage des plants

A l'issue des expériences, la masse de matière fraîche et la surface foliaire totale du plant sont déterminées. Cette dernière est déduite d'une pesée après décalage des feuilles sur papier calibré. Dans les résultats exprimés par unité de surface foliaire, la surface a été estimée au plus tard 8 jours après la fin des déterminations d'échanges gazeux.

I.III.2 - Dosage de malate

Immédiatement après échantillonnage, le matériel végétal est fixé dans de l'azote liquide. Il est ensuite lyophilisé puis broyé. De la poudre végétale obtenue, on extrait les composés solubles à l'eau bouillante (3 épuisements successifs). Le dosage est réalisé selon la méthode enzymatique (oxydoréduction du malate en OAA catalysée par la malate deshydrogénase) décrite par GUTHMANN et WALFHELD (1976).

I.III.3 - Rappel sur la loi de diffusion des gaz

La loi de diffusion des gaz entre deux compartiments séparés par une résistance à la diffusion R est telle que :

$$\Delta = R \times I$$

avec Δ = différence de pression partielle entre les 2 compartiments

R = résistance à la diffusion

I = intensité du flux

Par analogie les flux de transpiration et photosynthèse peuvent être exprimés par :

$$\Delta w = r \cdot TR \quad (5)$$

$$\Delta CO_2 = 1,6 \cdot r \cdot P \quad (6)$$

- avec . Δw : différence de pression de vapeur d'eau entre le site d'évaporation de la feuille (la cavité sous-stomatique) et l'atmosphère
- . r : résistance à la diffusion de vapeur d'eau (incluant la résistance stomatique à la diffusion et celle de la couche limite).
- . TR : intensité du flux de transpiration
- . ΔCO_2 : différence de pression partielle de CO_2 entre l'atmosphère et la cavité sous-stomatique
- . 1,6 : rapport entre les coefficients de diffusion vapeur d'eau/air et CO_2 /air
- . P : intensité du flux net de fixation de CO_2

Les équations (5) et (6) ont été utilisées à diverses reprises dans ce travail pour évaluer les concentrations sous-stomatiques de CO_2 . La signification des valeurs qu'elles permettent de calculer sera évoquée au cours de la discussion des résultats.

CHAPITRE II**FIXATION NETTE DE CO₂ PAR L'ANANAS :
RYTHME ET CAPACITES PHOTOSYNTHETIQUES**

Le métabolisme CAM est défini par la séparation temporelle entre la fixation nocturne de CO₂ et son assimilation le jour suivant dans le cycle de Calvin. Deux caractéristiques de ce type photosynthétique complètent cette définition : (a) sous l'influence de facteurs externes (climatiques) ou internes (stade de développement), la part respective de la fixation nocturne par rapport à la fixation diurne peut être variable pour une même espèce. (b) le métabolisme CAM se distingue des types métaboliques C₃ et C₄ par des capacités de fixation de CO₂ réduites et une efficacité de l'eau accrue (Kluger et Ting, 1978 ; Osmond, 1978 ; Winter, 1985). Le premier objectif de ce travail a été de préciser le niveau "d'induction CAM" (part respective de la carboxylation nocturne et diurne) et les performances photosynthétiques d'ananas placés dans des conditions de développement de type agronomique ; de comparer ces caractéristiques avec celles de jeunes plants issus de culture in vitro.

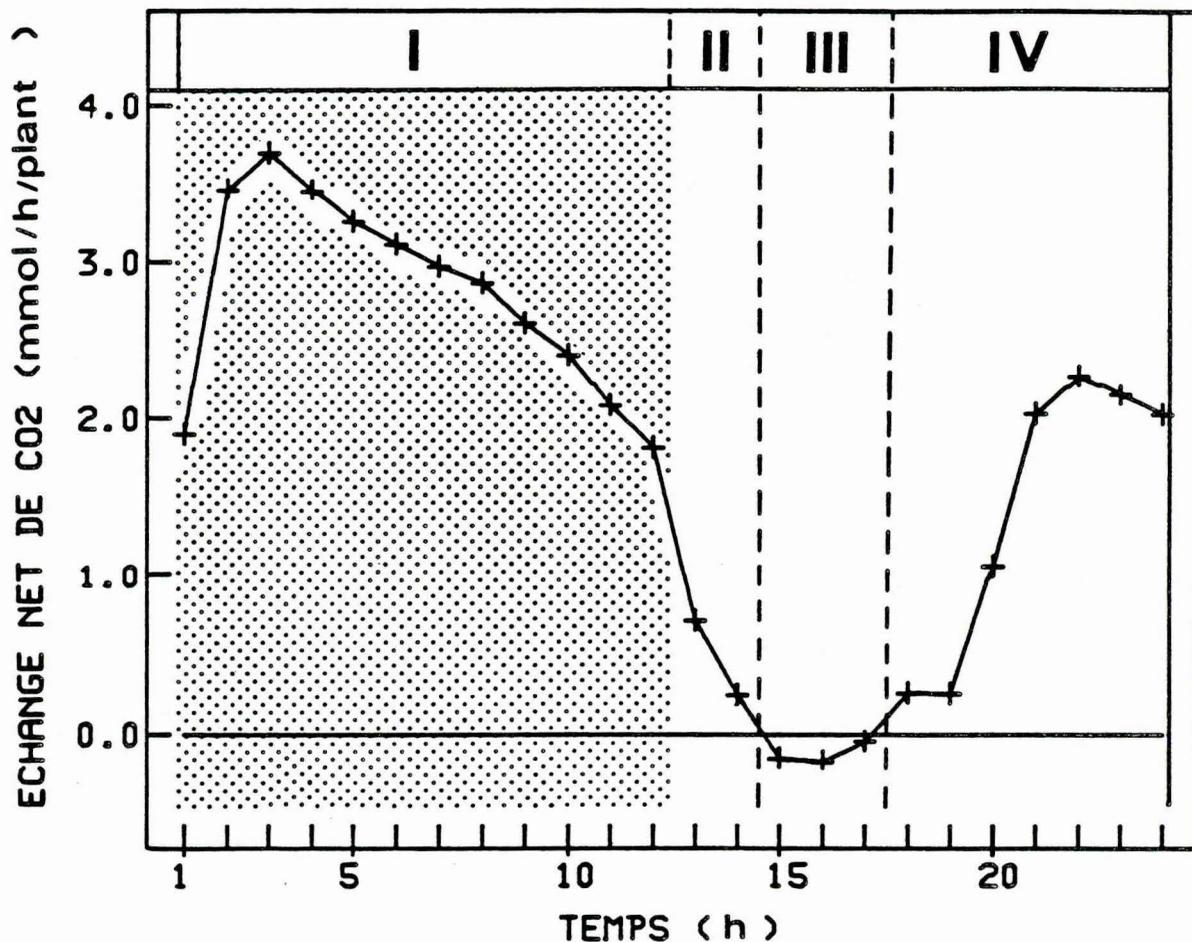


Figure 7 : Echanges nets de CO₂ des parties aériennes d'un plant d'ananas issu de rejet au cours d'une photopériode. La période nocturne est indiquée en grisé ; les chiffres romains délimitent les 4 phases du cycle CAM définies par Osmond (1978). (Caractéristiques du plant : 8 mois après repiquage du rejet, masse foliaire de matière fraîche : 630 g).

II.I - Rythme de fixation nette de CO₂ et intensité du métabolisme CAM

II.I.1 - Ananas issus de rejets

Les résultats présentés dans ce paragraphe sont des exemples de déterminations typiques d'échanges nets de CO₂ observés sur différents lots de plants.

a) Modèle des échanges nets de CO₂ au cours d'une photopériode

La fixation nette de CO₂ par une plante à métabolisme CAM présente un rythme circadien complexe (Queiroz, 1974). Reprenant la notation proposée par Osmond (1978), nous décrivons les 4 phases de ce rythme et leurs caractéristiques les plus souvent observées chez l'ananas issu de rejets cultivé en C₂3A (fig. 7) :

. Phase I : fixation nocturne de CO₂ par la PEP-Case.

De façon générale, la fixation de CO₂ atteint son maximum 2 à 3 heures après le début de la phase nocturne puis décroît progressivement. Les vitesses moyennes de fixation pendant cette période sont supérieures aux vitesses maximums atteintes par la fixation diurne de CO₂.

. Phase II : fixation transitoire de CO₂ au passage nuit/jour.

Cette phase est généralement limitée à la première heure du jour et n'excède jamais la deuxième.

. Phase III : au cours de la phase diurne, arrêt de la fixation nette de CO₂ et souvent même efflux de ce gaz.

La durée minimale de cette période est de 3 à 4 heures. De façon courante, la fixation nette de CO₂ est stoppée ou très réduite pendant 6 à 7 heures.

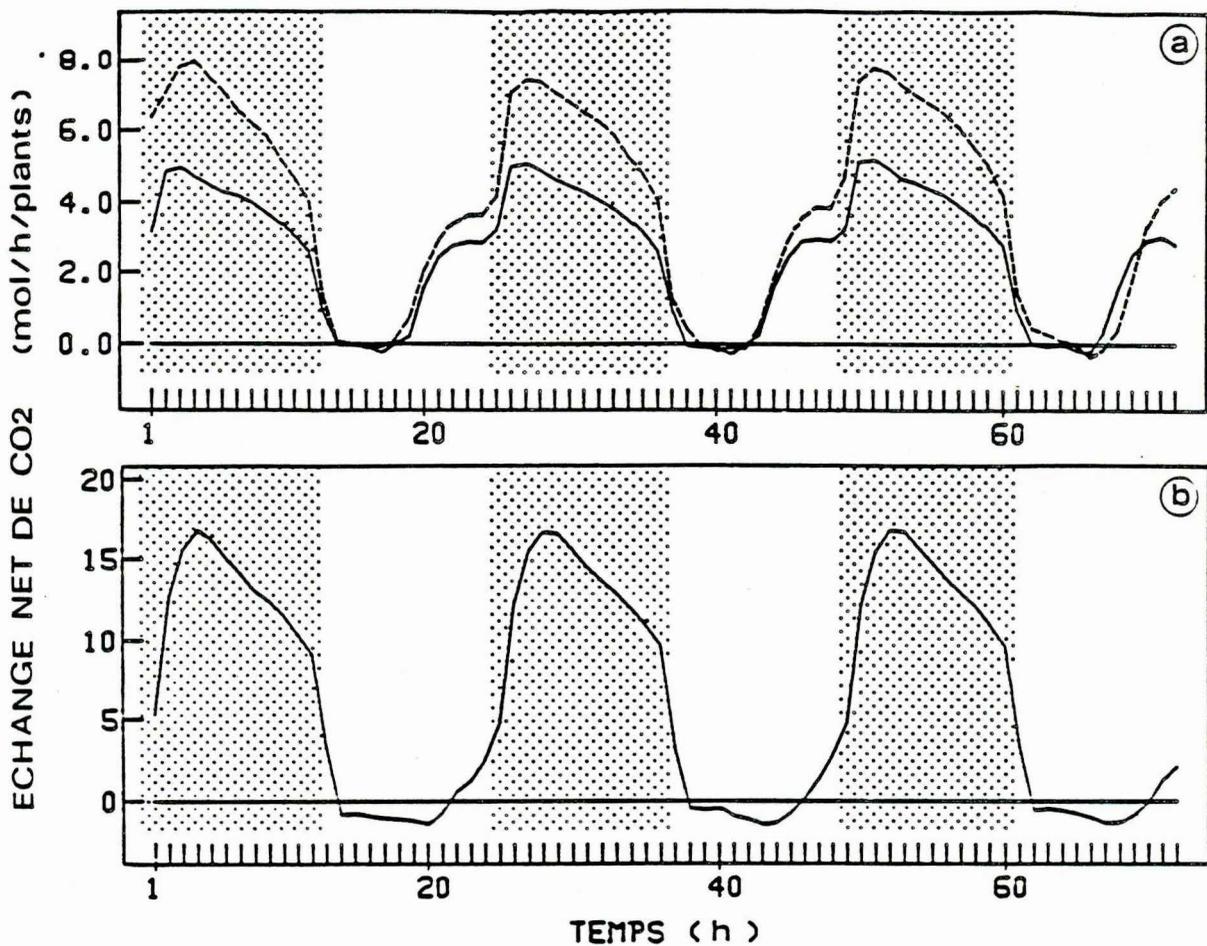


Figure 8 : Echanges nets de CO₂ des parties aériennes de lots d'ananas issus de rejets.

Fig. 8a : "Lot Côte d'Ivoire" ; 3 ananas ; 5 (—) et 6 (---) mois après repiquage des rejets.

Fig. 8b : "Lot serre de Montpellier" ; 4 ananas ; 8 mois après repiquage des rejets.

. Phase IV : reprise de la fixation de CO₂ pendant la seconde partie de la période diurne.

Au cours de cette étape, la fixation de CO₂ augmente progressivement et atteint son maximum 2 à 3 heures avant la fin du jour. Les deux dernières heures de la phase diurne sont souvent marquées par une décroissance de la fixation de CO₂.

Sur des lots de plants simulant un couvert d'ananas, les 4 phases précédemment décrites sont également distinguables (fig. 8).

b) Pourcentage de CO₂ fixé au cours des 4 phases du rythme CAM

Le tableau III figure la part respective de CO₂ fixé chez l'ananas au cours des 4 phases du métabolisme CAM. Ces différentes déterminations indiquent que l'essentiel de la fixation de CO₂ est nocturne chez cette plante. Pendant la phase IV, principale période de fixation diurne de CO₂, la fixation de CO₂ excède rarement plus de 20 % de la carboxylation totale.

Les plants d'ananas ayant effectué les cinq premiers mois de leur développement en serre tropicale présentaient dès leur réception une phase IV réduite (et un efflux important de CO₂ pendant la phase III) par rapport au lot importé de Côte d'Ivoire. L'origine de cette observation n'a pu être déterminée. Il est possible que l'effet d'un auto-ombrage puisse, chez une plante à métabolisme CAM, défavoriser le pourcentage de la fixation diurne par rapport à la fixation nocturne. Précisons cependant qu'une diminution du nombre d'ananas dans la chambre de culture lors de l'expérience rapportée en fig. 8b n'a pas augmenté la fixation relative de CO₂ pendant la phase IV. L'origine de la moindre capacité de fixation de CO₂ du "lot serre" est peut-être à rechercher dans ces conditions d'élevage particulières.

ECHANGE NET DE CO2

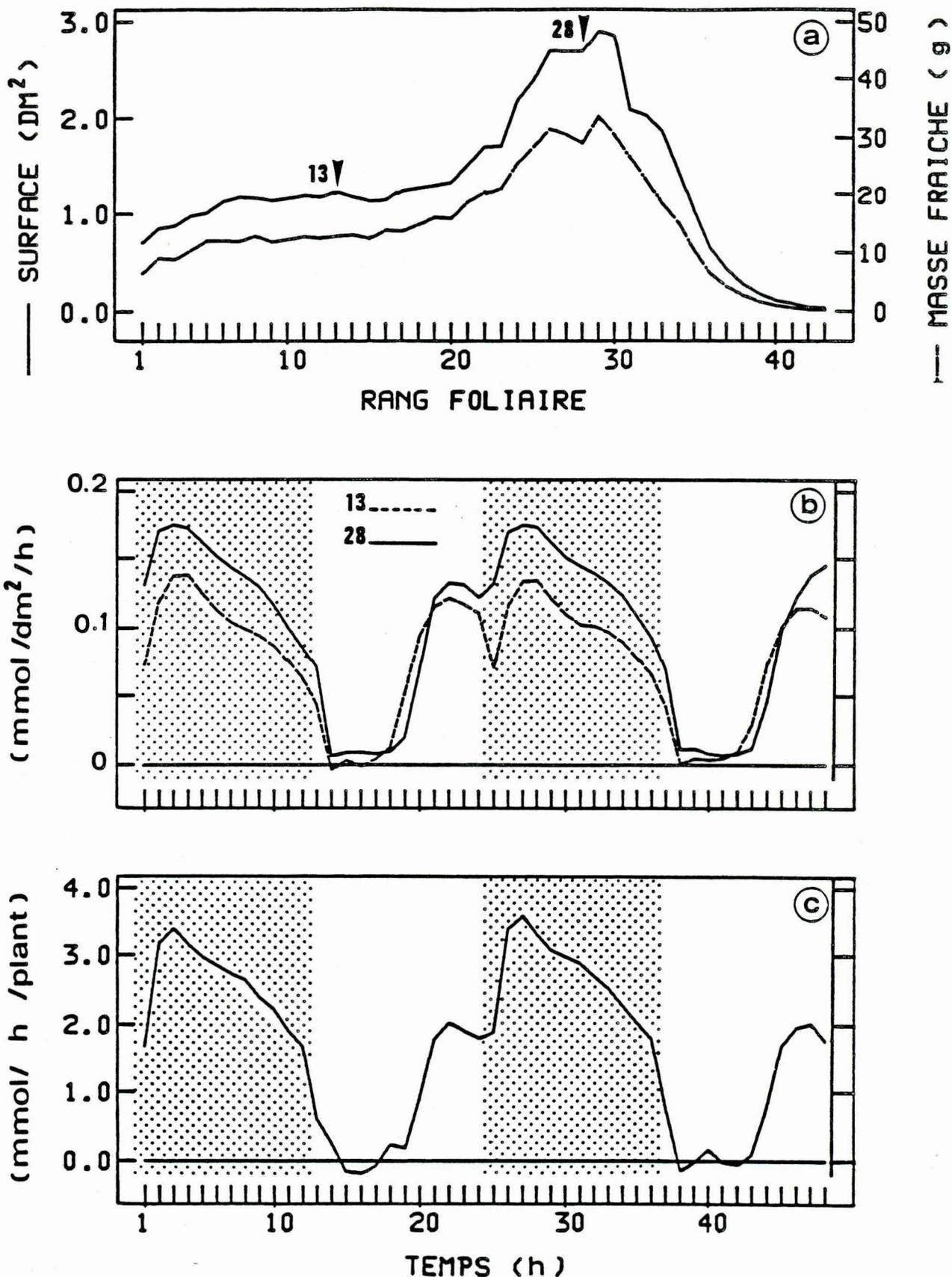


Figure 9 : Comparaison des échanges nets de CO_2 mesurés simultanément sur un plant d'ananas issu de rejet et sur deux de ses feuilles.

Fig. 9a : Masse de matière fraîche et surface des différents rangs foliaires (masse totale 630 g ; surface 55 dm^{-2}). Les flèches indiquent les rangs foliaires sur lesquels les échanges gazeux ont été déterminés.

Fig. 9b : Echanges nets de CO_2 des feuilles de rang 13 et 28 (feuille D)

Fig. 9c : Echanges nets de CO_2 des parties aériennes du plant.

c) Comparaison du rythme de fixation de CO₂ par des feuilles attachées et par le plant entier

Les différents rangs foliaires du plant d'ananas pourraient selon leur âge présenter des rythmes de fixation de CO₂ différents comme c'est le cas chez certaines plantes CAM (Lerman et al., 1974 ; Jones, 1975 ; Nishida, 1978 ; Amagasa, 1982 ; Brulfert et al., 1982). Pour apporter un élément de réponse à cette hypothèse, des déterminations d'échanges gazeux ont été simultanément réalisées sur feuille et plant entier (fig. 9). Les rangs foliaires 28 et 13 ont été retenus pour cette étude. La feuille 28 appartenait aux groupes de feuilles les plus jeunes ayant achevé leur croissance (correspondant à la feuille de référence type "D", Py et al. (1984)). La feuille n° 13 avait, elle, achevé son développement depuis 3 mois au moment des mesures.

Le principal résultat apporté par ce test est la similitude qualitative de rythme de fixation qui existe entre les deux rangs foliaires d'une part et entre ces feuilles et l'ensemble des parties aériennes du plant d'autre part. Le pourcentage de CO₂ fixé pendant la nuit est cependant un peu plus important pour l'ensemble des parties aériennes (77 % de la fixation totale contre 66 % et 71 % pour les feuilles 13 et 28 respectivement). D'un point de vue quantitatif notons que la fixation de CO₂, exprimée par unité de surface foliaire, est plus élevée dans les expériences sur feuilles que dans la détermination réalisée sur l'ensemble des parties aériennes. Hormis la possibilité de capacités photosynthétiques réduites pour les très "jeunes" ou très "vieilles" feuilles non étudiées, sur plante entière, la respiration des parties non chlorophylliennes (principalement tiges et bases des feuilles qui représentent, dans l'exemple de la figure 9, 17 % de la masse fraîche totale des parties aériennes) contribue probablement à sous-estimer la fixation de CO₂ par les tissus chlorophylliens.

	Référence figure	Bilan des échanges de CO ₂ (mmol/12 h)		Contribution des différentes phases du métabolisme CAM au bilan total de fixation de CO ₂ (%)			
		Nuit	Jour	phase I	phase II	phase III	phase IV
1	fig. 7	33,6	10,7	76,5	2,2	(-0,8)	22,9
2	fig. 8a	48,3	13,2	77,8	1,5	(-0,9)	20,7
3	fig. 8a	74,7	17	81,6	1,8	(-0,3)	17
4	fig. 8b	153,7	0	95,4	2	(-4,6)	2,6

Tableau III : Fixation nette de CO₂ pendant la phase nocturne et diurne chez différents lots d'ananas issus de rejets ; pourcentage de fixation respectif au cours des différentes phases du rythme circadien.

Les résultats présentés sont les moyennes sur une photopériode des échanges gazeux des figures 7 et 8 ; la fixation de CO₂ au cours des phases I, II et IV est comptée égale à 100 % ; la valeur indiquée pour la phase III est celle d'un dégagement de CO₂ exprimé en pourcentage de cette fixation totale.

- 1 : 1 ananas repiquage + 8 mois. Lot "Côte d'Ivoire"
- 2 : 3 ananas repiquage + 5 mois. Lot "Côte d'Ivoire"
- 3 : 3 ananas repiquage + 6 mois. Lot "Côte d'Ivoire"
- 4 : 4 ananas repiquage + 8 mois. Lot "Montpellier"

d) Discussion

- Intensité du métabolisme CAM. Les différentes mesures réalisées montrent que l'essentiel du CO₂ est fixé par le métabolisme CAM chez l'ananas issu de rejets. Les travaux de Connely (1972) sont en désaccord avec ce résultat. Cependant, la plupart des autres déterminations de photosynthèse réalisées en conditions contrôlées avec une thermopériode de 30° C jour/15 à 25° C nuit indiquent, comme nous l'avons observé, que la fixation de CO₂ est principalement nocturne chez l'ananas (Nose et al., 1977 ; Sale et Neales, 1980 ; Neales et al., 1980 ; Bartholomew, 1982 ; Nose et al., 1986). L'extrapolation stricte de ce résultat aux conditions naturelles doit être prudente : une culture en conditions contrôlées n'est qu'une image simplifiée de la diversité et complexité des conditions de plein champ. Cependant, la forte induction CAM observée dans cette étude s'exprime indépendamment des principaux facteurs externes connus pour la favoriser (déficit hydrique et thermopériode journalière élevée associée à des températures nocturnes basses). Il est donc probable que le rythme de fixation de CO₂ soit, en station agronomique, voisin de celui déterminé en C₂3A. L'intensité élevée du métabolisme CAM de l'ananas semble d'abord dépendre de facteurs génétiques avant d'être influencée par les conditions du milieu. Des arguments appuyant cette hypothèse seront apportés dans l'étude de la fixation de CO₂ par des plants d'ananas issus de culture in vitro.
- Comparaison du rythme de fixation de CO₂ entre le plant et deux de ses rangs foliaires. La feuille D, souvent utilisée au champ comme "marqueur" de la croissance de l'ananas (Py et al., 1984), présente un rythme de fixation de CO₂ comparable à celui de l'ensemble des parties aériennes du plant. Ce résultat peut probablement être étendu à un ensemble important de rangs

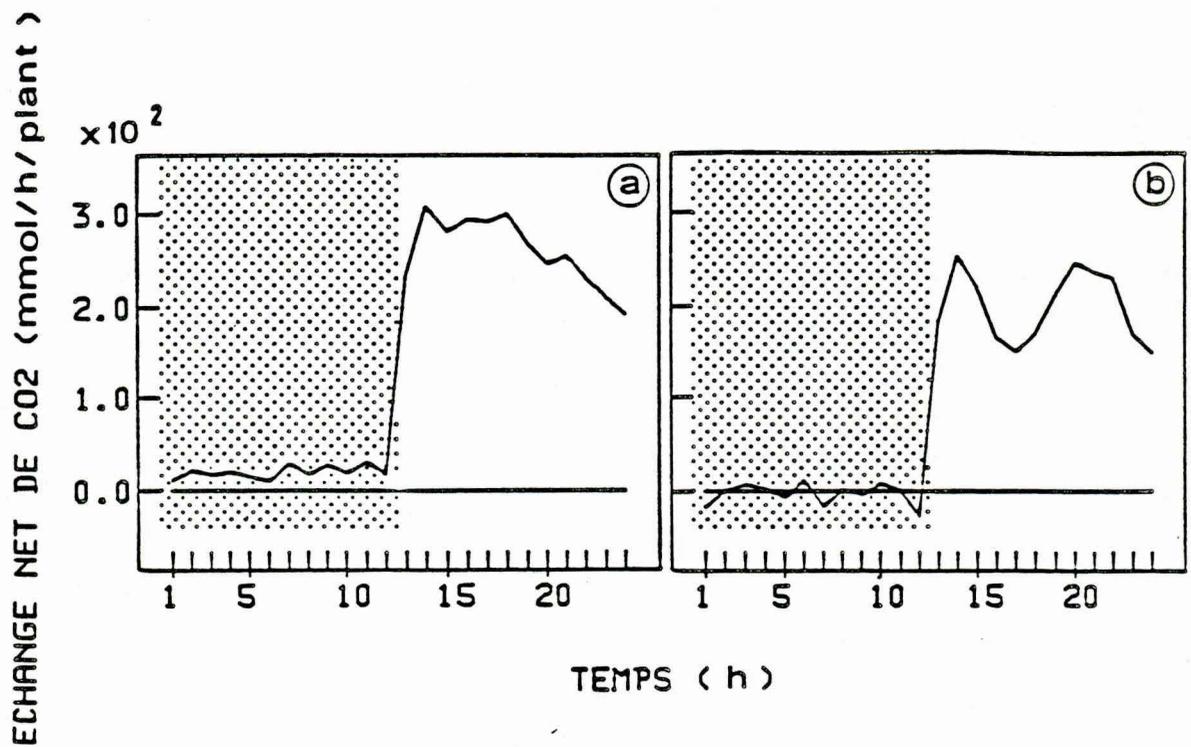


Figure 10 : Echanges nets de CO₂ d'un ananas issu de culture in vitro de masse de matière fraîche totale = 2,5g.

Fig. 10a : 1er jour de mesure

Fig. 10b : 4e jour de mesure

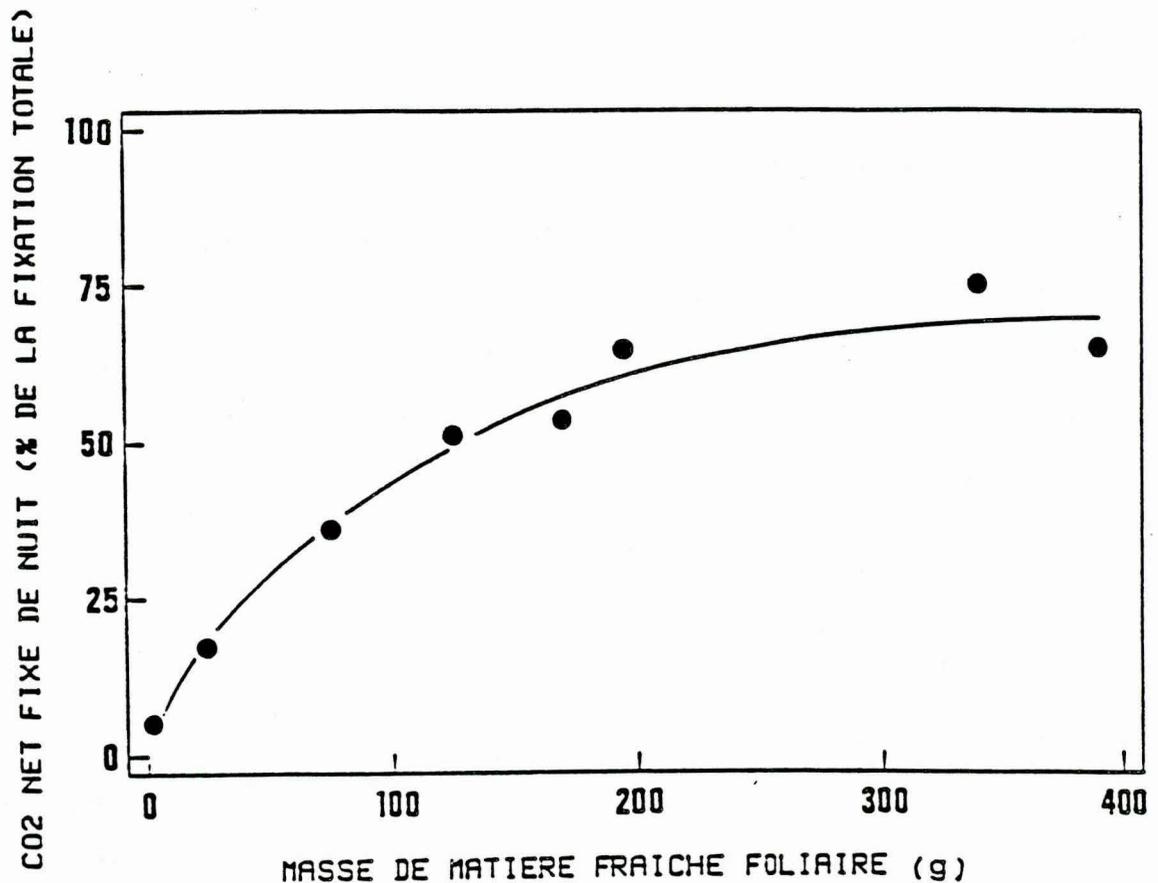


Figure 12 : Evolution de l'intensité du métabolisme CAM (pourcentage de fixation nette nocturne de CO₂) en fonction du stade de développement (masse foliaire fraîche) de plants d'ananas issus de culture in vitro.

foliaires compte tenu de la similitude de rythme de fixation entre la feuille "D" et une feuille ayant terminé son développement depuis 3 mois. Notons que les échanges diurnes de CO_2 par ces 2 rangs foliaires, en phase avec ceux de l'ensemble des parties aériennes, excluent qu'un rythme de photosynthèse moins induit en CAM, présent chez les plus jeunes feuilles par exemple, joue un rôle important dans le bilan de fixation de CO_2 .

II.I.2 - Ananas issus de culture in vitro

a) Rythme de fixation du CO_2 en fonction du stade de développement du plant

Les jeunes plants d'ananas de quelques grammes présentent une fixation de CO_2 de type C_3 essentiellement diurne (fig. 10a). Les 4 phases typiques du métabolisme CAM s'individualisent ensuite progressivement avec développement du plant (fig. 11), et la fixation nocturne de CO_2 représente un pourcentage croissant dans le bilan journalier de carboxylation. La courbe figurant cette évolution est d'allure hyperbolique (fig. 12), elle tend vers une asymptote proche de 75-80 %. Une valeur de 70 % est atteinte pour une masse de matière fraîche foliaire de 300 à 400 g (soit 7 à 8 mois après repiquage de la jeune plantule en chambre de culture).

Si l'évolution de la photosynthèse du jeune vitroplant vers un type de fixation comparable à celui de plants issus de rejets s'effectue progressivement en quelques mois dans des conditions "standard" de développement, l'expérience suivante indique qu'elle pourrait être accélérée par les conditions du milieu. Sur de très jeunes vitroplants au moment du repiquage, la fixation de CO_2 est comme nous venons de le voir de type C_3 . En prolongeant l'expérimentation pendant plusieurs jours, on observe un creusement caractéristique de la courbe de fixation diurne de CO_2 qui tend ainsi à s'indivi-

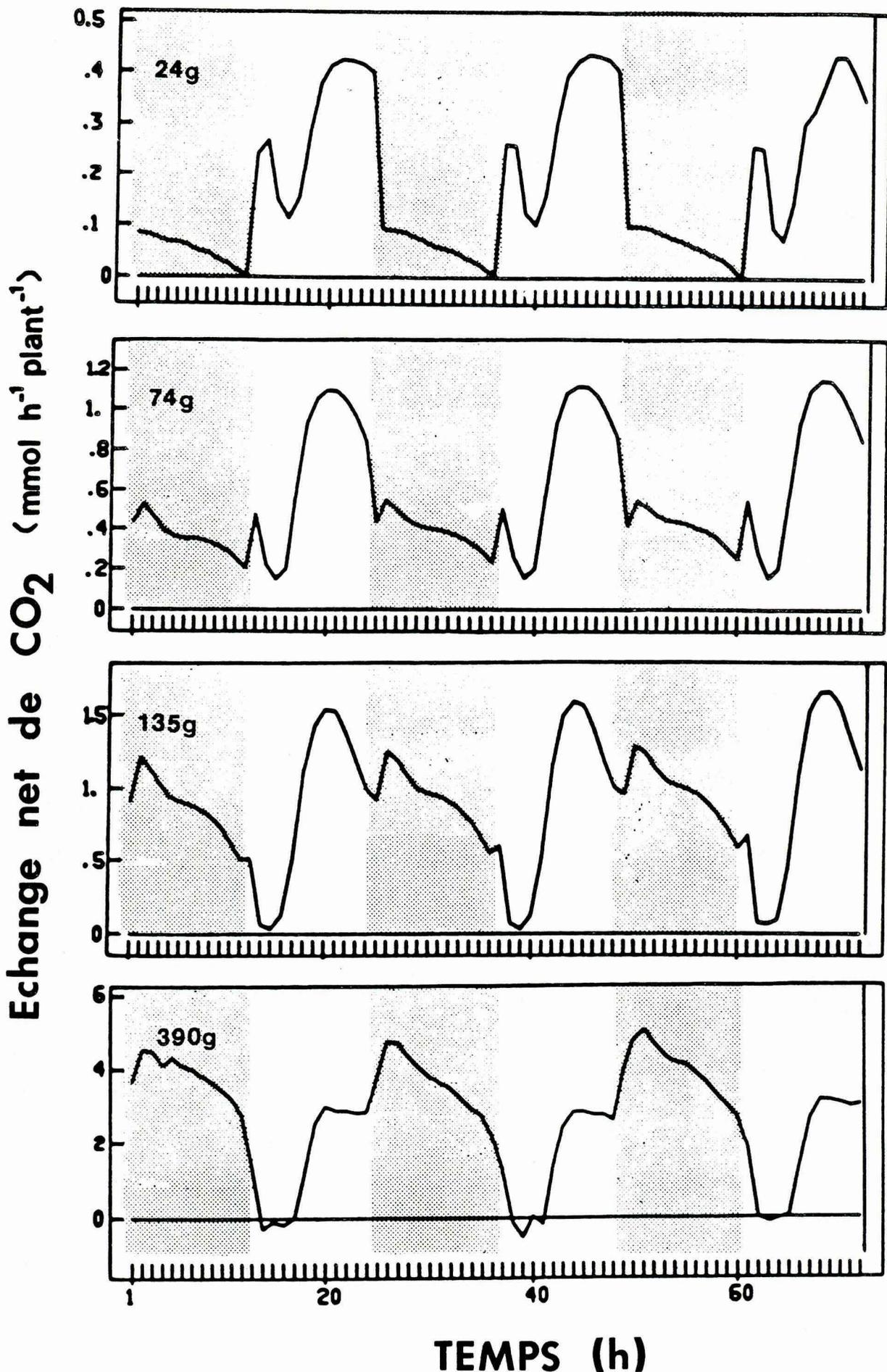


Figure 11 : Echanges nets de CO₂ de plants d'ananas issus de culture in vitro, à différents stades de développement.

La masse de matière fraîche foliaire des différents plants est indiquée en haut de chaque figure.

dualiser suivant les 3 phases caractéristiques du rythme CAM (fig. 10b). Un tel creusement est typique d'une décarboxylation de malate conduisant à une moindre fixation de CO₂ externe (voir chapitre III). L'origine la plus évidente de cette évolution est la limitation hydrique induite par le dessèchement du coton inhibé de solution nutritive qui entoure pendant l'expérience le système racinaire de la plantule. Notons qu'au cours de ces déterminations, nous n'avons pas observé de fixation nocturne de CO₂ (fig. 10b). Cette dernière observation n'est cependant pas incompatible avec une accumulation nocturne de malate si la PEP-case fixe du CO₂ d'origine respiratoire.

b) Discussion

Sans que leur développement soit en apparence limité par un quelconque facteur, les ananas issus de culture in vitro présentent une photosynthèse qui évolue avec l'âge du plant d'un type de fixation proche de la voie C₃ vers un métabolisme acide crassulacéen comparable à celui des plants issus de rejets. Chez différentes espèces de plantes CAM, une situation analogue existe : les feuilles les plus jeunes présentent un métabolisme CAM d'intensité moins élevée que celui des feuilles âgées (Lerman et al., 1974 ; Jones, 1975 ; Nishida, 1978 ; Amagasa, 1982 ; Brulfert et al., 1982). Il est probable, comme l'a proposé Jones (1975), que l'augmentation de la taille des vacuoles avec l'âge de la feuille favorise, en accroissant les possibilités de stockage de malate, l'expression du métabolisme CAM. Rappelons qu'au cours du développement des ananas issus de culture in vitro nous avons observé une augmentation de la succulence (fig. 3), du nombre et de la taille des cellules du mésophylle (photo 4) qui indiquent que les capacités de stockage d'acides organiques évoluent parallèlement à l'augmentation de la fixation nocturne de CO₂. Cependant, cette augmentation n'est peut-être pas le déterminisme premier de l'apparition du CAM puisque l'induction (ou l'amorce de l'induction) de ce métabolisme semble possible en quelques jours chez des plantules de quelques grammes.

Cette potentialité de l'ananas est à rapprocher de l'évolution rapide de la photosynthèse de Mesembryanthemum crystallinum du type C₃ vers le type CAM lorsqu'il est transféré d'une solution nutritive standard à une solution contenant NaCl à une concentration de 100 mM et plus (Winter et Von Willert, 1972 ; Winter et Lüttge, 1976). La compréhension précise de ce passage n'est pas encore acquise (pour revue voir Winter, 1985). Il est cependant établi que d'une part le déterminisme essentiel de ce changement est le "stress hydrique physiologique" induit par la salinité et d'autre part qu'il est accompagné d'une augmentation de l'activité de différentes enzymes impliquées dans le métabolisme CAM, y compris une synthèse de novo de certaines de ces protéines. La localisation de "l'effet" du déficit hydrique et les premières étapes des modifications biochimiques qu'il impose n'ont pas été établies avec certitude. L'étude des points communs entre l'évolution de la photosynthèse du type C₃ vers le type photosynthétique CAM en quelques mois chez le vitroplant d'ananas et les potentialités d'expression de ce métabolisme en quelques jours chez ce même végétal subissant un stress peut être un moyen de faire avancer ce problème.

Le type de fixation de CO₂ chez de jeunes ananas issus de graines, de jeunes feuilles ou des rejets portés par la plante mère, n'a pas à notre connaissance été étudié. Le facteur "âge" étant, comme le montre l'étude sur les vitroplants, déterminant dans l'apparition du métabolisme acide crassulacéen, il est probable que ces 3 types de matériel végétal présentent à leur premier stade de développement une photosynthèse plus proche du type C₃ que CAM.

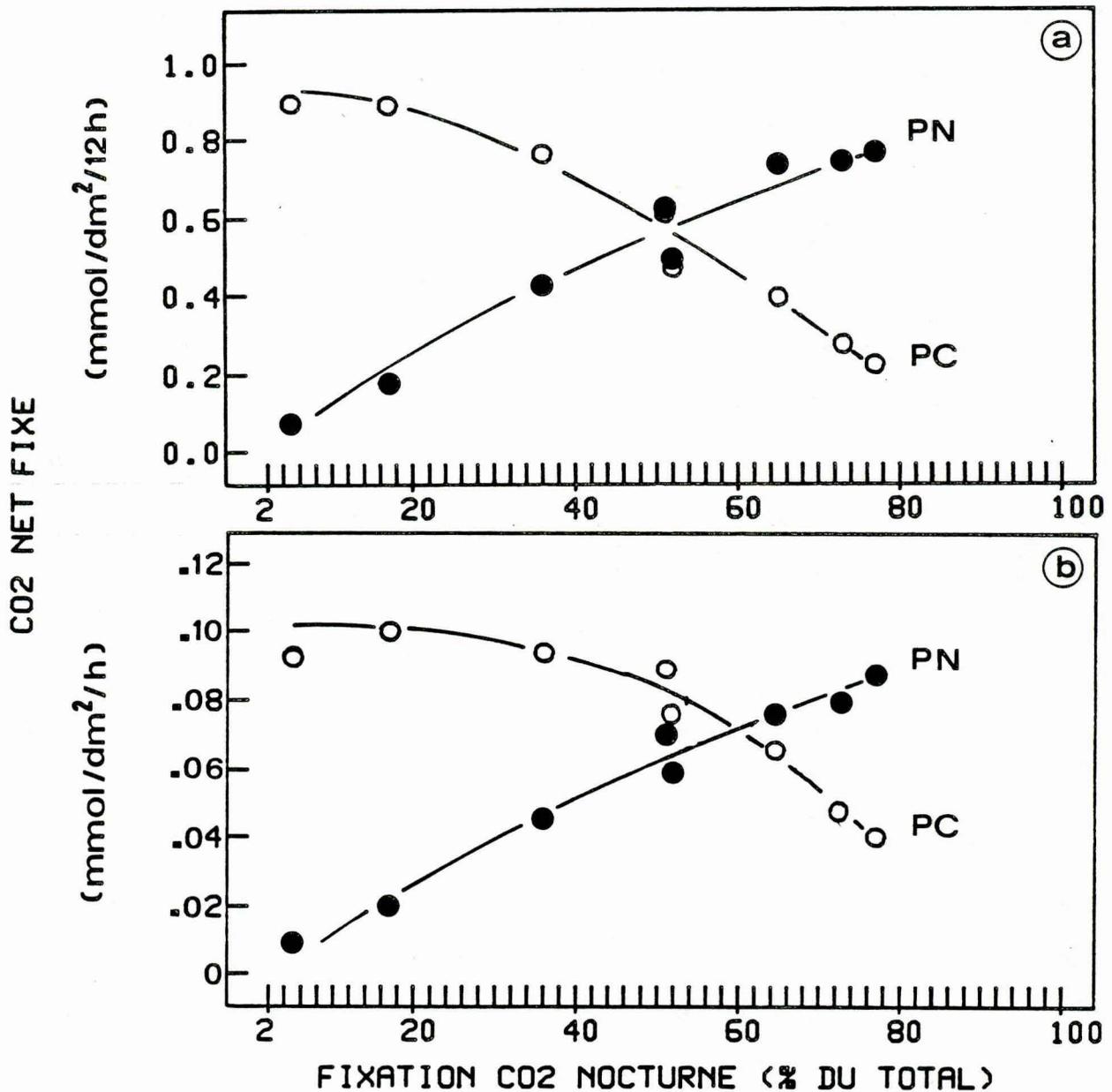


Figure 13 : Vitesse, par unité de surface foliaire, de la fixation nette de CO₂ en fonction de l'intensité du métabolisme CAM chez des ananas issus de culture *in vitro*. (l'intensité du métabolisme CAM est corrélée avec le développement du plant, voir figure 12).

Fig. 13a : Vitesse moyenne au cours des 12 heures de la phase diurne (○) et nocturne (●).

Fig. 13b : Vitesse horaire maximum atteinte au cours de la phase diurne (○) et nocturne (●).

II.II - Capacité photosynthétique et efficacité de l'eau de l'ananas

II.II.1 - Evolution des capacités photosynthétiques en fonction de l'intensité du métabolisme CAM chez des ananas issus de culture in vitro

a) Résultats

Dans le paragraphe précédent nous avons décrit l'évolution qualitative du rythme des échanges nets de CO₂ en fonction du développement du vitroplant d'ananas. Dans cette partie nous préciserons cette évolution en exprimant, par unité de surface foliaire, les variations de vitesse de fixation de CO₂.

Cette normalisation par la surface permettra d'évaluer les modifications des capacités photosynthétiques au cours de la croissance, indépendamment de l'augmentation de la taille du plant. Dans cette représentation, la croissance sera caractérisée par l'intensité du métabolisme CAM (défini par le pourcentage de CO₂ fixé la nuit par rapport au CO₂ total fixé, figure 12).

L'évolution des vitesses moyennes de fixation de CO₂ (calculées sur les 12 heures de jour ou de nuit) et celle des vitesses horaires maximales en fonction de l'intensité du métabolisme CAM sont représentées sur la figure 13. Au cours du développement, par unité de surface foliaire, l'augmentation de fixation nocturne est accompagnée d'une diminution de la fixation diurne (fig. 13a). Cette diminution est attribuable au raccourcissement des phases de fixation II et IV, décrit précédemment (fig. 11), mais également à une moindre capacité de fixation de CO₂ (exprimée par surface foliaire) au cours de la phase IV (fig. 13b).

b) Discussion

. Augmentation des capacités de fixation nocturne de CO₂. L'augmentation des capacités de fixation nocturne de CO₂ avec le développement du plant

a été évoquée précédemment. Rappelons qu'elle suppose à la fois une augmentation de l'activité des différentes enzymes impliquées dans le métabolisme crassulacéen et des capacités de stockage de malate. Précisons dès maintenant que l'augmentation des capacités nocturnes de fixation nette de CO₂ observée est représentative de l'augmentation des capacités brutes de fixation (voir le chapitre III, la fixation brute de CO₂ est la somme de la fixation nette de CO₂ et du dégagement de CO₂ respiratoire).

- Diminution des capacités de fixation diurne de CO₂. Il est probable qu'une augmentation de la résistance à la diffusion gazeuse explique en partie la diminution des vitesses de photosynthèse pendant la phase IV au cours du développement des ananas. Des arguments supportant cette hypothèse seront apportés dans le chapitre III lors de la comparaison des échanges gazeux nets d'O₂ et CO₂. La diminution des capacités de fixation diurne de CO₂ peut avoir une seconde origine : l'activité et la quantité de RUBISCO par unité de surface foliaire pourrait diminuer au cours du développement du plant. A l'appui de cette hypothèse, Winter et al. (1982) ont déterminé que la RUBISCO représentait 30 % des protéines solubles des jeunes feuilles de Kalanchoe pinnata et seulement 17 % de celles des feuilles plus âgées. Ces auteurs ont émis l'hypothèse que le mécanisme de concentration de CO₂ que constitue le métabolisme CAM pendant la phase III permettait, comme c'est le cas chez les plantes C₄, un moindre investissement d'azote dans la RUBISCO. Nous pensons que, plus qu'une conséquence du métabolisme CAM, une moindre quantité et activité de la RUBISCO est sans doute une des causes de l'économie de l'eau que permet le métabolisme CAM : la concentration intracellulaire de CO₂ s'élève au cours de la phase III lorsque les capacités de décarboxylation du malate dépassent celles de la refixation dans le cycle photosynthétique du CO₂ libéré. Cette élévation de la concentration

Espèce	CO ₂ net fixé par jour (mmol dm ⁻² . 24h ⁻¹)	Matériel végétal (*)	Pourcentage de fixation nocturne	Eclairement (μmolm ⁻² s ⁻¹)	Température jour/nuit (°C)	Référence
Ananas comosus	0,8 - 1,2	vitroplant	variable	650 - 700	28/22	voir fig.13
	1,9 - 2,4	F	60 - 70	300 - 400	"	voir fig. 9
	^{3,4} (dm ⁻² de sol)	C	> 95	650	26/22	voir fig.14

(a)

Ananas comosus	0,9	P	73	700	30/25	1
	0,9	F	91	500	30/22	2
	1,4	F	89	330	30/15	3
	^{2,3} (dm ⁻² de sol)	C	100	700	30/15	4
Ferocactus acanthodes	1	P	97	600	25/15	5
Agave deserti	2,5	P	79	600	25/15	5
Kalanchoe pinnata	2,6 - 2,9	F	44	800	20/20	6
Kalanchoe blossfeldiana	3,1	P	54	650	26/14	7

(b)

Tableau IV : Capacités photosynthétiques de l'ananas comparées à celles d'autres plantes à métabolisme CAM.

a : valeurs obtenues au cours de l'étude

b : valeurs rapportées dans la littérature

(*) : F, feuille ; P, plant ; C, culture de plusieurs plants

Références : 1 Nose et al. (1986)

2 Bartholomew (1982)

3 Neales et al. (1980)

4 Sale et Neales (1980)

5 Nobel et Hartzock (1986)

6 Winter (1985)

7 Thomas et al. (1987)

est la cause principale de l'augmentation de résistance stomatique pendant cette période (Cockburn et al., 1979 ; Jewer et al., 1985). En conséquence, une diminution de la rapidité des capacités de fixation du CO₂ par la RUBISCO devrait augmenter la durée de la phase III pendant laquelle la transpiration est réduite. Notons enfin qu'il n'est pas exclu qu'au cours du développement des phénomènes indépendants du métabolisme CAM contribuent à la diminution des capacités de fixation diurne de CO₂ (vieillessement des tissus, auto-ombrage des feuilles par exemple).

En valeur absolue, les vitesses maximales de photosynthèse par des vitroplants d'ananas, de l'ordre de 0,1 mmol/dm²/h (fig. 13b) sont faibles comparées aux valeurs moyennes de 0,3 à 0,9 mmol/dm²/h rapportées pour les plantes C₃ (Black, 1973). Pour cette raison, le terme de photosynthèse de type C₃ pendant la phase IV (ou pour les très jeunes plants) doit être employé avec nuance. Pour une intensité de métabolisme CAM voisine, les vitesses de fixation nocturne et diurne de CO₂ par les parties aériennes de vitroplant sont près de deux fois inférieures à celles observées sur feuilles attachées d'ananas issus de rejets. Cette différence illustre à nouveau la difficulté de comparer quantitativement les échanges gazeux déterminés sur feuille et plante entière.

II.II.2 - Capacités photosynthétiques de l'ananas

Comparaison avec d'autres plantes CAM. Les vitesses moyennes de fixation journalière de CO₂ d'ananas cultivés en C₂₃A ne se distinguent pas fondamentalement de celles rapportées dans la littérature pour cette même plante ou pour d'autres espèces à métabolisme crassulacéen (tableau IV). Le rendement élevé de production de matière sèche de l'ananas par rapport aux autres espèces CAM, toujours cité en exemple dans les différentes revues consacrées à ce métabolisme, n'est donc pas lié à une vitesse élevée de fixation de CO₂ par unité de surface foliaire.

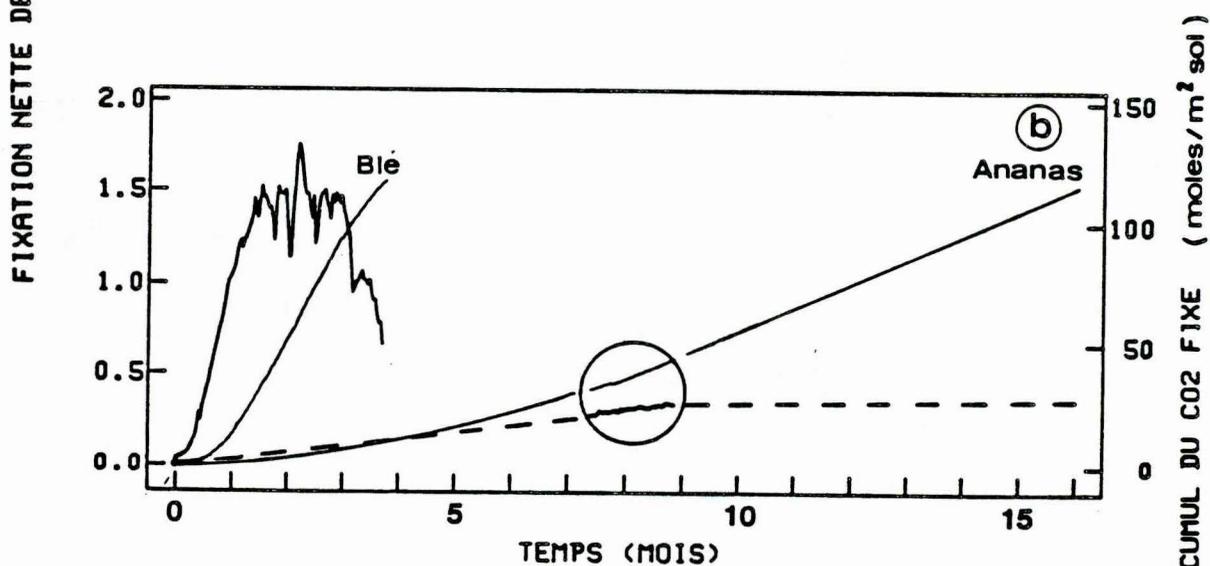
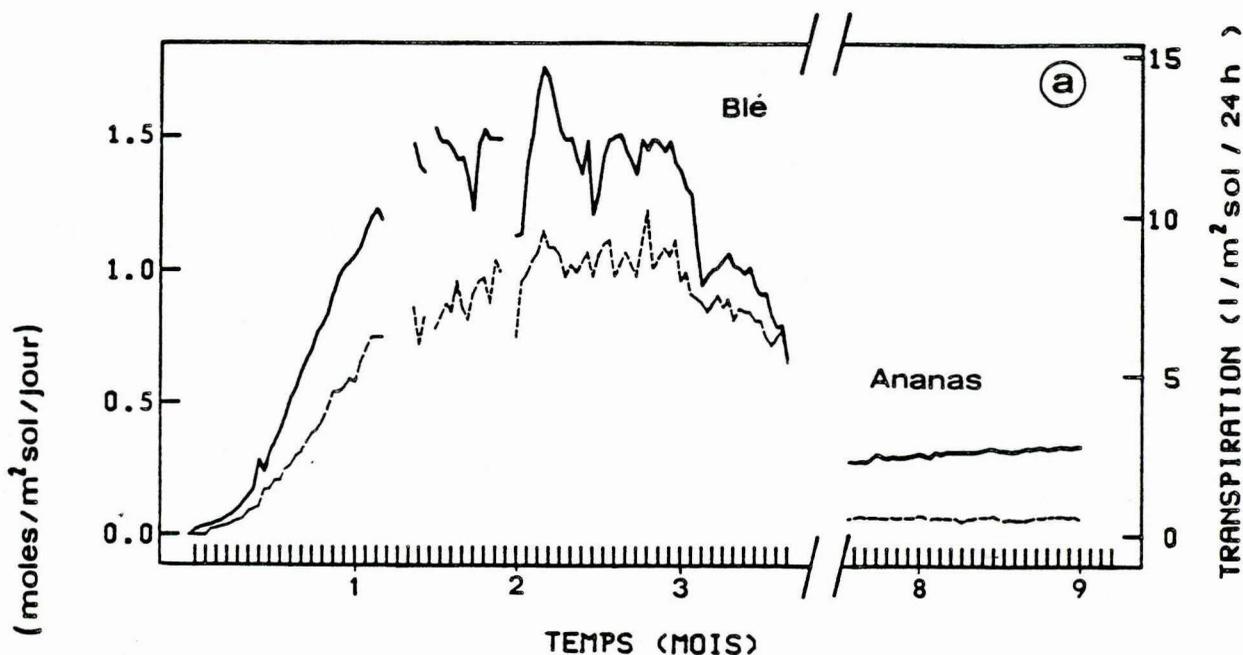


Figure 14 : Comparaison de la fixation de CO_2 et de la transpiration d'un couvert d'ananas et d'un couvert de blé (données expérimentales blé : Gerbaud et al., 1987).

Fig. 14a : Comparaison de la fixation nette journalière de CO_2 (—) et de la transpiration (----).

Fig. 14b : Comparaison du cumul potentiel de fixation de CO_2 au terme d'un cycle de développement. (—) : fixation nette de CO_2 ; (----) extrapolation de la fixation nette de CO_2 par l'ananas (voir texte) ; (—) cumul du CO_2 fixé.

Conditions de culture Ananas : 8 plants/ m^2 ; indice foliaire > 4 ; photopériode de 12 h jour/12 h, $650 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$; T° jour/nuit : $26^\circ 5/22^\circ$.
Blé : 80 plants/ m^2 ; indice foliaire maximum ≈ 10 ; photopériode 14 h jour/10 h, $850 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$; T° jour/nuit : $24^\circ/18^\circ$.

Comparaison des capacités photosynthétiques d'un couvert d'ananas et de celles d'un couvert de blé. La figure 14a compare les capacités photosynthétiques d'un couvert d'ananas 7,5 à 9 mois après repiquage de rejets avec celles d'un couvert végétal C₃-type, le blé, au cours d'un cycle de développement complet en C₂3A (Gerbaud et al., 1987). La fixation de CO₂ représentée (exprimée en moles/m² de sol occupé/24 h) est celle du bilan circadien net des échanges des parties aériennes (photosynthèse-respiration nocturne pour le blé ; fixation nocturne et diurne de CO₂ pour l'ananas).

La culture de blé au maximum de ses capacités fixe 4 à 5 fois plus de CO₂ que celle d'ananas 8 à 9 mois après repiquage des rejets. Si cet écart est important observé à l'échelle du mois, il ne rend cependant que partiellement compte des potentialités photosynthétiques de l'ananas sur l'ensemble de son cycle de développement (s'étendant en moyenne pendant 16 mois de la plantation à la récolte (Py et al., 1984)). A titre d'exemple Lacoeuilhe (1976a) rapporte un rendement de 41 tonnes de matière sèche par hectare au cours d'un cycle de développement complet d'ananas en Côte d'Ivoire (pour les parties aériennes de 51 500 plants/ha, pendant 16 mois). Bartholomew (1977) indique le chiffre comparable de 62 t/ha sur une période de 656 jours à Hawaï. Par comparaison, Loomis et Gerakis (1975) citent des chiffres de 18,3 à 29 t/ha/an pour une culture de blé et de 67,3 t/ha/an pour une culture de canne à sucre. Acevedo et al. (1983) pour la plante CAM Opuntia ficus indica cultivée en station agronomique ont déterminé un rendement de 13 t/ha/an pour une plantation âgée de 5 ans. Si l'ananas est une plante, performante parmi les espèces CAM, capable d'égaliser en rendement annuel de matière sèche certaines cultures C₃, il le doit, outre à des techniques culturales élaborées, à ses capacités de maintenir des tissus chlorophylliens actifs sur de longues périodes et à son port permettant l'imbrication de plants en culture dense. Pour illustrer les potentialités photosynthétiques de l'ananas, nous avons estimé, à partir des mesures présentées en figure 14a, la quantité totale

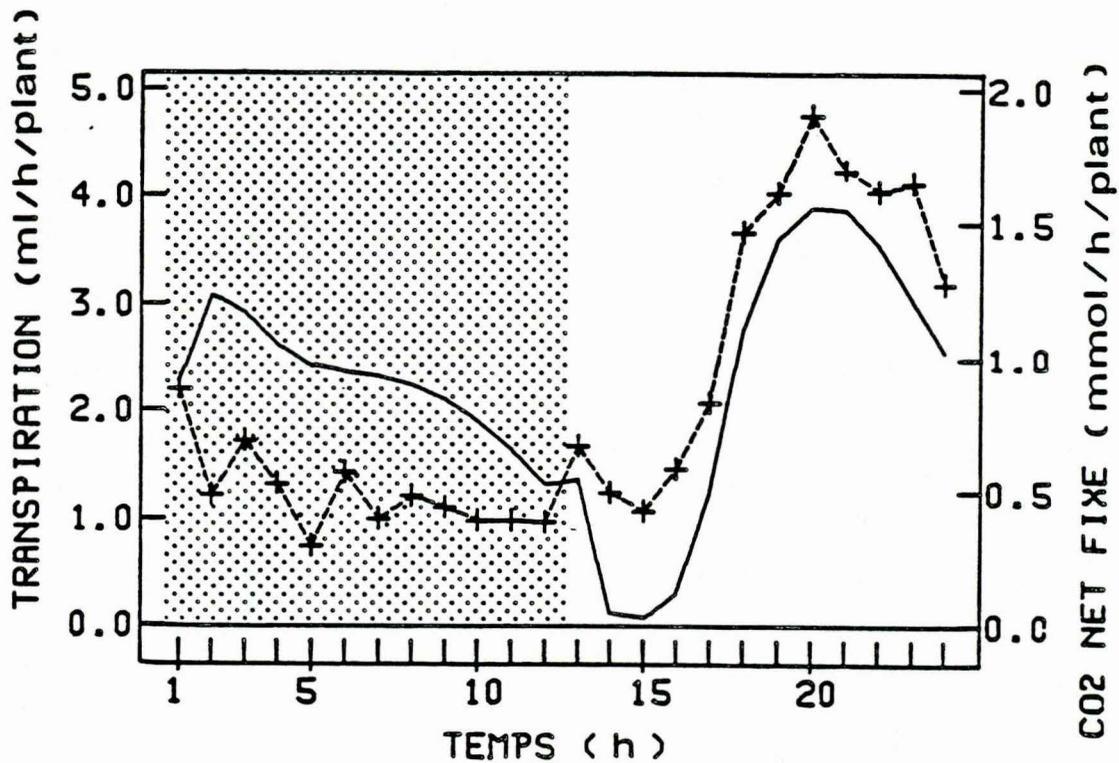


Figure 15 : Transpiration et fixation nette de CO₂ par un ananas issu de culture in vitro au cours d'une photopériode. (Moyenne de 3 jours consécutifs)
 (-+-) : transpiration ; (—) : fixation nette de CO₂

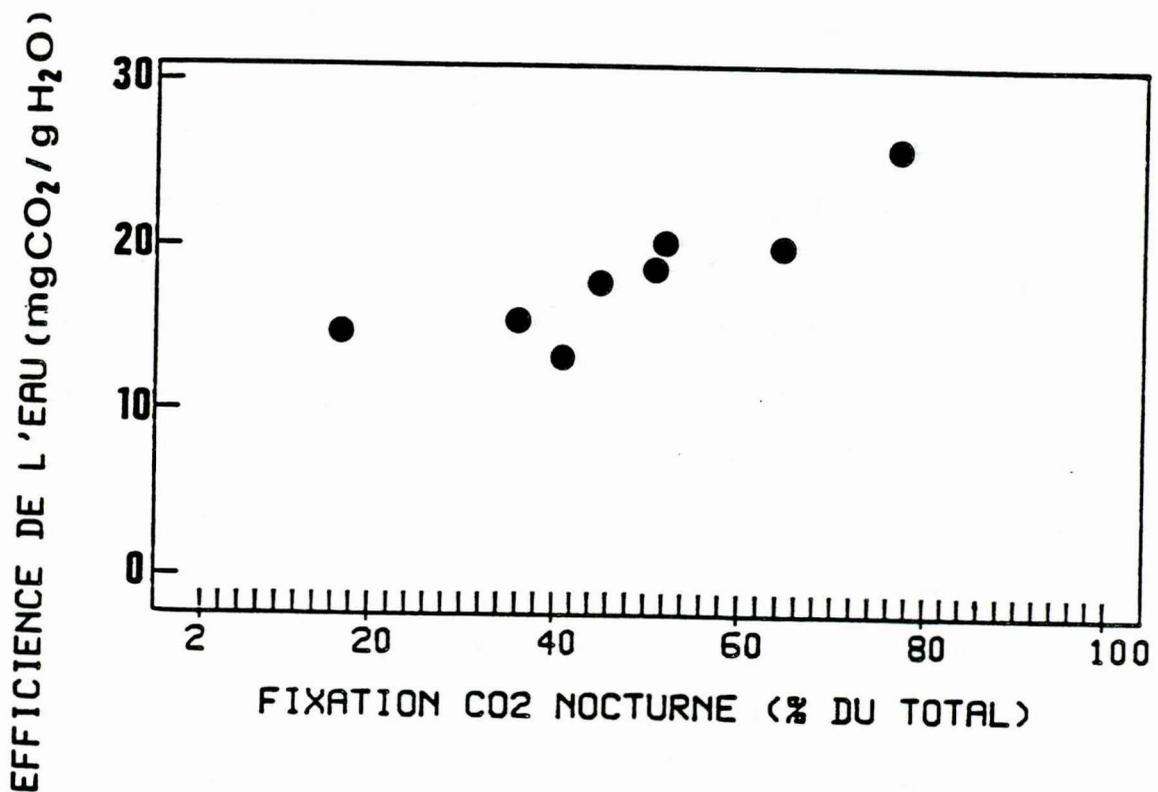


Figure 16 : Efficacité de l'eau journalière (mg de CO₂ fixé par g d'eau transpirée) en fonction de l'intensité du métabolisme CAM chez des ananas issus de culture in vitro.

de CO₂ que pourrait fixer cette plante dans les conditions de culture de notre étude. Ce calcul a été réalisé en faisant les 2 extrapolations suivantes : a) de 0 à 7,5 mois après repiquage, nous avons assimilé l'évolution de la photosynthèse en fonction du temps à une droite. b) de 9 à 16 mois, les valeurs de photosynthèse ont été considérées constantes (au-delà d'un indice foliaire supérieur à 3, une courbe de photosynthèse atteint rapidement un plateau de saturation). Les résultats de cette estimation rapide font apparaître que la quantité de CO₂ accumulée par le couvert d'ananas au bout de 16 mois serait sensiblement égale à celle de la culture de blé en 4 mois (fig. 14b). La quantité de CO₂ accumulée, de l'ordre de 115 moles/m² de sol occupé/16 mois, permet d'estimer la production potentielle de matière sèche à 31 t/ha environ (en supposant que le pourcentage de carbone dans la matière sèche est chez l'ananas voisin de 45 % comme dans la plupart des plantes (Heller, 1977)).

II.II.3 - Transpiration et efficacité de l'eau de l'ananas

a) Rythme de transpiration et efficacité de l'eau de vitroplant d'ananas

L'évolution des valeurs horaires de transpiration d'un vitroplant d'ananas (130 g de masse de matière fraîche) au cours d'une photopériode présente un rythme comparable à celui de la fixation nette de CO₂ (fig. 15). Cette observation était prévisible compte tenu que le rythme bien connu de résistance stomatique à la diffusion gazeuse des plantes CAM est en phase avec celui des échanges nets de CO₂ (Kluge et Ting, 1978 ; Osmond, 1978 ; Winter, 1985). D'un point de vue quantitatif, l'efficacité de l'eau moyenne (mg de CO₂ fixé par g d'eau transpirée) correspondant à la figure 15 est de 33,8 pendant la période nocturne, 11 pendant la phase diurne et de 18,6 sur l'ensemble de la photopériode. L'explication la plus évidente de l'efficacité de l'eau élevée pendant la phase I est liée à la moindre demande évaporatrice intervenant pendant cette période. Notons qu'en accord avec cette observation, l'efficacité de l'eau (rapport journalier P/T = fixation de CO₂/transpiration) augmente avec l'induction du métabolisme CAM chez les vitroplants (fig. 16).

L'étude du rapport P/T pendant la phase diurne conduit à deux principales observations : a) au cours de la phase IV, l'efficacité de l'eau atteint des valeurs élevées comparées à celles des plantes C₃ (14,8 mg CO₂/g H₂O en moyenne des 6 dernières heures de la phase diurne (fig. 15) contre 5 mg/g H₂O, valeur maximum rapportée pour différentes plantes C₃ (Bierhuizen, 1976)). Cette observation confirme, comme l'indiquait déjà de faibles capacités photosynthétiques, que la fixation diurne de CO₂ pendant la phase IV n'est pas directement identifiable à une fixation C₃ typique de plante mésophytique. b) l'efficacité de l'eau est minimale pendant la phase III (P/T = 5 mg CO₂/g H₂O en moyenne des heures 14 à 16). Compte-tenu que la résistance à la diffusion gazeuse atteint ses valeurs maximales pendant cette période, une telle observation peut paraître surprenante. Cependant, elle s'explique aisément si l'on précise que le rapport P/T est équivalent à :

$$\frac{P}{T} = \frac{\Delta CO_2}{1,6 \cdot \Delta W}$$

("Matériel et méthode", équations 5 et 6) et que le gradient de CO₂ entre l'atmosphère et la feuille (ΔCO_2) diminue de façon caractéristique chez les plantes CAM pendant la phase III (Cockburn et al., 1979).

b) Bilan de transpiration d'un couvert d'ananas issus de rejets, comparaison avec celui d'une culture de blé

La comparaison de la transpiration de couverts d'ananas et de blé (Gerbaud et al., 1987) placés dans des conditions climatiques respectives proches de celles du champ est présentée sur la figure 14a. L'efficacité de l'eau correspondante est pour l'ananas de 24,5 mg CO₂/g H₂O (moyenne de 44 jours). Celle du blé entre le deuxième et troisième mois de culture est 3,3 fois moindre. Le rapport journalier du volume de transpiration blé/ananas pendant ces périodes atteint la valeur de 16. Ces résultats illustrent l'économie

de l'eau réalisable par l'ananas grâce au métabolisme CAM (précisons cependant que les valeurs déterminées traduisent les potentialités de transpiration de cultures "hors sol" : au champ l'évaporation de l'eau du sol réduirait l'écart d'efficacité de l'eau entre les 2 types métaboliques). A titre de comparaison avec ces différents résultats obtenus en C₂3A, notons que Szarek et Ting (1975) rapportent une efficacité de l'eau pour différentes plantes CAM comprise entre 1,6 et 40 mg CO₂/g H₂O ; Bierhuizen (1976) indique pour différentes plantes C₃ des valeurs de 1,2 à 5 mg CO₂/g H₂O.

II.III - Conclusion

L'ananas issu de rejet placé dans des conditions de développement comparables à celles du champ fixe près de 80 % du CO₂ pendant la période nocturne. Les capacités de fixation de CO₂ de cette plante ne se distinguent pas à priori de celles rapportées dans la littérature pour d'autres espèces CAM. A l'échelle d'un couvert végétal, l'ananas fixe 4 à 5 fois moins de CO₂ qu'une culture C₃ type (blé) mais présente une efficacité de l'eau plus de 3 fois supérieure.

Au cours du développement de jeunes plants d'ananas issus de culture in vitro, la photosynthèse évolue progressivement en quelques mois d'une fixation essentiellement diurne (à capacités photosynthétiques faibles par rapport à celles des plantes C₃) vers un métabolisme CAM comparable à celui d'ananas issus de rejets. Durant cette évolution, par unité de surface foliaire, l'augmentation des capacités de fixation nocturne de CO₂ est accompagnée par une diminution des capacités de fixation diurne. Les potentialités d'expression d'un métabolisme proche du type CAM sous l'effet d'une limitation hydrique pourraient être présentes dès les plus jeunes stades de développement du vitroplant.

Pour atteindre quantitativement un métabolisme CAM comparable à celui de plants issus de rejets, 6 à 8 mois de développement sont nécessaires aux ananas issus de culture in vitro. Qualitativement cependant, le métabolisme CAM est présent mais avec une intensité limitée dès les premiers mois de culture. Dans les expérimentations de type agronomique, l'utilisation de vitroplant comme modèle de plante adulte devra tenir compte de ces deux observations.

L'étude par les échanges gazeux de CO_2 est une première approche synthétique de l'évolution de la photosynthèse chez des vitroplants d'ananas au cours de leur développement. Les questions que posent ces travaux (origine précise et déterminisme de l'évolution des capacités de fixation nocturne et diurne avec l'âge, possibilité d'induction rapide du métabolisme CAM sous l'effet de facteurs externes) devront être abordées à l'échelle de l'analyse biochimique. L'apparition progressive du métabolisme CAM au cours de la croissance des plants d'ananas issus de culture in vitro, l'évaluation possible de l'intensité de ce métabolisme par la simple détermination de la masse de matière fraîche du plant, font de ce végétal un matériel de choix pour faire progresser les connaissances de ce type photosynthétique.

CHAPITRE III

ECHANGES NETS D'O₂ PAR L'ANANAS, CARACTERISATION DE L'ASSIMILATION DE CO₂ PENDANT LES DIFFERENTES PHASES DU METABOLISME CAM

Dans le métabolisme crassulacéen, l'assimilation totale de CO₂ (le terme d'assimilation désignant l'incorporation de CO₂ dans le cycle photosynthétique via la Rubisco) est égale à l'assimilation de CO₂ "externe" fixé pendant la phase diurne et du CO₂ "interne" libéré par la décarboxylation du malate synthétisé pendant la nuit précédente. Les caractéristiques de ce dernier flux (rythme précis et amplitude) sont encore peu connues. La comparaison des échanges nets d'O₂ et CO₂ doit permettre de les préciser : l'assimilation de CO₂ par la RUBISCO étant associée à un dégagement équivalent d'oxygène (Kaplan et Björkman, 1980), chez une plante à métabolisme CAM, la différence entre ce dégagement et la fixation nette diurne de CO₂ doit être égale en première approximation à la quantité de CO₂ "interne" assimilé. Partant de cette considération, nous avons simultanément déterminé chez l'ananas les échanges nets d'O₂ et CO₂ pour discriminer et caractériser l'assimilation de CO₂ "interne" et "externe" pendant les différentes phases diurnes du métabolisme CAM.

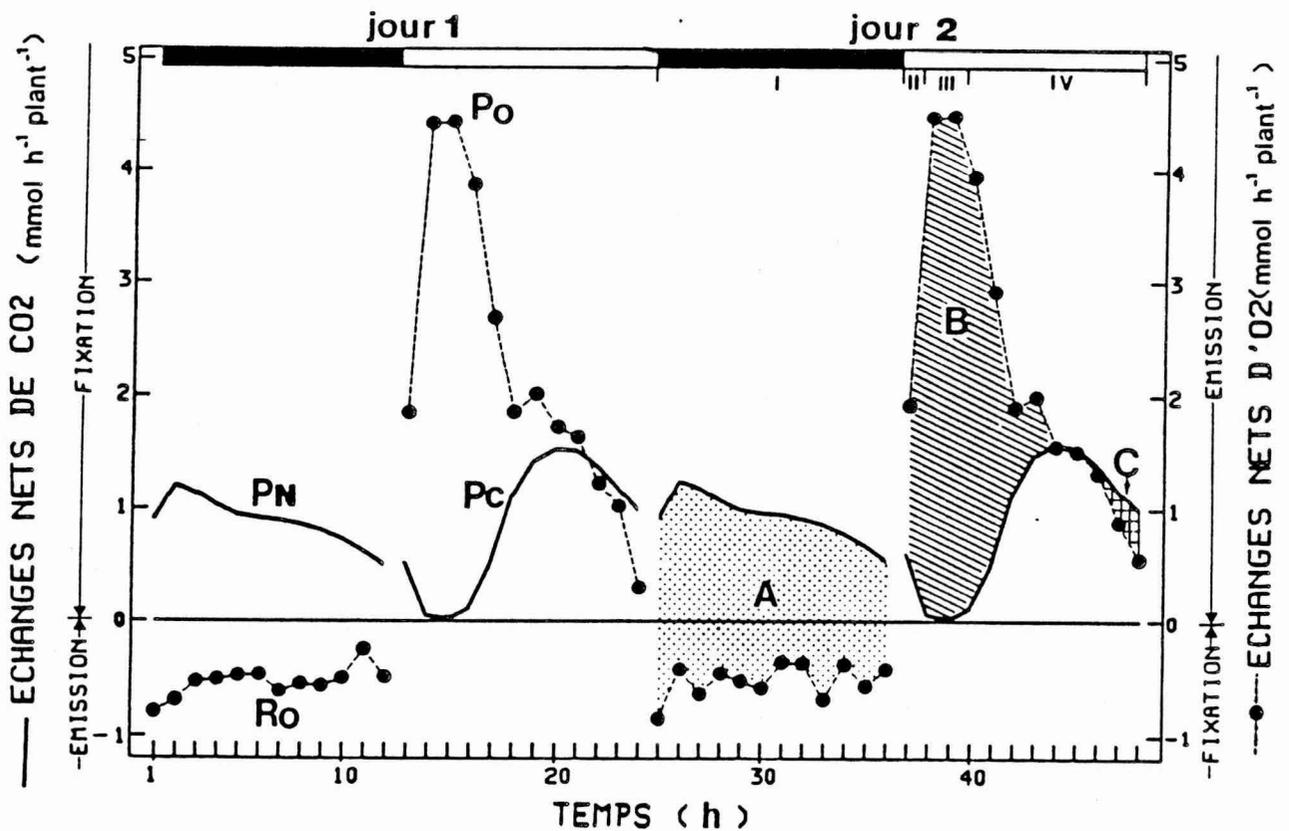


Figure 17 : Echanges nets d'O₂ et CO₂ par un vitroplant d'ananas au cours de deux jours consécutifs. PN, fixation nocturne de CO₂ ; PC, fixation diurne de CO₂ ; RO, fixation nocturne d'oxygène ; PO, émission photosynthétique d'oxygène. Sur le jour 2, les surfaces ombrées représentent : A, la fixation brute nocturne de CO₂ (A = PN + |RO|) ; B, l'émission nette d'oxygène liée à l'assimilation dans le PCR du CO₂ libéré par la décarboxylation du malate (B = PO-PC lorsque PO>PC) ; C, une fraction de CO₂ fixé et non réduit dans le PCR à la fin de la phase diurne (C = PC-PO lorsque PC>PO). Les périodes nocturnes sont délimitées par les surcharges noires. Les chiffres romains sur le jour 2 indiquent les 4 phases caractéristiques du cycle CAM. Les échanges sont ceux des parties aériennes du plant (masse de matière fraîche et surface foliaire : 134g et 17,5 dm², respectivement).

La mesure des faibles variations de la concentration d'oxygène produites par une plante CAM dans une chambre de mesure contenant 20,6 % de ce gaz est la principale difficulté méthodologique qui s'est posée lors de ces expériences. Pour minimiser ce problème, nous avons utilisé prioritairement comme matériel végétal des ananas issus de culture in vitro. Ces plants permettent en effet d'atteindre grâce à leur encombrement réduit un rapport (volume d'échanges gazeux)/(volume de la chambre de mesure) très supérieur à celui des plants issus de rejets ; la précision des mesures de concentration d'oxygène est ainsi améliorée. Nous décrirons principalement dans ce chapitre, le modèle typique des échanges nets d'O₂ par un vitroplant présentant un métabolisme CAM mixte (50 % de fixation nocturne de CO₂, fig. 17).

III.I - Echanges nets d'oxygène pendant la phase nocturne

III.I.1 - Amplitude des échanges, calcul de la fixation brute de CO₂ pendant la phase nocturne

Amplitude. Au cours de la nuit, la respiration (R_O) des parties aériennes du plant est relativement constante. Dans l'exemple présenté sur la figure 17, la vitesse de fixation d'O₂ est de l'ordre de 0,36 mmol/dm²/12 h. Des valeurs comparables ont été déterminées pour différentes intensités de métabolisme CAM (fig. 18).

. Evaluation de la fixation brute de CO₂ pendant la phase nocturne. Dans le système expérimental clos utilisé, nous déterminons la quantité de CO₂ nécessaire à la compensation de la fixation nette de la plante. De nuit, le CO₂ libéré par la respiration (à l'intérieur de la feuille ou dans la chambre de mesure) est nécessairement refixé par la PEP-Case. Il doit donc

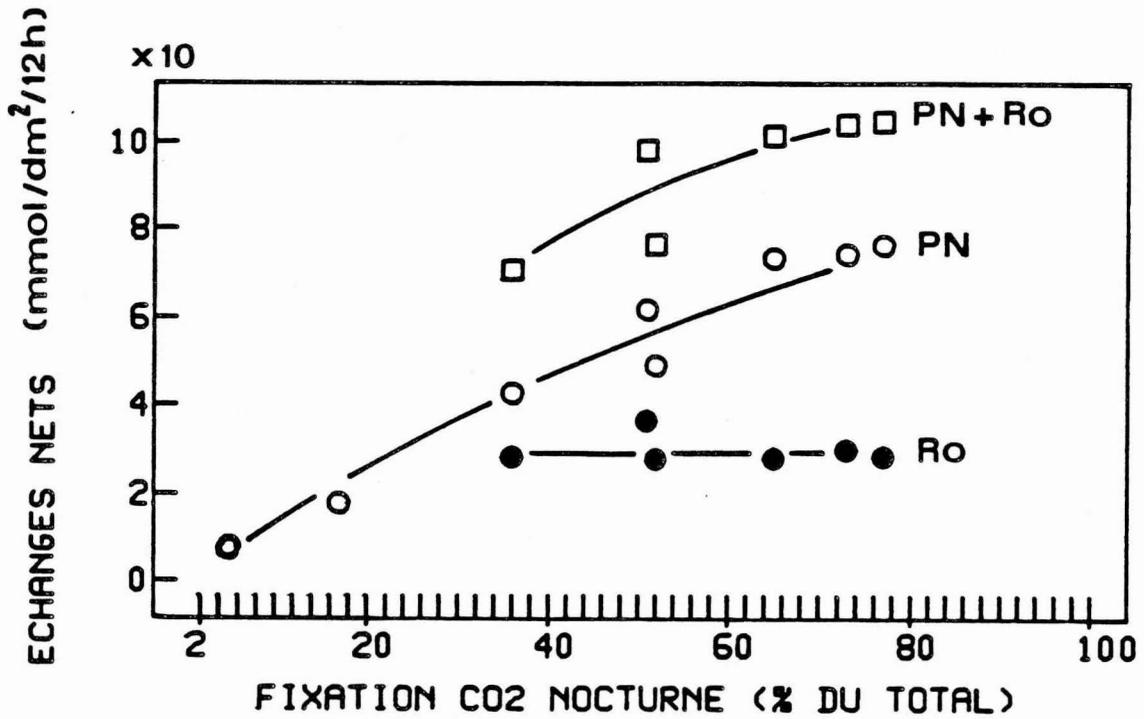


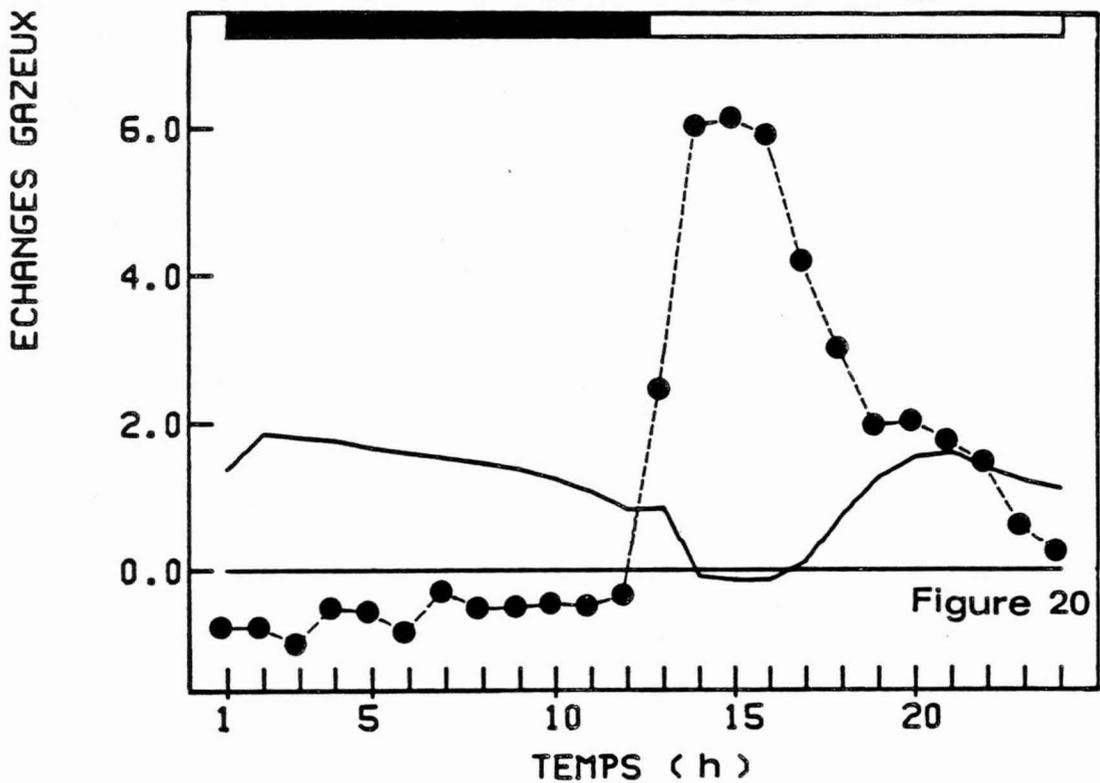
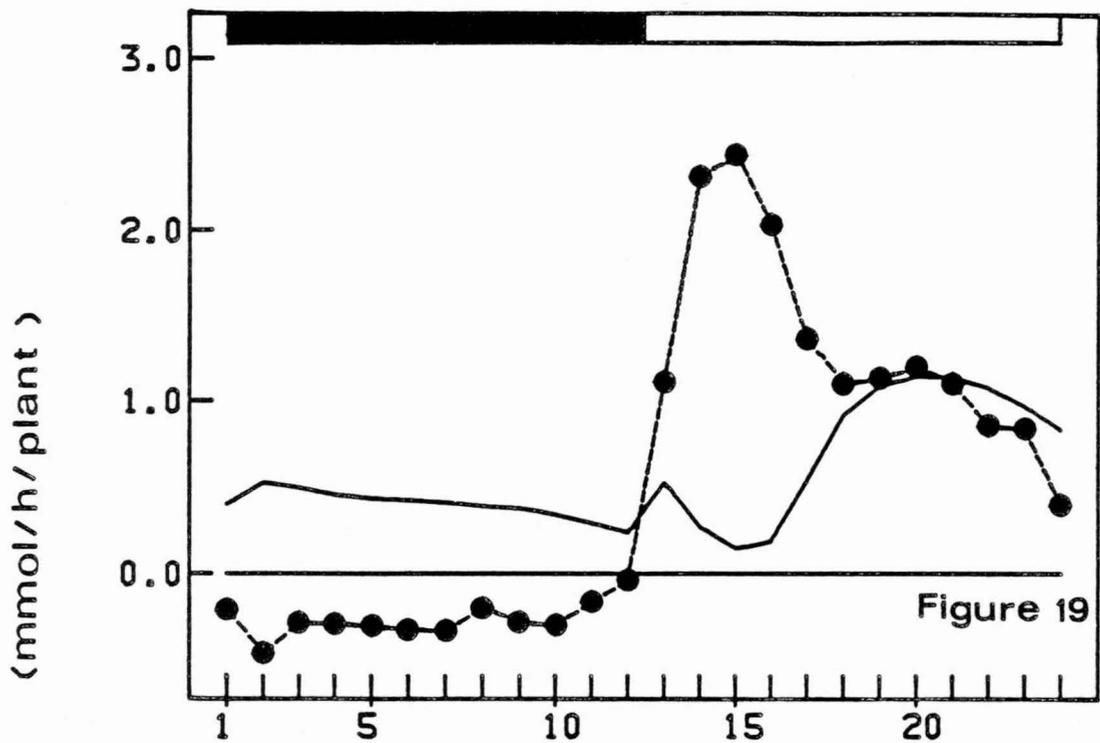
Figure 18 : Evolution des fixations nocturnes nettes d'O₂ et CO₂ par des vitroplants d'ananas en fonction de l'intensité du métabolisme CAM.

(●) fixation d'oxygène, R_O ; (○) fixation de CO₂, P_N.

être ajouté à PN pour calculer la fixation brute de CO₂. En considérant que le quotient respiratoire de RO est voisin de 1, la somme PN + |RO| est équivalente à la quantité de CO₂ total "interne" disponible pour la photosynthèse de la phase diurne suivante. Cette fixation brute que nous symbolisons par "A" est figurée en pointillé sur la figure 17. Dans cet exemple, RO représente près de 37 % de la fixation brute. Kaplan (1976b) a montré que ce pourcentage variait de façon importante chez Kalanchoe daigremontiana en fonction de la température (de 22 % à plus de 70 % pour une température augmentant de 14°C à 24°C). Chez les vitroplants d'ananas, ce pourcentage augmente en fonction de l'intensité du métabolisme CAM (fig. 19, 20) : au cours de la croissance, la respiration exprimée par unité de surface foliaire est relativement stable alors que la fixation nette de CO₂ augmente, (fig. 18). Précisons que si une partie du malate synthétisé était, pendant la même nuit, catabolisé dans le cycle des acides tricarboxyliques, l'accumulation finale de cet acide organique serait toujours calculable par la somme PN + |RO|. Dans cette hypothèse en effet l'oxydation complète d'une mole de malate produirait 4 moles de CO₂ et 6 moles d'équivalent réducteur. La refixation du CO₂ libéré conduirait à la synthèse de 4 moles de malate. Le bilan de l'oxydation complète serait donc la formation "nette" de 3 moles de malate accompagnée de la fixation de 3 moles d'oxygène lors de l'oxydation des 6 équivalents réducteurs produits.

III.II - Echanges nets d'O₂ pendant la phase diurne

Avant d'exposer les résultats de ce paragraphe, nous rappellerons, concernant les bilans nets d'émission d'oxygène, quelques considérations sur lesquelles s'appuieront l'interprétation des résultats.



Figures 19 et 20 : Échanges nets d'O₂ et CO₂ par les parties aériennes de vitroplants d'ananas. (---●---) : échanges nets d'O₂ ; (—) : échanges nets de CO₂.

Fig. 19 : Plant de masse de matière fraîche 74g, surface foliaire 11,6 dm².
 Fig. 20 : Plant de masse de matière fraîche 225g, surface foliaire 24 dm².

- . Les réactions de la phase claire de la photosynthèse conduisent lors de la photooxydation de l'eau à la production d'une mole d'oxygène pour 2 moles de NADPH.
- . Le pouvoir réducteur produit à partir de la photooxydation de l'eau ne peut pas être stocké sous forme de cofacteur, il y a "conservation" de ce pouvoir réducteur dans les différentes réactions d'oxydo-réduction. En schématisant, il sera consommé dans des réactions impliquant une fixation d'oxygène (respiration, photorespiration) ou dans des réactions non associées à une fixation d'oxygène (assimilation de CO_2 , réduction des sulfates et nitrates...).
- . Les réactions fixant de l'oxygène conduisent, au bilan, à une consommation d' O_2 et de pouvoir réducteur, phénomène globalement inverse de la production par photooxydation de l'eau. En conséquence, l'émission nette d'une mole d'oxygène atteste que 2 moles de pouvoir réducteur produites par la photolyse sont utilisées dans des voies biochimiques non associées à une fixation d' O_2 . La réciproque de cette considération est également vérifiée.

La réduction de CO_2 dans le cycle de Calvin est quantitativement la principale voie biochimique d'utilisation de pouvoir réducteur non associée à une prise d'oxygène et chaque mole de CO_2 est incorporée dans le cycle photosynthétique avec un "coût" de 2 moles de NADPH. Le quotient photosynthétique ($\text{QP} = \text{O}_2 \text{ net émis} / \text{CO}_2 \text{ net fixé}$) tendra donc vers 1. Cette dernière règle sera bien sûr modifiée si une mole de CO_2 est fixée avec l'oxydation de moins de deux moles de pouvoir réducteur.

Echanges cumulés de CO ₂ et O ₂ (mmol/12h/plant)						
	LUMIERE		OBSCURITE		QP	$\frac{B}{A + C}$
	$\Sigma(PN)$	$\Sigma(RO)$	$\Sigma(PC)$	$\Sigma(PO)$		
JOUR 1	10,58	-6,44	10,42	27,09	0,99	0,97
JOUR 2	11,13	-6,29	10,68	27,52	0,98	0,96

Tableau V : Echanges nets cumulés de CO₂ et O₂ par les parties aériennes d'un vitroplant d'ananas. Les valeurs sont celles des échanges gazeux représentés en figure 17. Le quotient photosynthétique QP est calculé par le rapport $(PO)/(PN + |RO| + PC)$. Le rapport B/A + C est le quotient photosynthétique lié au métabolisme du malate (A, B et C définis comme en figure 17).

III.II.1 - Calcul des quotients photosynthétiques journaliers et horaires

a) Quotient photosynthétique journalier

Chez des plantes de type C₃ ou C₄, la liaison quantitative est immédiate entre émission d'oxygène et fixation de CO₂ (Gerbaud et André, 1979 ; Calvin et al., 1980 ; Furbank et Badger, 1982). Pour une plante à métabolisme CAM, compte tenu de la séparation temporelle entre la fixation nocturne de CO₂ et son assimilation dans le cycle photosynthétique le jour suivant, le quotient photosynthétique journalier (global) peut être calculé par le rapport (O₂ net émis)/(fixation brute nocturne de CO₂ + fixation nette diurne de CO₂). En accord avec les règles précédemment décrites, il est voisin de 1 chez l'ananas (tableau V), vérifiant ainsi qu'à l'échelle de 24 heures, l'ensemble du CO₂ fixé par la plante est réduit au potentiel d'oxydoréduction des carbo-hydrates. Dans l'exemple de la figure 17, le QP est pratiquement égal à 1. Pour d'autres déterminations, ses valeurs sont de façon générale comprises entre 0,9 et 1,1.

b) Quotient photosynthétique horaire

L'émission nette d'oxygène présente un maximum pendant la phase III puis décroît progressivement jusqu'à la fin de la phase IV témoignant de variations importantes des vitesses d'assimilation totale de CO₂ tout au long du jour (fig. 17, 19, 20). Par référence à la valeur des quotients photosynthétiques horaires, cette assimilation peut être divisée en 3 phases caractéristiques (fig. 17) :

- . Pendant la première partie du jour, le quotient photosynthétique est supérieur à 1. L'émission nette d'oxygène plus élevée que la fixation nette de CO₂ est l'indice de l'assimilation du CO₂ "interne" fixé pendant la

nuit précédente. La présence d'un QP supérieur à 1 pendant la phase de décarboxylation du malate a été observée sur différents types de matériel végétal présentant un métabolisme CAM (Brünnhofer et al., 1968 ; Denius et Homman, 1972 ; Marcelle, 1975 ; Spalding et Edwards, 1978 ; André et al., 1979 ; Thomas et André, 1987 ; Thomas et al., 1987).

- . Vers le milieu de la phase IV, le quotient photosynthétique est voisin de 1 pendant 1 à 2 heures (parfois moins). Cette période correspond donc en apparence à une fixation de CO₂ de type C₃ utilisant exclusivement du CO₂ "externe".
- . Les deux à trois dernières heures de la phase IV sont caractérisées par un quotient photosynthétique inférieur à 1. Cette observation indique, qu'en moyenne, la fixation d'une mole de CO₂ nécessite pendant cette période l'oxydation de moins de deux moles de pouvoir réducteur. En d'autres termes, la valeur inférieure à 1 du QP indique que le CO₂ fixé pendant la fin de la phase IV n'est pas assimilé en totalité dans le cycle de Calvin. Nous préciserons, dans ce qui suit, les caractéristiques de ces 3 phases d'assimilation.

III.II.2 - Assimilation de CO₂ lorsque les valeurs des quotients photosynthétiques horaires sont supérieures à 1

- . Résultats. L'assimilation de CO₂ "interne" identifiée à la valeur PO-PC est symbolisée par la lettre B et figurée en hachuré sur les échanges gazeux présentés en figure 17. Cette assimilation débute dès la phase II, atteint ses valeurs maximums pendant la phase III et le tout début de la phase IV, puis décroît rapidement pour s'achever vers le milieu de cette dernière

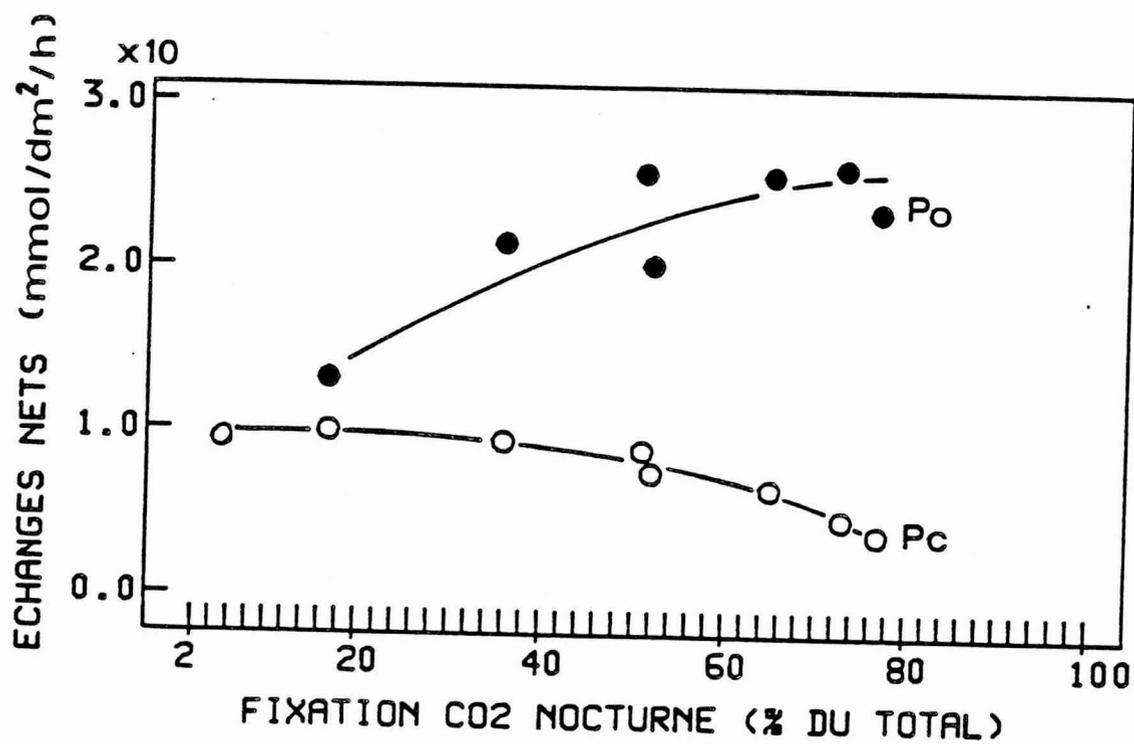


Figure 21 : Evolution des amplitudes horaires maximums d'émission nette d'O₂ pendant la phase III et de fixation nette de CO₂ pendant la phase IV par des vitroplants d'ananas en fonction de l'intensité du métabolisme CAM. (●) : émission d'oxygène, PO ; (○) : fixation de CO₂, PC.

phase. Les vitesses maximales de l'assimilation du CO₂ libéré par la décarboxylation du malate sont élevées comparativement à celles de l'assimilation de CO₂ externe. Le rapport de ces deux valeurs est par exemple voisin de 2 ; 2,9 et 3,7 pour les échanges gazeux respectivement présentés en figures 19, 17 et 20. Notons que cette stimulation de l'activité du cycle de Calvin entre les phases III et IV s'accroît avec le développement du métabolisme CAM : au cours de cette évolution, la diminution de la fixation diurne nette de CO₂ précédemment décrite est associée à une augmentation des vitesses maximales d'émission nette d'O₂ pendant la phase III (fig. 21).

. Discussion.

Rythme de l'assimilation de CO₂ interne. Comme l'ont démontré depuis longtemps les nombreux dosages de malate réalisés chez les plantes CAM (pour revue voir Kluge et Ting, 1978 ; Osmond, 1978 ; Winter, 1985), l'essentiel du CO₂ "interne" est libéré pendant la première partie du jour et conduit à une période de moindre fixation de CO₂ "externe" : la phase III. Les mesures directes et en continu de l'assimilation de ce CO₂ "interne" déduites des échanges gazeux O₂ et CO₂ témoignent de l'évolution progressive du phénomène et permettent de préciser que cette réduction n'est pas achevée lorsque commence la phase IV. Des échanges gazeux de la figure 17, il est possible de calculer (par cumul des valeurs horaires PO-PC) que 60 % seulement du CO₂ total fixé pendant la nuit précédente ont été assimilés lorsque reprend la fixation de CO₂ de la phase IV. Le début de cette période ne doit donc pas être considérée chez l'ananas comme une phase de fixation de CO₂ typiquement C₃, assimilant exclusivement du CO₂ "externe".

. Amplitude de la photosynthèse et évaluation de la concentration interne de CO₂ atteinte pendant la phase III. L'origine la plus évidente de la stimulation de la photosynthèse (l'activité du cycle réductif du carbone) entre la phase III et IV est l'augmentation de la concentration intracellulaire de CO₂ qui accompagne dans le métabolisme crassulacéen l'étape de décarboxylation du malate-refixation par la RUBISCO du CO₂ libéré (Spalding et al., 1979 ; Cockburn et al., 1979 ; Kluge et al., 1981 ; Friemert et al., 1986). Cette élévation de la concentration de CO₂ interne est, rappelons-le, l'origine principale de la "fermeture" des stomates pendant la phase III (Winter, 1985). Plusieurs auteurs, par des méthodes d'analyse directe ou indirecte, ont rapporté pour différentes plantes CAM que les concentrations internes de CO₂ atteintes pendant cette période pouvaient être de l'ordre de 1 000 µl/l et parfois même dépasser 10 000 µl/l (Spalding et al., 1979 ; Cockburn et al., 1979). Les estimations suivantes indiquent que, chez l'ananas, ces valeurs élevées ne sont pas atteintes. La cinétique d'échange net de CO₂ présente souvent chez l'ananas pendant la phase III une "tangente" proche de la valeur 0 (fig. 17). Conformément à l'équation 5 décrite dans "Matériel et méthode", cette valeur témoigne que le gradient de CO₂ feuille-atmosphère est quasiment nul et donc que la concentration intracellulaire de CO₂ est en équilibre avec la concentration externe de 340 µl/l. Précisons que suivant l'intensité du métabolisme CAM, des concentrations intracellulaires de CO₂ plus ou moins élevées sont atteintes. Dans l'exemple de la figure 19, présentant les échanges gazeux d'un vitroplant fixant 36 % de CO₂ pendant la phase nocturne, la fixation de CO₂ pendant la phase III atteste que les concentrations internes sont inférieures à 340 µl/l. A l'opposé, l'efflux de CO₂ pendant la phase III chez un vitroplant fixant 65 % de CO₂ pendant la phase nocturne (fig. 20) indique que les valeurs de cette concentration dépassent celles de la concen-

tration atmosphérique. Cette élévation de pression partielle intracellulaire de CO₂ explique très probablement l'augmentation des vitesses horaires maximales de l'assimilation de CO₂ observée pendant la phase III au cours de la croissance des vitroplants (fig. 21). Précisons que bien qu'elles soient stimulées par des concentrations de CO₂ "élevées", ces vitesses de l'ordre de 0,2 à 0,3 mmol/dm²/h, atteignent tout juste les valeurs minimales rapportées pour les plantes C₃ (Black, 1973). De faibles activités et quantités de RUBISCO par unité de surface foliaire comparativement au type C₃ telles que celles déterminées par Winter (1982) pour le genre Kalanchoe sont une origine possible de cette observation.

. Evaluation de la concentration interne d'oxygène atteinte pendant la phase III. Comme pour le CO₂, l'existence pendant la phase III de concentrations internes d'oxygène élevées représentant jusqu'à plus de 30 % de l'atmosphère de la cavité sous-stomatique a été rapportée pour différentes plantes CAM (Spalding et al., 1979). Ces valeurs exceptionnellement élevées ne sont pas atteintes chez l'ananas comme l'indique l'estimation suivante.

En appliquant à l'oxygène la loi de diffusion des gaz, le gradient de concentration d'O₂ (ΔO_2) entre la feuille et l'atmosphère peut être calculé par l'équation :

$$\Delta O_2 = r \times 1,4 \times P_0$$

où . r est la résistance à la diffusion de la vapeur d'eau

. 1,4 est le rapport du coefficient de diffusion relative vapeur d'eau/air et O₂/air (calculé d'après la valeur 0,9 citée par Samish (1977) pour le rapport de diffusion entre O₂/air et CO₂/air et celle de 1,6, rapport de diffusion entre vapeur d'eau/air et CO₂/air).

D'après cette équation, ΔO_2 serait dans l'exemple de la figure 17 de l'ordre de 0,5 % pendant la phase III si r atteignait pendant cette période 150 s/cm, valeur plausible de résistance stomatique à la diffusion gazeuse chez l'ananas (Aubert, 1970 ; Bartholomew et Kadzimin, 1977).

III.II.3 - Assimilation de CO_2 lorsque les valeurs des quotients photosynthétiques horaires sont proches de 1

Au cours de la phase diurne, seule la fixation de CO_2 présentant vers le milieu de la phase IV un quotient photosynthétique voisin de 1 peut être qualifiée de fixation de type C_3 "pure" assimilant exclusivement du CO_2 externe (fig. 17, 19, 20).

Une des origines de la faible vitesse de fixation de CO_2 pendant cette période peut être déduite de la cinétique des échanges nets d' O_2 . A une concentration de CO_2 externe donnée, il est courant de distinguer deux principaux facteurs limitant la vitesse de l'assimilation de CO_2 par une plante (Farquhar et al., 1980) : a) une limitation liée à la diffusion de CO_2 de l'atmosphère jusqu'au site de carboxylation (cette limitation est imposée par les résistances à la diffusion de la couche limite, des stomates et du mésophylle) ; b) une limitation liée aux capacités enzymatiques de la RUBISCO et à celles de la régénération du RUDP (cette limitation est parfois désignée sous le terme de "résistance à la carboxylation"). Farquhar et Sharkey (1982) ont proposé d'exprimer la diminution de l'assimilation potentielle de CO_2 due à la résistance à la diffusion de CO_2 (1) par l'équation suivante :

$$1 = \frac{P - P'}{P}$$

où P est la vitesse potentielle maximum d'assimilation de CO_2 qui interviendrait si la limitation de la photosynthèse par la résistance à la diffusion

était nulle, P' l'assimilation réelle observée. En considérant que lorsque les échanges nets de CO_2 sont nuls pendant la phase III, la concentration interne de CO_2 est voisine de la concentration externe, P_0 est pendant cette période une vitesse de fixation indépendante de la résistance à la diffusion gazeuse. Nous pouvons donc estimer qu'à la pression partielle de 34 pascals, l'assimilation diurne de CO_2 pendant la phase IV est chez l'ananas limitée à près de 65 % par la résistance à la diffusion du CO_2 dans l'exemple de la figure 17. Cette limitation serait voisine de 70 % pour les échanges présentés en figure 19. Précisons que cette interprétation suppose que le potentiel d'assimilation de CO_2 reste constant entre la phase III et IV. Des arguments soutenant cette hypothèse seront apportés au chapitre suivant. Par comparaison, Farquhar et Sharkey (1982) rapportent pour différentes plantes C_3 que la résistance à la diffusion du CO_2 limite de 6 à 28 % l'assimilation potentielle de CO_2 à la teneur atmosphérique naturelle de CO_2 . Si elle se confirme, l'origine de cette limitation pourrait être recherchée dans la fréquence stomatique faible que présente l'ananas (Aubert et de Parcevaux, 1969) et les plantes à métabolisme CAM en général par rapport aux plantes mésophytiques (Kluge et Ting, 1978). Notons que l'importance de la diffusion du CO_2 au travers de l'épais tissu mésophyllien de l'ananas est également une question à se poser face à cette observation.

III.II.4 - Assimilation de CO_2 lorsque les valeurs des quotients photosynthétiques horaires sont inférieures à 1

. Origine du quotient photosynthétique horaire inférieur à 1. La fraction de CO_2 qui n'a pu théoriquement être totalement assimilée dans le cycle de Calvin est égale à $P_0 - P_C$ lorsque $P_0 < P_C$, cette fraction symbolisée par "C" est représentée en quadrillé sur la figure 17. Elle augmente vers la fin de la phase IV.

Une β -carboxylation de PEP conduisant à un stockage de malate est l'explication la plus probable d'un $QP < 1$: la synthèse d'une mole de cet acide organique nécessite l'oxydation d'une mole de pouvoir réducteur (pour l'oxydo-réduction de l'oxaloacétate en malate, fig. 22). En conséquence, et conformément aux remarques faites au début du paragraphe III.II, la fixation de CO_2 par β -carboxylation devrait être accompagnée en première analyse par le dégagement net de moins d'oxygène que la fixation de CO_2 par la RUBISCO. A l'appui de l'existence d'une activité PEP-Case pendant les dernières heures du jour, différentes expériences réalisées chez les genres Tubiflorum et Kalanchoe ont montré que parmi les premiers produits apparus après un marquage avec $^{14}CO_2$ se trouvaient des acides organiques en C_4 (Kluge, 1969 ; Osmond et Allaway, 1974 ; Kluge et al., 1982). Notons également que différents dosages de malate réalisés chez l'ananas témoignent en fin de journée d'une faible mais significative augmentation de la concentration de cet acide organique (Black et al., 1982 ; Kenyon et al., 1985).

. Evaluation de l'accumulation de malate à la fin de la phase IV. En poursuivant le raisonnement précédent, la quantité de malate stockée au cours des dernières heures du jour devrait être égale à $2 \times "C"$. Les considérations suivantes suggèrent qu'elle est plus probablement égale à la différence $PC - P_0$.

Dans une première hypothèse, le PEP, nécessaire à la β -carboxylation, a pendant la phase IV une origine glycolytique comme c'est le cas pendant la phase nocturne (fig. 22) (Kluge et Ting, 1978 ; Osmond, 1978 ; Winter, 1985). Dans ces conditions, la production d'une mole de PEP est accompagnée de celle d'une mole de pouvoir réducteur lors de l'oxydo-réduction du glyceraldéhyde 3-P en acide di P-glycérique. En raisonnant en terme de bilan, cette production de NADH compensera l'oxydation de pouvoir réducteur néces-

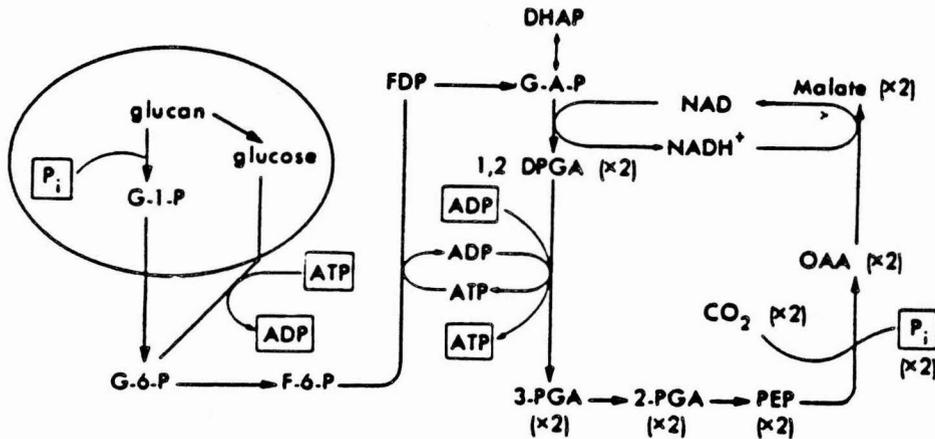


Figure 22 : Principales étapes biochimiques et bilan énergétique de la synthèse de malate chez une plante à métabolisme CAM (d'après Osmond, 1978).

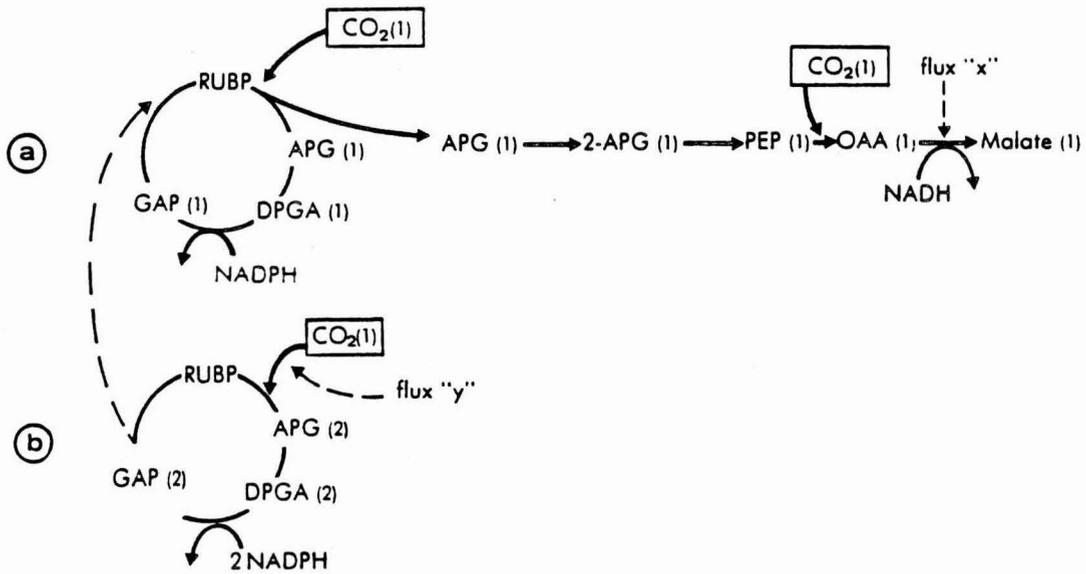


Figure 23 : Principales étapes biochimiques et bilan de pouvoir réducteur oxydé lors de la synthèse de malate dans l'hypothèse d'une carboxylation successive de RUBP et PEP (fig. 23a) ; comparaison avec l'assimilation de CO₂ dans le PCR (fig. 23b).

saire à la réduction de l'OAA en malate. En d'autres termes, une mole de malate sera formée sans être accompagnée de dégagement d'oxygène et l'accumulation de ce composé sera égale à PC-P0.

Dans une seconde hypothèse, le malate synthétisé pendant la phase IV a pour origine une "double carboxylation" impliquant une première fixation de CO₂ par la RUBISCO puis une conversion de l'un des deux phosphoglycérates formés en PEP (fig. 23a). Cette voie biochimique de synthèse de PEP à la lumière chez les plantes CAM a été proposée par Kluge et al. (1974), son existence a été vérifiée chez Kalanchoe tubiflora par Ritz et al. (1986). Selon cette dernière hypothèse, pour 1 mole de malate formée, 2 moles de CO₂ sont fixées et 2 moles de pouvoir réducteur oxydées (fig. 23a). La quantité de malate formée se déduit alors des équations suivantes. En posant égal à "x" le malate formé et à "y" la quantité de CO₂ "classiquement" assimilé dans le PCR (fig. 23b) les bilans d'échanges nets de CO₂ (PC) et O₂ (P0) lorsque le quotient photosynthétique est inférieur à 1 s'écrivent :

$$PC = 2x + y$$

$$P0 = x + y$$

On en déduit donc que la quantité "x" de malate formée est à nouveau, dans ces conditions, égale à PC-P0. Précisons que si pendant la fin de la phase IV, le malate est formé par cette voie de double carboxylation, lorsque le quotient photosynthétique sera égal à 0,5, 50 % seulement du RUBP du cycle de Calvin sera régénéré à chaque fixation de CO₂. Il serait intéressant de déterminer dans ces conditions si la concentration chloroplastique de ce composé devient limitante pour la photosynthèse et pourrait ainsi être responsable de la diminution de la fixation nette de CO₂ que nous observons généralement chez l'ananas en fin de phase IV.

Calculée par la valeur P_0-PC , la quantité de CO_2 fixée et stockée dans le malate pendant la phase IV représente dans l'exemple de la figure 17 pendant les jours 1 et 2, 3,4 % et 9,8 % de la fixation nocturne nette. Des valeurs comprises entre 3 % et 15 % ont été déterminées dans les différentes mesures réalisées. Précisons que si ces quantités sont faibles à l'échelle de 24 heures, les valeurs du quotient photosynthétique de la dernière heure de la phase IV indiquent souvent que 50 % et plus du CO_2 fixé pendant cette période sont fixés par la PEP-Case. La brièveté de la phase de fixation de CO_2 telle que $P_0=PC$ et les valeurs de plus en plus faibles du quotient photosynthétique au fur et à mesure de la progression du jour suggèrent que la PEP-Case est active dès la fin de la décarboxylation du pool de malate et fixe une part de plus en plus importante de CO_2 par rapport à la RUBISCO. Ces deux observations sont compatibles avec les propriétés de cette enzyme : l'activité PEP-Case est en majeure partie régulée par la rétro-inhibition exercée par le malate et son affinité pour le CO_2 est plus élevée que celle de la RUBISCO (Winter, 1982).

Nous terminerons ce paragraphe par deux remarques. Concernant le calcul des quotients photosynthétiques. Le QP lié à l'activité du métabolisme CAM calculé par le rapport $B/A+C$ (tableau V), est voisin de 1. La présence d'une phase de fixation de CO_2 avec un $QP < 1$ ne modifie pas la valeur du quotient photosynthétique journalier : au dénominateur du QP, la quantité totale de CO_2 assimilée a été posée égale à $(PN + R_0 + PC)$ en toute rigueur, elle est égale à : $(C \text{ (jour } j) + PN + R_0 + PC - C \text{ (jour } j + 1))$. Les échanges gazeux augmentant de façon lente entre 2 jours consécutifs, ces deux termes sont pratiquement équivalents. Chez différentes plantes CAM, la PEP-Case peut être active en début de phase II (Fisher et Kluge, 1985 ; Littlejohn et Ku, 1984), l'échelle horaire de mesure utilisée dans cette étude ne nous permet pas de préciser si une situation analogue est présente chez l'ananas.

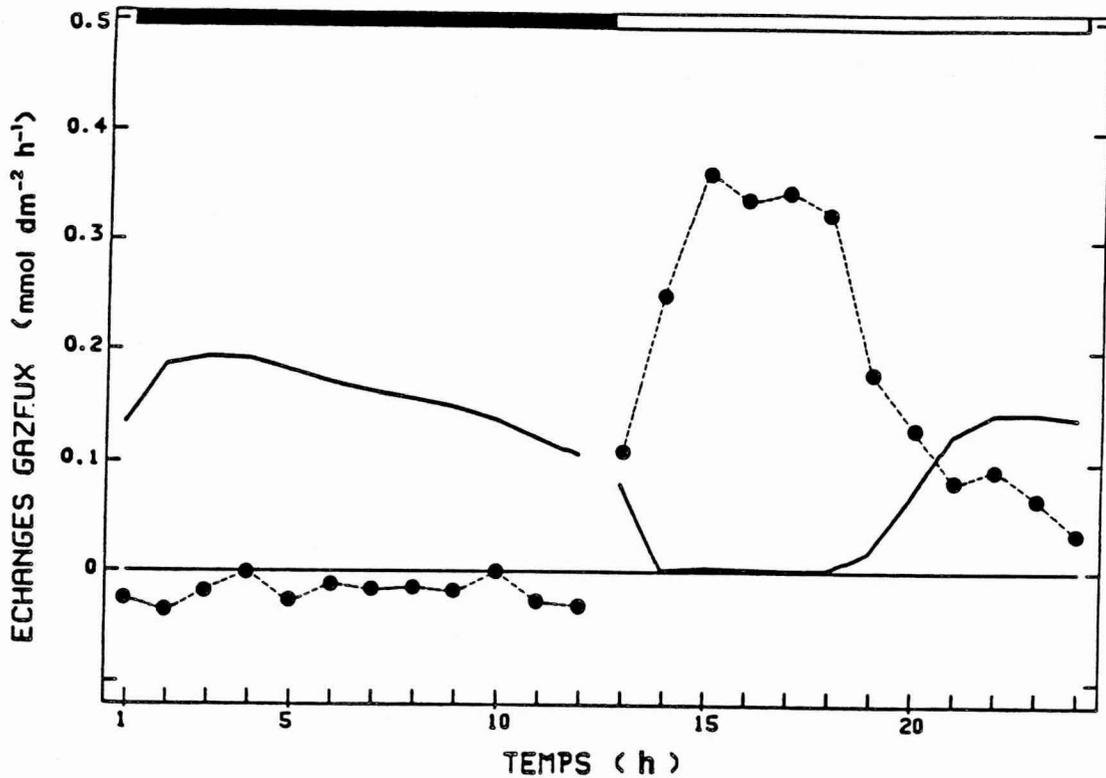


Figure 24 : Echanges nets d'O₂ et CO₂ par une feuille adulte d'ananas issu de rejet. (---●---) : Echanges d'O₂ ; (—) : échanges de CO₂. (moyenne des échanges gazeux de 4 jours consécutifs).

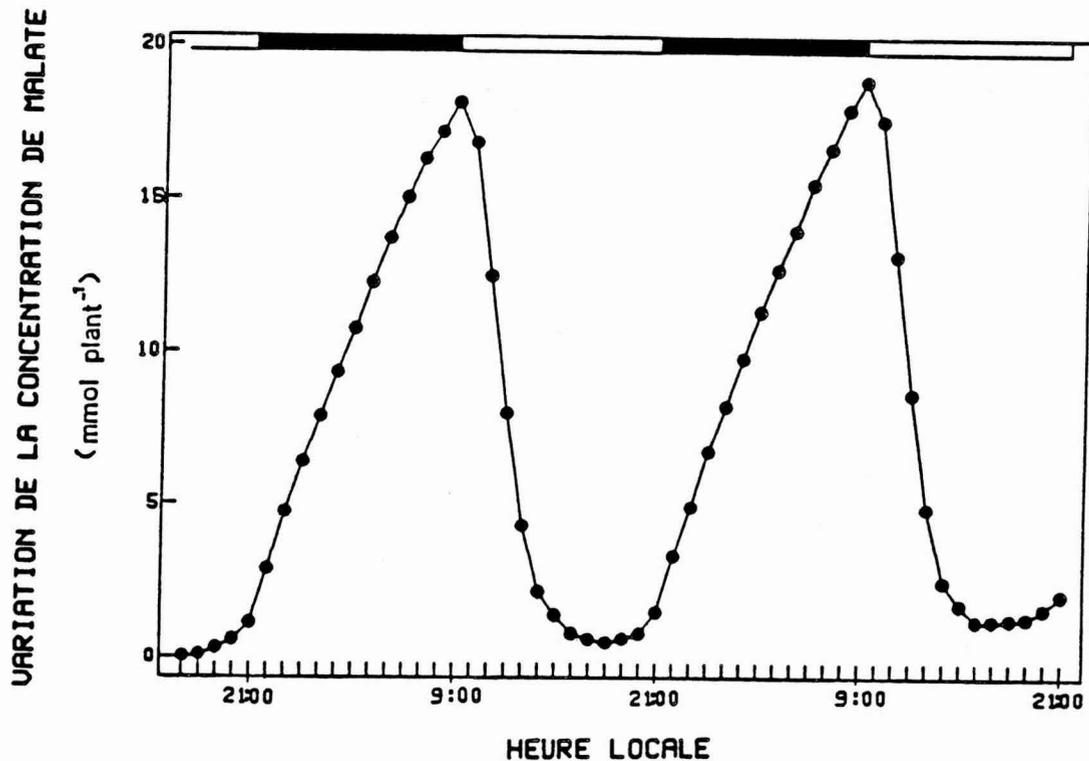


Figure 25 : Variation de la concentration de malate calculée à partir des échanges nets d'O₂ et CO₂ chez un vitroplant d'ananas. Les échanges gazeux à partir desquels est calculée la variation de concentration sont ceux présentés en figure 17 (détail du calcul dans le texte).

III.II.5 - Echanges nets d'O₂ par une feuille adulte d'ananas issu de rejets

Les échanges nets d'O₂ d'une feuille adulte de type "D" (Py et al., 1984) d'un ananas issu de rejets sont représentés sur la figure 24. Qualitativement, les résultats acquis sur les parties aériennes des vitroplants sont confirmés par ces mesures sur feuille. Notons comme principale différence que la respiration représente chez la feuille un plus faible pourcentage du bilan total de fixation nocturne de CO₂. La part réduite de parties non chlorophylliennes dans ce type de matériel végétal est l'origine probable de cette observation.

III.III - Calcul de la cinétique de variation de concentration de malate à partir des échanges gazeux O₂ et CO₂

III.III.1 - Exemple et vérification des hypothèses de calcul

. Exemple de calcul. Conformément aux résultats précédemment présentés, les échanges nets d'O₂ et CO₂ permettent de prévoir la cinétique de la variation de concentration de malate. L'accumulation nocturne horaire de cet acide organique sera égale à $PN + |RO|$; de jour, sa décarboxylation (lorsque $PO > PC$) ou sa synthèse (lorsque $PO < PC$) sera égale à $|PO - PC|$. La cinétique sur 24 heures est calculable par cumul de ces différentes valeurs (comptées positives pour une synthèse). Un exemple de calcul de cette variation pour les échanges gazeux d'un vitroplant est représenté en figure 25 (dans cette détermination, l'origine de la variation a été prise égale à 0 et le temps initial placé pendant la phase IV de la phase diurne précédant le jour 1, lorsque $PO = PC$). Selon ce modèle, les amplitudes maximales théoriques de malate accumulé pendant la nuit sont de l'ordre de 0,13 mmoles/g de matière fraîche, valeur comparable à celles obtenues par dosage chez différentes plantes CAM (Osmond, 1978).

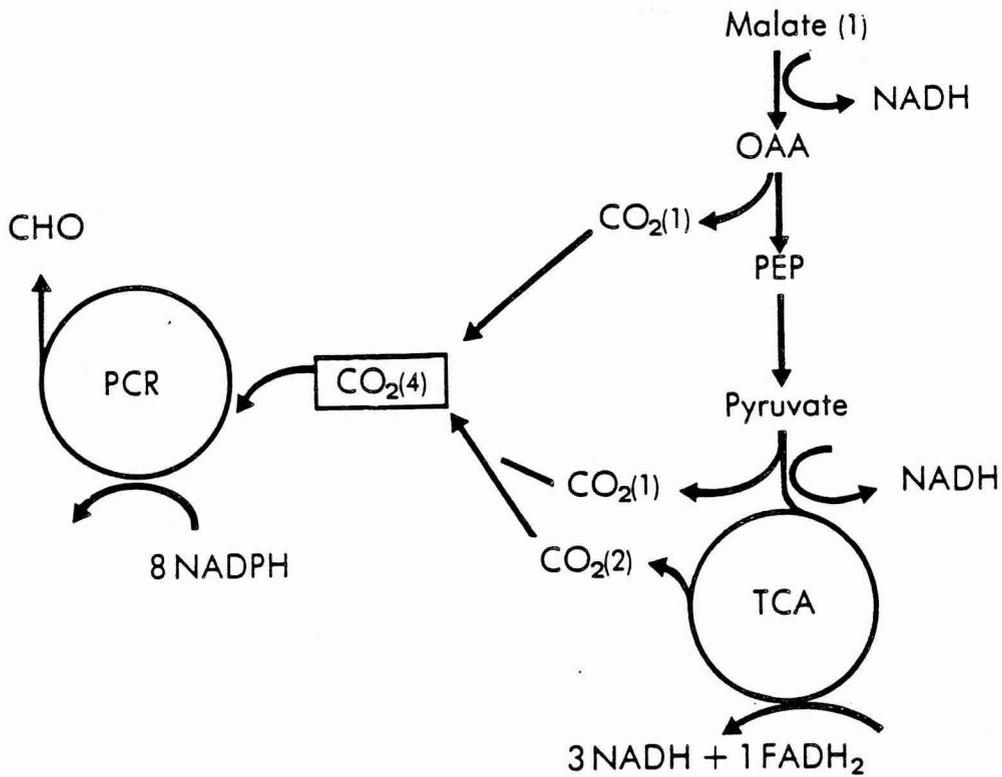


Figure 27 : Principales étapes biochimiques, bilan de pouvoir réducteur réduit et oxydé dans l'hypothèse d'une oxydation complète de malate suivie de la réassimilation du CO₂ libéré.

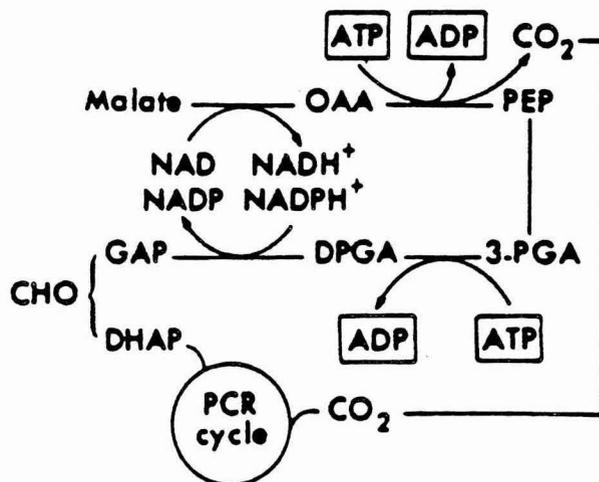


Figure 26 : Principales étapes biochimiques et bilan énergétique de la décarboxylation de malate et de la néoglucogenèse chez une plante CAM à PEP-carboxykinase (d'après Osmond, 1978).

. Vérification des hypothèses de calcul. Dans notre interprétation des quotients photosynthétiques horaires supérieurs à 1, nous avons négligé le fait que la décarboxylation de malate est accompagnée de la production d'une mole de pouvoir réducteur (fig. 26). En première approximation cependant, cela ne modifie pas la quantité de pouvoir réducteur nécessaire à l'assimilation de CO₂ "interne" et donc le dégagement d'O₂ associé. Au bilan en effet, cette production de pouvoir réducteur est nécessairement compensée par une consommation équivalente utile à la formation à partir des trioses (libérés par la décarboxylation du malate) d'un pool de carbohydrates, "source" de PEP pour la nuit suivante. Cet "équilibre" interviendra si la voie biochimique empruntée par les trioses pour regagner le pool de carbohydrates est l'étape classique de la néoglucogénèse (Holthum et al., 1983), (fig. 26) ou si elle fait intervenir une dégradation totale du PEP puis une remobilisation du CO₂ libéré (Edwards et al., 1982), (fig. 27). Cependant, l'existence d'un décalage dans le temps entre la formation de PEP et sa conversion en carbohydrates conduirait transitoirement à un déséquilibre entre la quantité de pouvoir réducteur formé lors de la décarboxylation du malate et celui utilisé pour convertir le PEP en carbohydrates. Dans ces conditions, l'assimilation du CO₂ libéré "utiliserait" (en terme de bilan) le pouvoir réducteur formé lors de l'oxydation de malate en OAA et l'émission nette d'O₂ (PO-PC) serait à cet instant inférieure à la quantité de CO₂ "interne" assimilé. Pour tester la validité de nos interprétations des quotients photosynthétiques horaires, nous avons comparé les variations de concentrations en malate calculées à partir des échanges nets d'O₂ et CO₂ et celles établies à partir du dosage de ce composé. En pratique, sur un vitroplant d'ananas suffisamment développé (390 g de masse de matière fraîche foliaire environ) pour permettre l'échantillonnage sur les 8 plus grandes feuilles de 8 fois 32 disques foliaires (diamètre

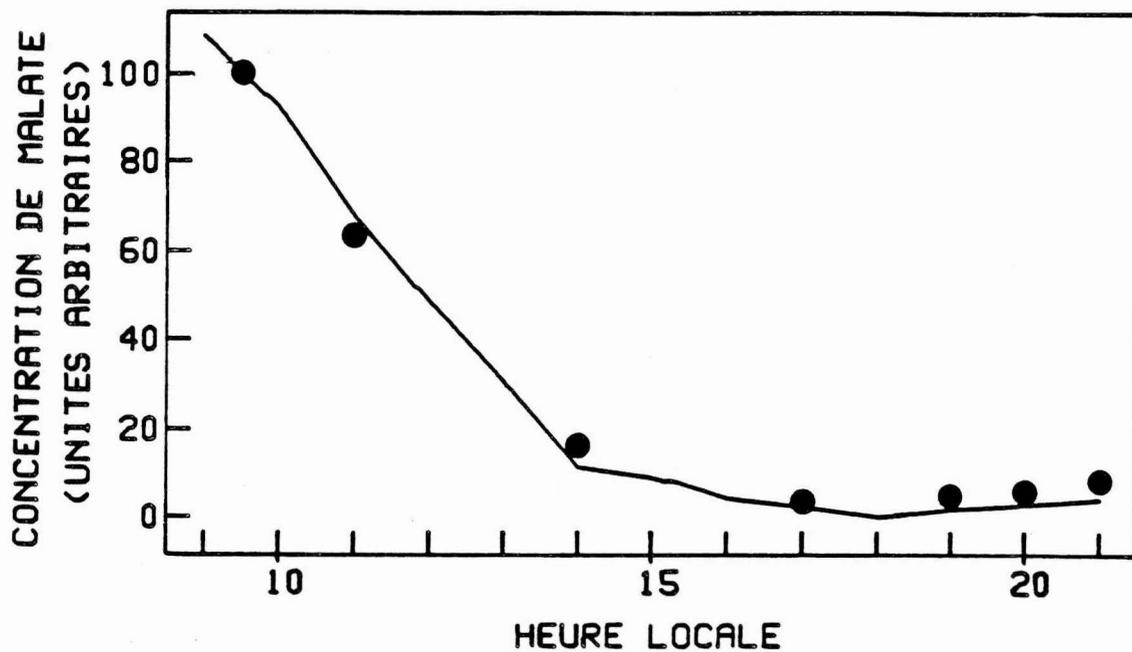


Figure 28 : Comparaison entre la variation diurne de la concentration de malate calculées à partir des échanges nets d'O₂ et CO₂ ou déterminée par dosage.
 (—) : variation calculée à partir des échanges gazeux ; (●) : dosage.
 (la concentration de malate déterminée à 9h30, premier point du dosage est choisie comme point de référence.

11 mm), les échanges gazeux ont été déterminés pendant 4 jours consécutifs, le 5e jour l'échantillonnage des disques foliaires a été réalisé à différents moments de la phase diurne. Les résultats présentés sur la figure 28 montrent qu'il existe une identité de phase étroite entre les 2 types de détermination de la variation de concentration de malate. Associée à la valeur proche de 1 du quotient photosynthétique ($B/A + C$), cette observation indique que la différence $P_0 - P_C$ est chez l'ananas identifiable à l'assimilation d'une quantité équivalente de CO_2 "interne". Cette règle n'aurait pas été vérifiée si la concentration de malate déterminée par dosage avait diminué plus vite que celle prédite par les échanges gazeux. Du point de vue de l'amplitude absolue, l'identité entre les 2 cinétiques n'est pas strictement atteinte (la prédiction étant environ 30 % supérieure au dosage en début de jour). Cette différence illustre la difficulté d'obtenir par échantillonnage une représentation quantitative précise de l'ensemble des échanges de la plante. Notons également que bien que le malate soit le principal composé synthétisé de nuit par le métabolisme CAM, d'autres acides organiques tel le citrate ou l'isocitrate pourraient être impliqués dans le type photosynthétique CAM (Kluge et Ting, 1978). Leur présence contribuerait alors à expliquer la différence entre la cinétique calculée (variation de concentration de l'ensemble des acides organiques) et le dosage de malate.

III.IV - Conclusions

L'assimilation totale de CO₂ dans le cycle de Calvin, identifiée à la quantité nette d'O₂ dégagé, présente chez l'ananas des variations importantes d'amplitude tout au long du jour. Elle atteint ses vitesses maximales pendant la phase III du cycle CAM puis décroît progressivement jusqu'à la fin de la phase IV. Par référence aux valeurs horaires du quotient photosynthétique ($QP = O_2 \text{ net émis} / CO_2 \text{ net fixé}$), cette assimilation peut être divisée en 3 phases caractéristiques :

- . De la phase II au milieu de la phase IV, le quotient photosynthétique supérieur à 1 témoigne de l'assimilation dans le cycle de Calvin du CO₂ libéré par la décarboxylation du malate synthétisé la nuit précédente. Cette assimilation de CO₂ "interne" intervient principalement pendant la phase III et le tout début de la phase IV. Au cours de cette période, sa vitesse maximale est plusieurs fois supérieure à celle de l'assimilation maximale de CO₂ "externe" atteinte pendant la 2ème partie du jour (1 à plus de 3 fois suivant l'intensité du métabolisme CAM chez un vitroplant). Cette observation confirme que, relativement à la deuxième partie du jour, le métabolisme CAM est un mécanisme de concentration du CO₂ pendant la phase III. Précisons cependant que, bien que stimulées par des concentrations intracellulaires de CO₂ en équilibre avec des pressions partielles de l'ordre de 34 pascals d'après nos estimations, les vitesses maximales de l'assimilation de CO₂ "interne" restent faibles comparées aux valeurs moyennes couramment rapportées pour les plantes C₃.
- . Vers le milieu de la phase IV, le quotient photosynthétique est transitoirement égal à 1 pendant 1 à 2 heures. Cette période correspond à la seule étape de fixation de CO₂ pouvant être considérée chez l'ananas comme une

phase photosynthétique de type C_3 stricte. La photosynthèse pendant cette période serait limitée à près de 60 % par la résistance à la diffusion gazeuse du CO_2 de l'atmosphère vers le site de carboxylation.

- . Les dernières heures de la phase diurne sont caractérisées par un quotient photosynthétique inférieur à 1 et de plus en plus faible vers la fin du jour. Une fixation de CO_2 par la PEP-Case anticipant celle de la phase nocturne peut expliquer cette observation. Selon cette hypothèse, le CO_2 fixé dans le malate pendant l'ensemble de cette phase représente chez un vitroplant d'ananas 3 à 15 % de la fixation nette nocturne. 50 % et plus de la fixation totale de CO_2 pendant la dernière heure du jour serait catalysés par la PEP-Case.

La séparation de l'assimilation de CO_2 en 3 phases correspond à une facilité de présentation, les changements de rythme sont en fait continus et progressifs. Cette évolution reflète l'influence permanente, difficilement décelable par des méthodes d'étude destructives, qu'exerce le métabolisme du malate sur la photosynthèse d'une plante CAM en "fournissant" ou "sustrayant" le CO_2 disponible pour l'activité du cycle de Calvin.

CHAPITRE IV

FIXATION D'O₂ SOUS LUMIERE PAR L'ANANAS :
RYTHME, AMPLITUDE ET CONTRIBUTION A L'ETUDE DES PROCESSUS IMPLIQUES

La photoconsommation d'O₂ par les tissus chlorophylliens rend compte de l'activité de différents processus de fixation d'oxygène : le cycle photo-respiratoire, la persistance sous lumière d'une respiration mitochondriale, des oxydations membranaires au niveau des photosystèmes (Badger, 1985). Ces voies biochimiques dont l'importance respective *in vivo* est encore discutée ont en commun une diminution du rendement quantique de la photosynthèse.

L'étude des caractéristiques de la fixation d'oxygène sous lumière des plantes C₃ et C₄ a fait l'objet de différents travaux (Gerbaud et André, 1979 ; Gerbaud et André, 1980 ; Calvin et al., 1980 ; Badger et Calvin, 1981 ; Furbank et al., 1982 ; Furbank et Badger, 1982). Celle des plantes à métabolisme CAM n'a été entreprise à notre connaissance que dans le Laboratoire d'Agrophysiologie. Parmi les résultats acquis pour ce type photosynthétique, il se dégage principalement que le rapport fixation d'O₂ sous lumière/photosynthèse est, à l'échelle du jour, élevé chez les différentes plantes étudiées (André et al., 1979 ; Thomas et André, 1987 ; Thomas et al., 1987), et qu'en réponse à une augmentation de la concentration de CO₂, la photoconsommation est peu réprimée chez Sempervivum tectorum (Thomas et al., 1987), contrairement aux observations classiques faites pour des plantes de type C₃.

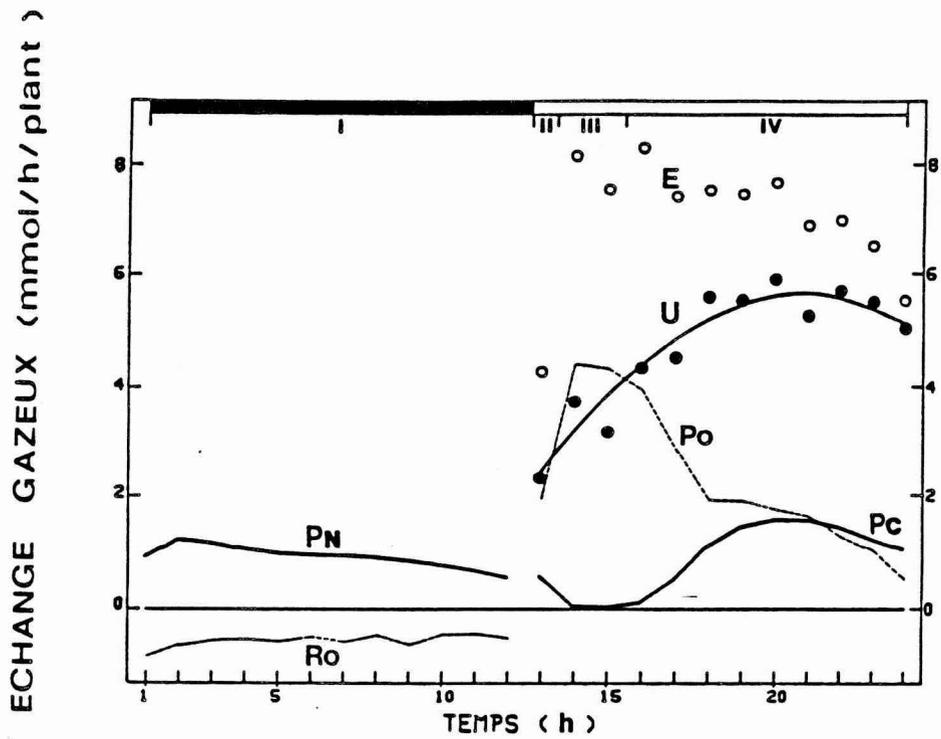


Figure 29 : Fixation d' O_2 sous lumière, échanges nets de CO_2 et O_2 et émission photosynthétique brute d'oxygène par les parties aériennes d'un vitroplant d'ananas. (-●-) : fixation d' O_2 sous lumière U ; (—) : échanges nets de CO_2 ; (----) : échanges nets d' O_2 ; (○) : émission photosynthétique brute d' O_2 , E. (moyenne des échanges gazeux de 4 jours consécutifs ; le plant étudié présentait 50 % de la fixation totale nette de CO_2 pendant la phase nocturne).

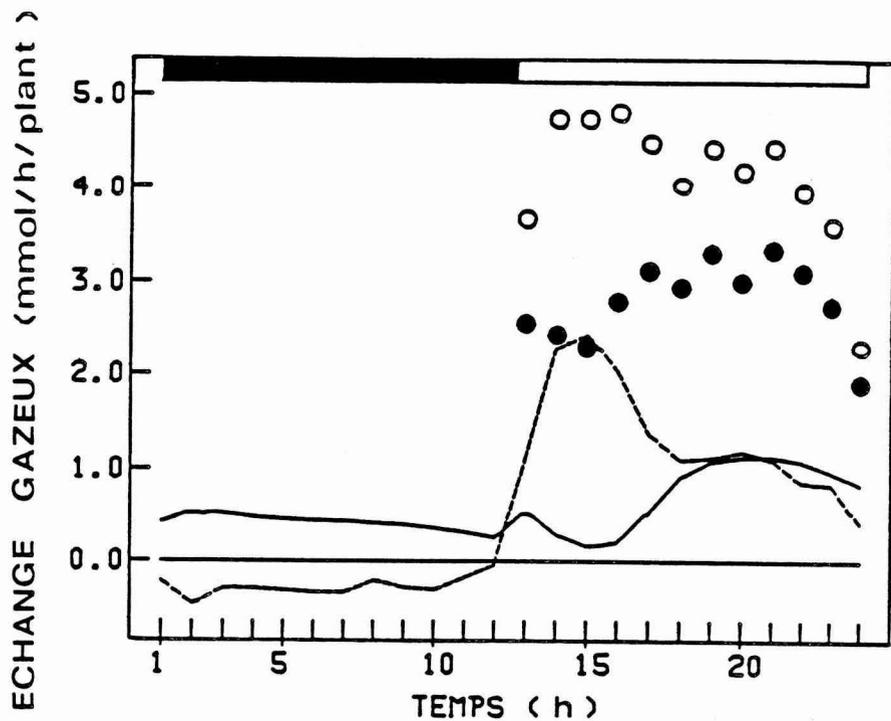


Figure 30 : Fixation d' O_2 sous lumière, échanges nets de CO_2 et O_2 et émission photosynthétique brute d'oxygène par les parties aériennes d'un vitroplant d'ananas. Légendes identiques à celles de la figure 29 (le plant étudié présentait 36 % de la fixation totale nette de CO_2 pendant la phase nocturne).

Bénéficiant de l'évolution des techniques d'analyse du laboratoire et disposant, avec les vitroplants d'ananas, d'un matériel végétal présentant un rapport volume d'échange gazeux/volume de plante élevé, gage de précision de mesure accrue, nous avons poursuivi ces travaux. L'objectif de cette étude était de déterminer la fixation d'O₂ de l'ananas au cours des différentes phases diurnes du métabolisme CAM, de préciser les relations entre ce type photosynthétique et la photorespiration.

IV.I - Photoconsommation d'O₂ au cours des différentes phases diurnes du cycle CAM

IV.I.1 - Rythme et amplitude

a) Caractéristiques de la fixation d'O₂

La photoconsommation d'O₂ (U) par les parties aériennes de vitroplants d'ananas présente deux principales caractéristiques (fig. 29, 30) :

- . Son amplitude est variable au cours des 3 phases diurnes du cycle CAM. Les plus faibles vitesses d'échange sont atteintes pendant la première partie du jour (phases II et III), elles augmentent progressivement et atteignent leurs valeurs maximums vers le milieu de la phase IV.
- . Au cours de la deuxième partie du jour, la fixation d'O₂ est élevée comparativement aux échanges photosynthétiques. Le quotient U/PC est couramment de l'ordre de 3 pendant la phase IV. Cette observation confirme les fortes valeurs journalières de ce même rapport déterminées chez les plantes CAM Kalanchoe blossfeldiana, Sempervivum tectorum, Prenia sladeniana (André et al., 1979 ; Thomas et André, 1987).

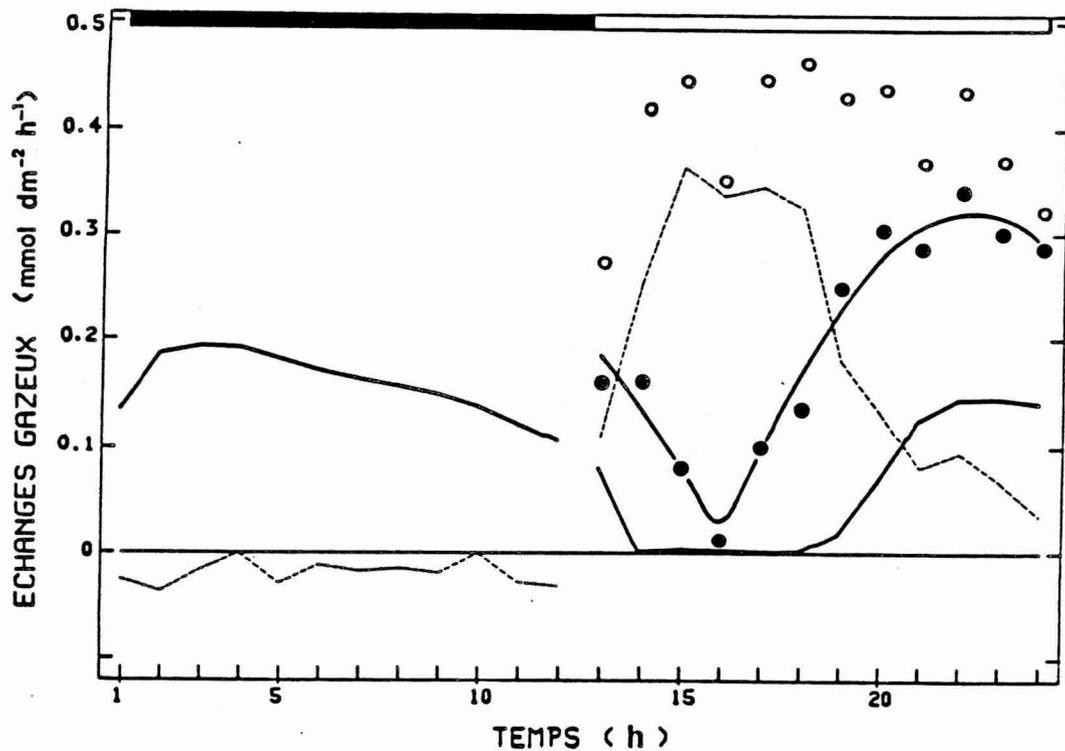


Figure 31 : Fixation d' O_2 sous lumière, échanges nets de CO_2 et O_2 et émission photosynthétique brute d'oxygène par une feuille adulte d'ananas issu de rejet. (—●—) : fixation d' O_2 sous lumière ; (—) : échanges nets de CO_2 ; (-----) : échanges nets d' O_2 ; (O) : émission brute d' O_2 .

La photoconsommation d'O₂ par une feuille attachée adulte (type "D") d'ananas issu de rejet présente des caractéristiques comparables à celles des parties aériennes de vitroplants (fig. 31). Sur ce système simplifié, le rythme de fixation est de façon nette en opposition de phase avec celui de l'assimilation de CO₂ "interne" identifié par l'émission d'oxygène. Précisons cependant que la fixation d'O₂ pendant la phase III et le rapport U/PC pendant la phase IV sont plus faibles que ceux observés chez des vitroplants. Le plus faible quotient fixation d'O₂/fixation de CO₂ présenté par la feuille peut être dû au faible éclaircissement utilisé dans cette expérience et à la présence réduite de tissu non chlorophyllien.

b) Amplitude de la fixation d'O₂

Nous décrivons dans ce paragraphe l'amplitude de U pendant la phase IV. La nature du rythme de fixation d'O₂ sera évoquée dans la suite de l'exposé.

Amplitude absolue de la fixation d'O₂. Exprimée par unité de surface foliaire, la fixation d'O₂ sous lumière atteint pour les parties aériennes de vitroplant des valeurs maximums de l'ordre de 0,25 à 0,35 mmol/dm²/h pendant la phase IV. Sur feuille attachée d'ananas issu de rejet, ce flux est voisin de 0,3 mmol/dm²/h sous un éclaircissement de 390 μmol/m²/s (fig. 31).

Canvin et al. (1980), Badger et Canvin (1981) ont déterminé sur feuille dans des conditions comparables de mesure (éclaircissement = 400 μmol/m²/s ; température moyenne 30°C ; concentration de CO₂ = 340 μl/l ; concentration d'O₂ ≈ 18-28 %) des consommations d'O₂ comprises entre 0,3 et 0,6 mmol/dm²/h pour différentes plantes de type C₃ et des valeurs proches de 0,18 mmol/dm²/h pour le type C₄ représenté par Amaranthus edulis. L'amplitude maximum de la photoconsommation d'O₂ par l'ananas est donc voisine des valeurs minimums rapportées pour des plantes de type C₃. Cette observation pourrait être à

nouveau la conséquence de teneurs en RUBISCO faibles par unité de surface foliaire telle que celle présente chez Kalanchoe pinnata (Winter et al., 1982).

Amplitude relative de la fixation d'O₂ et production brute d'oxygène.

Quelle que soit la nature des processus de fixation d'O₂ sous lumière, la somme $E = U + P_0$, émission brute d'oxygène par photooxydation de l'eau est une mesure du flux électronique généré au niveau des membranes chloroplastiques. La fixation d'O₂ représente chez l'ananas de 60 % à parfois plus de 80 % de cette émission brute au cours de la phase IV (fig. 29, 30, 31). L'énergie photochimique produite pendant cette période est donc principalement utilisée pour réduire l'oxygène. Par comparaison, pour des conditions moyennes d'éclairement et des concentrations de CO₂ et O₂ naturelles, la photoconsommation d'O₂ est chez les plantes C₃ égale à 45-55 % de E (Gerbaud et André, 1979 ; Canvin et al., 1980 ; Badger et Canvin, 1981).

L'émission brute d'oxygène présente de faibles valeurs pendant la première heure de la phase diurne chez l'ananas. L'origine précise de cette observation est hypothétique. Les possibilités de régulation du flux électronique au niveau des photosystèmes sont encore peu connues. La disponibilité en accepteurs de pouvoir réducteur participe sans doute à cette régulation (Badger, 1985). Dès lors, les faibles valeurs de E au cours de la première heure de jour pourraient être la conséquence d'un fonctionnement réduit des cycles photosynthétique et photorespiratoire dû à une activation progressive de la RUBISCO à la transition obscurité/lumière (Perchorowicz et al., 1981).

IV.I.2 - Nature du rythme

. Evaluation du recyclage d'oxygène photosynthétique par les processus de la fixation d'O₂ pendant la première partie du jour. Les plantes à métabolisme CAM sont bien connues pour la résistance stomatique élevée qu'elles présentent pendant la phase III (Kluge et Ting, 1978 ; Osmond, 1978 ; Winter, 1985). On peut dès lors suggérer que c'est le recyclage d'oxygène photosynthétique par les processus de photoconsommation d'O₂ qui est la cause des faibles valeurs apparentes de fixation d'O₂ pendant cette période. Gerbaud et André (1987) ont montré que le flux "réel" de fixation d'O₂ sous lumière (U_t) peut être calculé à partir du flux apparent (U_a) par l'équation suivante :

$$U_t = U_a \times \frac{0 + r \times 1,4 \times P_0}{0 - r \times 1,4 \times P_0}$$

où 0 est la concentration externe d'oxygène

r la résistance à la diffusion de vapeur d'eau entre l'atmosphère et la cavité sous-stomatique

1,4 le coefficient de diffusion relative vapeur d'eau/air et oxygène/air

Pour les résultats présentés en figure 29 (et pour une surface foliaire totale égale à 17,5 dm²), cette équation permet de calculer que pendant la phase III, la sous-estimation de U_t n'excèdera pas 5 % si r atteint pendant cette période 150 s/cm, valeur plausible de résistance stomatique à la diffusion gazeuse chez l'ananas (Aubert, 1970 ; Bartholomew et Kadziminin, 1977). Un recyclage d'oxygène photosynthétique ne peut donc que partiellement rendre compte des faibles amplitudes de fixation d'O₂ pendant la phase III.

Dans une seconde hypothèse, l'augmentation de concentration interne de CO₂ consécutive à la décarboxylation du malate est à l'origine d'une représ-

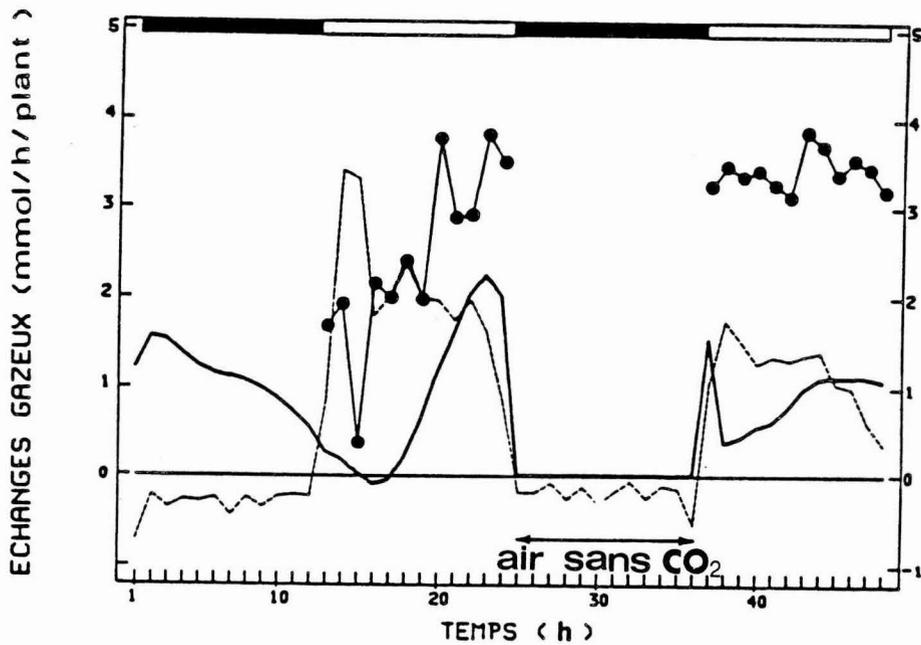


Figure 32 : Fixation d'O₂ sous lumière et échanges nets de CO₂ et O₂ par les parties aériennes d'un vitroplant d'ananas après une phase nocturne dans une atmosphère sans CO₂. Comparaison avec les échanges gazeux de la photopériode précédente. (●) : fixation d'O₂ sous lumière ; (—) : échanges nets de CO₂ ; (-----) : échanges nets d'O₂.

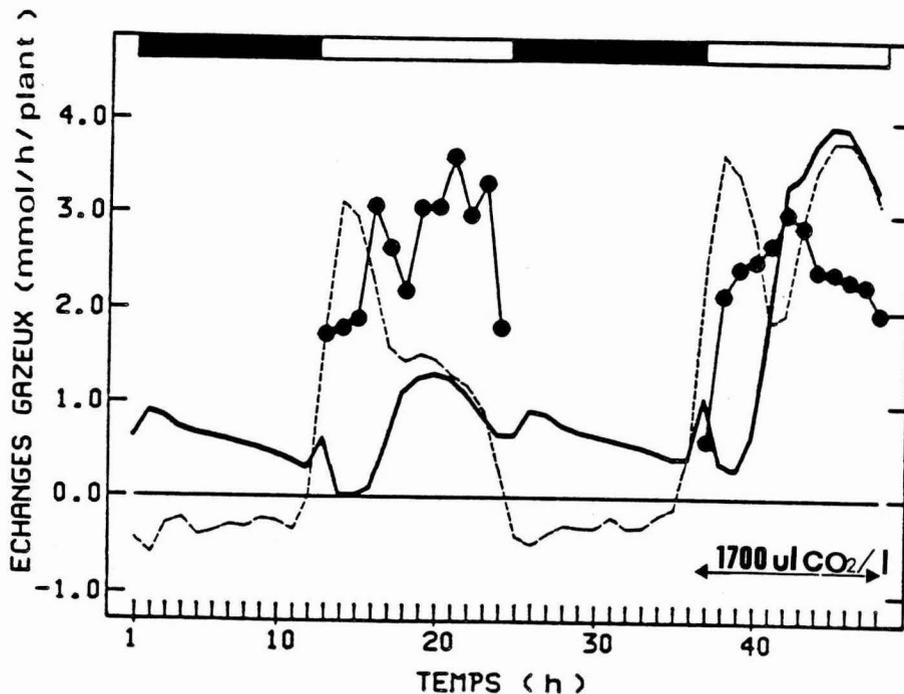


Figure 33 : Fixation d'O₂ sous lumière et échanges nets de CO₂ et O₂ par les parties aériennes d'un vitroplant d'ananas au cours d'une phase diurne dans une atmosphère contenant 1700 µl/l de CO₂. Comparaison avec les échanges gazeux de la photopériode précédente. Légendes identiques à celles de la figure 32.

sion de l'activité oxygénasique de la RUBISCO capable de diminuer le bilan total de photoconsommation d'O₂ pendant la première partie du jour. Pour vérifier cette proposition, les deux expériences suivantes ont été réalisées.

. Fixation d'O₂ sous lumière après une nuit dans une atmosphère sans CO₂.

Lorsque la fixation nocturne nette de CO₂ est rendue impossible en plaçant un vitroplant dans une atmosphère sans gaz carbonique, seul le CO₂ d'origine respiratoire peut être fixé par la PEP-Case (fig. 32). Le jour suivant, la faible amplitude de l'émission nette d'O₂ pendant la première partie de la phase diurne est l'indice d'une moindre augmentation de la concentration de CO₂ "interne" par rapport à un jour témoin. Dans ces conditions, les vitesses de photoconsommation d'O₂ sont dès le début de la phase diurne comparables à celles atteintes pendant la phase IV du jour témoin.

. Fixation d'O₂ sous lumière en présence de concentration externe élevée de CO₂.

En présence d'une atmosphère contenant 1700 µl CO₂/l, la photosynthèse d'un vitroplant d'ananas est surtout stimulée pendant la phase IV de fixation de CO₂ "externe" (fig. 33). Au cours de cette période, la photoconsommation d'O₂ est diminuée par rapport à un jour standard et atteint des valeurs voisines de celles de la première partie du jour. (Remarquons que le triplement de la fixation de CO₂ à 1700 µl CO₂/l en phase IV par rapport au jour standard (fig. 33) soutient l'hypothèse émise dans le chapitre III d'une limitation de la photosynthèse par une résistance à la diffusion de CO₂ élevée).

Ces deux expériences indiquent que le rythme de fixation d'O₂ sous lumière peut être limité en diminuant la décarboxylation de malate et l'élévation de concentration intracellulaire de CO₂ qui l'accompagne (fixation d'O₂ maintenue à une valeur "élevée") ou en imposant des concentrations de CO₂ externes

importantes (fixation d'O₂ maintenue à une valeur "faible"). Ces observations sont en accord avec la régulation de l'activité oxygénasique de la RUBISCO par le rapport des concentrations O₂/CO₂ (Laing et al., 1974). Il est donc probable que la moindre fixation d'oxygène pendant la première partie du jour soit la conséquence d'une limitation de la photorespiration par le mécanisme d'augmentation de la concentration de CO₂ que constitue le métabolisme CAM. Notons que cette modulation *in vivo* de l'amplitude de la photorespiration est comparable à celle qui a lieu chez le type photosynthétique C₄ au niveau des cellules de la gaine lors de la décarboxylation des acides organiques C₄ synthétisés dans les cellules du mésophylle (Canvin et al., 1980 ; Badger et Canvin, 1981 ; Furbank et Badger, 1982).

IV.II - Réponse de la photoconsommation d'O₂ et de la photosynthèse de l'ananas à des variations de l'intensité de l'éclairement et de concentration de CO₂ et d'O₂

Si la méthode isotopique par ¹⁸O permet la détermination du bilan de fixation d'O₂ sous lumière, elle ne permet pas de discrimination directe entre les différents processus de fixation d'O₂ impliqués. Par référence aux propriétés enzymatiques de la RUBISCO, la plupart des auteurs s'accordent cependant pour reconnaître le rôle majeur que joue le cycle photorespiratoire dans la photoconsommation d'O₂ des plantes C₃ (pour revue Osmond, 1981 ; Ogren, 1984 ; Badger, 1985). Compte tenu de la valeur importante du rapport (fixation d'O₂)/(photosynthèse) de l'ananas comparée à celles du type métabolique C₃, une situation analogue est-elle présente chez cette plante ? Pour apporter des éléments de réponse à cette question, nous avons testé dans la suite de ce travail la réponse de la photoconsommation d'O₂ de l'ananas à des variations des paramètres externes (intensité de l'éclairement, concentration de CO₂ et O₂) connus pour influencer la fixation d'O₂ chez le type photosynthétique C₃.

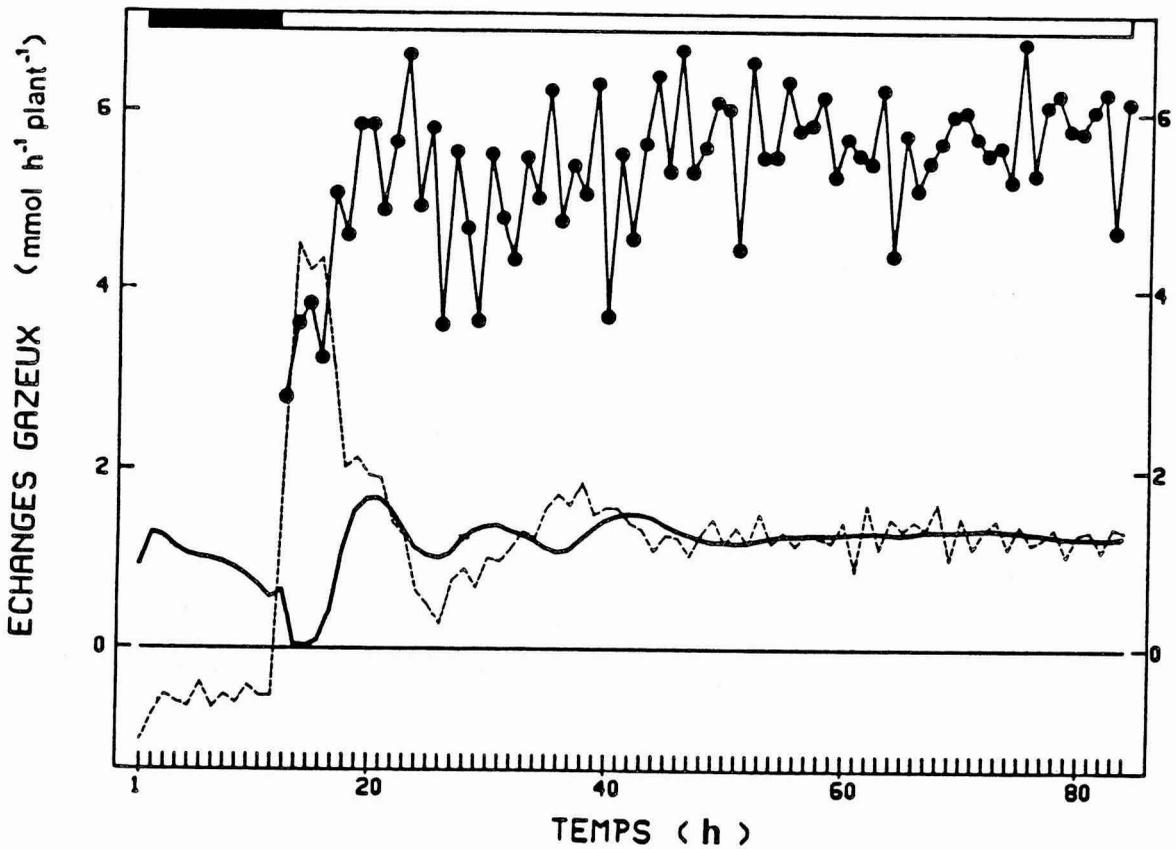


Figure 34 : Fixation d'O₂ sous lumière et échanges nets de CO₂ et O₂ par les parties aériennes d'un vitroplant d'ananas placé sous un éclairage continu.
 (—●—) : fixation d'O₂ sous lumière ; (—) : échanges nets de CO₂ ; (----) : échanges nets d'O₂. La phase nocturne précédant l'éclairage continu est figurée par la barre noire.

IV.II.1 - Protocole d'étude retenu

La photoconsommation d'O₂ de l'ananas est limitée pendant la première partie du jour par le métabolisme CAM. En conséquence, ses caractéristiques "potentielles" doivent être étudiées lorsque la décarboxylation du malate n'influence pas (ou peu) l'activité photosynthétique, c'est-à-dire pendant la fixation de type C₃ de la phase IV. Deux difficultés méthodologiques sont alors présentes. D'une part, l'étape de fixation C₃ de la phase IV est trop brève pour y faire varier un paramètre et déterminer dans des conditions de précision suffisantes son effet sur U, d'autre part, la modification des conditions du milieu peut induire un déséquilibre dans le rythme des échanges gazeux de la photopériode suivante. Toute nouvelle variation de l'intensité du paramètre étudié doit alors attendre la stabilisation de ces échanges. Le temps d'expérimentation est ainsi allongé et rend difficiles les comparaisons entre les caractéristiques de la plante en début et fin d'analyse. Pour faire face à ces difficultés, la photoconsommation d'O₂ de l'ananas a été principalement étudiée chez des vitroplants placés sous lumière continue. Dans ces conditions, les échanges gazeux sont souvent caractérisés pendant les 40 premières heures de la période de jour prolongé par la présence de rythmes de fixation nette de CO₂ et émission nette d'O₂ en opposition de phase et d'amplitude réduite (fig. 34). Cette observation indique, conformément au résultat du chapitre III, la persistance sous lumière continue d'un rythme de synthèse-dégradation de malate. En prolongeant l'expérience, les échanges nets de CO₂ et O₂ se stabilisent et leurs valeurs sensiblement égales témoignent alors de l'absence de fluctuation d'un pool de cet acide organique. Par marquage avec ¹⁴CO₂ et dosage de malate, des observations voisines ont été faites par Buchanan-Bollig (1984), Buchanan-Bollig *et al.* (1984), Ritz et Kluge (1987) chez le genre *Kalanchoe*. Une fixation de "type" C₃, d'amplitude comparable à celle de la deuxième partie du jour peut donc

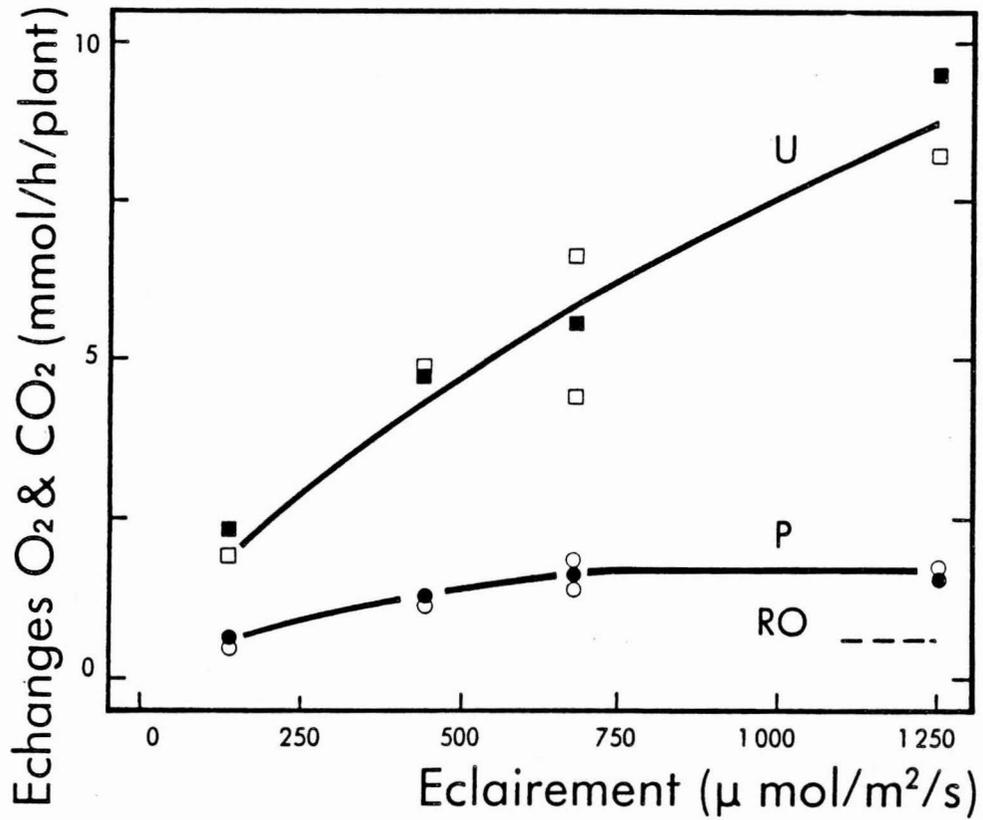


Figure 35 : Influence de l'intensité de l'éclairement sur la fixation d'O₂ sous lumière et la photosynthèse des parties aériennes de 2 vitroplants d'ananas. U : fixation d'O₂ par le plant 1 (■) et 2 (□) ; P : fixation nette de CO₂ par le plant 1 (●) et 2 (○) ; (---) : amplitude moyenne de la fixation nocturne d'O₂.RO.

être maintenue pendant des temps prolongés chez l'ananas. Au cours de ces périodes, un rapport photosynthèse/transpiration voisin de celui de la deuxième partie du "jour standard" confirme également la similitude des échanges gazeux entre la phase IV et une période de jour prolongée. C'est dans ces conditions que l'effet des paramètres, intensité de l'éclairement, concentration de CO₂ et O₂ sur la photoconsommation d'O₂ a été étudié. Chaque point expérimental a été déterminé après maintien des conditions stables de mesure pendant des temps de 4 à 7 heures, durée nécessaire à une mesure fiable de la fixation d'O₂ par ¹⁸O₂.

IV.II.2 - Influence de l'intensité d'éclairement et des concentrations de CO₂ et d'O₂

a) Influence de l'intensité d'éclairement

La figure 35 illustre l'influence de l'intensité de l'éclairement sur la photoconsommation d'O₂ et la photosynthèse de deux vitroplants d'ananas présentant un stade de développement comparable et placés sous lumière continue. Les résultats conduisent aux principales observations suivantes :

Fixation d'O₂. La photoconsommation d'O₂ de l'ananas est un processus photo-dépendant, elle augmente avec l'intensité de l'éclairement et n'est pas saturé à 1250 μmol photons/m²/s. Remarquons que la fixation d'O₂ sous lumière est jusqu'à 10 fois supérieure à la respiration nocturne moyenne en conditions standard.

Photosynthèse. Aux faibles éclaircissements, la fixation de CO₂ augmente moins rapidement que la photoconsommation d'O₂. La photosynthèse n'est plus limitée par l'éclairement au-delà de 700 μmol photons/m²/s.

Qualitativement, l'effet d'intensité lumineuse croissante sur la photoconsommation d'O₂ de l'ananas ne se distingue pas des résultats obtenus sur feuille ou plante entière de type C₃ (Gerbaud et André, 1980 ; Calvin et al., 1980 ; Badger et Calvin, 1981). Comme chez ces végétaux, l'augmentation

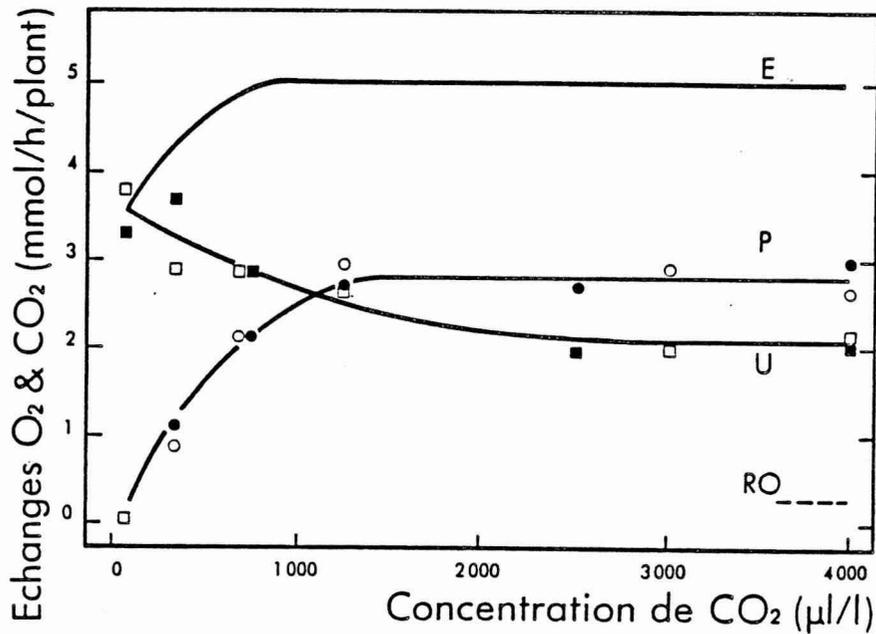


Figure 36 : Influence de la concentration de CO₂ sur la fixation d'O₂ sous lumière et la photosynthèse des parties aériennes de 2 vitroplants d'ananas. U : fixation d'O₂ sous lumière par le plant 1 (■) et 2 (□). P : fixation nette de CO₂ par le plant 1 (●) et 2 (○). (—) : moyenne de la somme des échanges U + P. (---) : amplitude moyenne de la fixation nocturne d'O₂. RO.

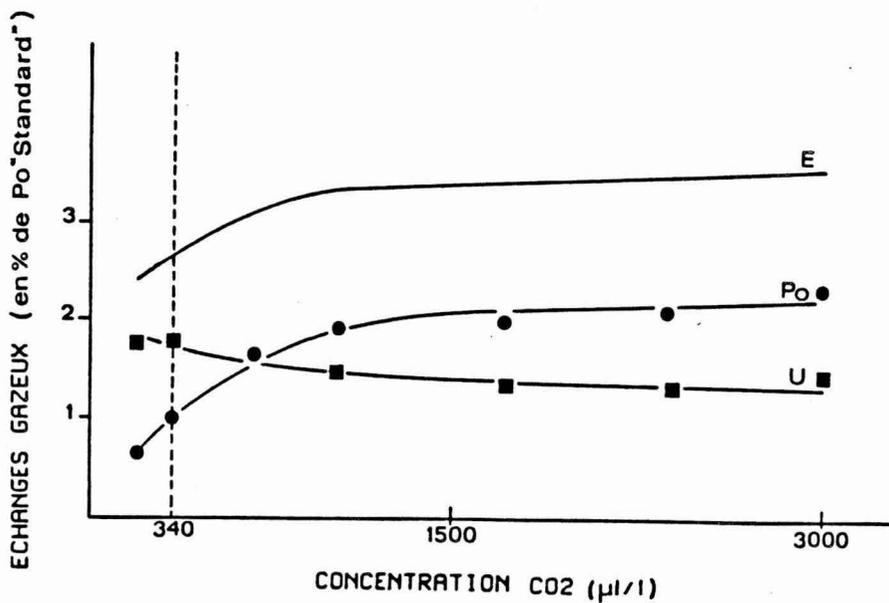


Figure 37 : Influence de la concentration de CO₂ sur la fixation d'O₂ sous lumière et la photosynthèse d'un vitroplant d'ananas. Résultats obtenus en régime photopériodique 12 h jour/12 h nuit. (■) : U, fixation d'O₂ sous lumière ; (●) : P₀, émission nette d'O₂ ; (—) : E, émission brute d'O₂.

de l'éclairement se traduit par une augmentation de l'activité des photosystèmes (de la valeur de E approximée ici par $U + PC$). Précisons que l'augmentation plus rapide de la fixation d' O_2 par rapport à la photosynthèse et la non-saturation de ce processus à fort éclairement, si elles n'ont pas toujours été observées chez les plantes C_3 , ne sont cependant pas une caractéristique de l'ananas : dans des conditions de mesures voisines, des observations qualitativement similaires ont été réalisées par Calvin et al. (1980) chez Hirschfeldia incana.

b) Influence de la concentration de CO_2

Dans des atmosphères à différentes concentrations de CO_2 , la photoconsommation d' O_2 et la photosynthèse de parties aériennes de vitroplants d'ananas présentent les caractéristiques suivantes (fig. 36) :

Fixation d' O_2 . La diminution de la photoconsommation d' O_2 et l'augmentation de la photosynthèse en réponse à une élévation de la concentration de CO_2 témoignent d'une complémentarité entre CO_2 et O_2 comme accepteurs (dans le cycle photosynthétique et photorespiratoire) de l'énergie photochimique E . Cependant, cette complémentarité n'est pas quantitative : la fixation d' O_2 n'est que partiellement réprimée par les fortes concentrations de CO_2 .

Photosynthèse. Le point de compensation apparent de CO_2 , dans les deux déterminations, est voisin de $70 \mu l CO_2/l$. Il est proche des valeurs maximums rapportées pour différentes plantes C_3 (Black, 1973). La photosynthèse est saturée à des concentrations externes de CO_2 plus élevées que celles généralement rapportées pour des plantes C_3 placées dans des conditions voisines de mesure. La limitation des concentrations internes de CO_2 par des résistances à la diffusion gazeuse importante, participe sans doute à l'explication de cette observation.

. Effet de la concentration de CO₂ chez un vitroplant d'ananas placé en régime photopériodique standard. L'effet de la variation de la concentration de CO₂ sur les échanges gazeux journaliers d'un vitroplant d'ananas placé en régime photopériodique standard (12 h jour/12 h nuit) est présenté sur la figure 37. Les résultats obtenus dans cette expérience confirment ceux observés en lumière continue et appuient la validité du protocole d'étude retenu.

Caractérisée par sa réponse au CO₂, la photoconsommation d'O₂ de l'ananas se distingue de celle des plantes C₃ par l'amplitude élevée qu'elle présente à CO₂ saturant comparativement à l'émission photosynthétique brute d'O₂ et à la respiration nocturne. Cette observation s'oppose à l'attribution de la fixation d'O₂ à la seule activité du cycle oxydatif. L'activité oxygénase de la RUBISCO devrait en effet être inhibée lorsque le CO₂ n'est plus limitant pour l'activité carboxylase (Laing et al., 1974). Thomas et al. (1987) ont également observé à l'échelle de la phase diurne chez la plante CAM Sempervivum tectorum que U représentait encore près de 50 % de E à une concentration de CO₂ de 800 µl/l. Chez les plantes C₃, blé et moutarde indienne, ce pourcentage, pour des concentrations de CO₂ proches de la saturation de la photosynthèse, est respectivement de 10 % et 25 à 30 % (Gerbaud et André, 1979 ; Calvin et al., 1980).

c) Influence de la concentration d'O₂

La photoconsommation d'O₂ et la photosynthèse des parties aériennes de vitroplants d'ananas présentent les caractéristiques suivantes en réponse à des variations de concentration d'oxygène (fig. 38) :

Fixation d'O₂. La photoconsommation d'O₂ par l'ananas est un processus oxygène-dépendant sur l'ensemble des concentrations d'O₂ étudiées. Aux plus faibles teneurs ($\approx 3\%$ d'O₂), la répression de U par rapport à sa valeur

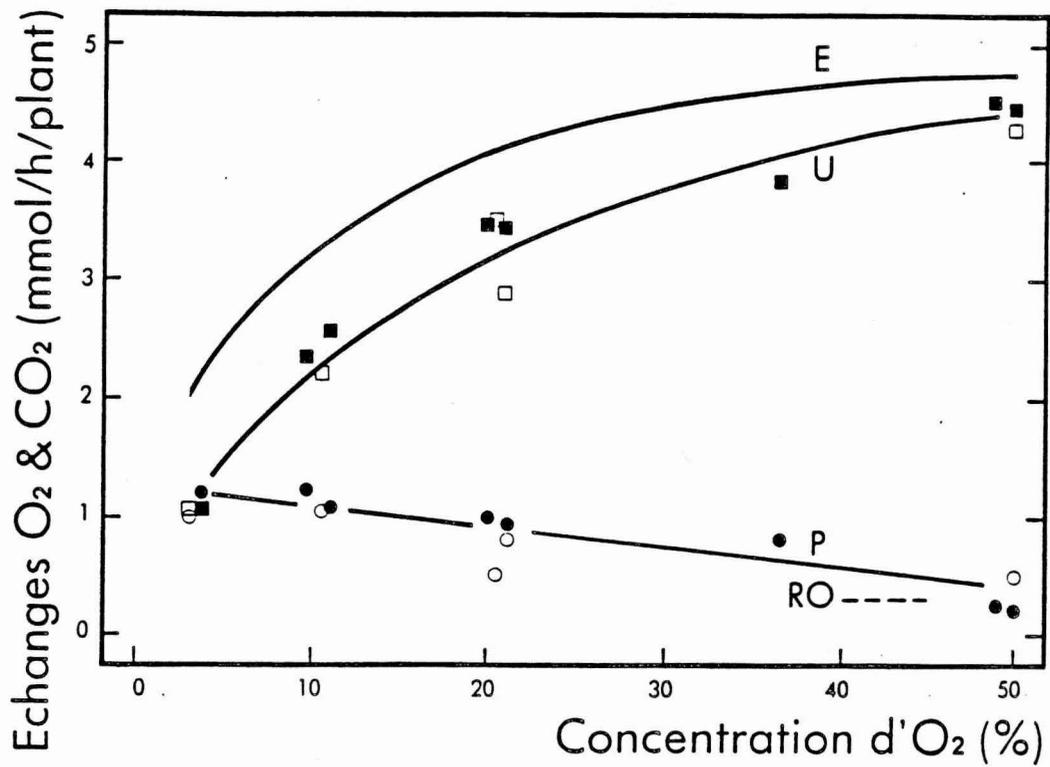


Figure 38 : Influence de la concentration d'O₂ sur la fixation d'O₂ sous lumière et la photosynthèse des parties aériennes de 2 vitroplants d'ananas. U : fixation d'O₂ sous lumière par le plant 1 (■) et 2 (□). P : fixation nette de CO₂ par le plant 1 (●) et 2 (○). (—) : moyenne de la somme des échanges U + P . (---) : amplitude moyenne de la fixation nocturne d'O₂.RO.

standard (21 % d'O₂) est de 2/3 environ. Cette répression est de l'ordre de 1/3 chez le blé (Gerbaud et André, 1980). A une concentration d'oxygène atteignant 50 %, U n'est pas saturée. Pour la moutarde indienne, Canvin et al. (1980) ont observé que la fixation d'oxygène n'augmentait plus au-delà de 30 % d'O₂.

Photosynthèse. En pourcentage relatif, la stimulation de la photosynthèse déterminée entre 21 % et 2 % d'O₂ est proche de 20 %. Comparativement des valeurs de stimulation de 45 % sont rapportées pour les plantes C₃ (Ogren, 1984). Compte tenu du faible effet Warburg présent chez l'ananas, la fixation de CO₂ à faible teneur d'oxygène ne compense pas la diminution de U et l'activité des photosystèmes (E) diminue. Cette observation témoigne que, chez l'ananas, la photosynthèse n'est pas seulement limitée aux faibles concentrations d'O₂ par la compétition entre activité oxygénase et carboxylase de la RUBISCO. La résistance importante à la diffusion de CO₂ précédemment décrite peut à nouveau contribuer à expliquer cette observation : la capacité de carboxylation libérée sous faible pression d'O₂ ne peut s'exprimer car c'est la disponibilité de CO₂ au site de carboxylation qui est limitante.

En réponse à des variations de concentration d'O₂ et CO₂, la complémentarité étroite entre les processus d'oxygénation et carboxylation comme accepteurs de l'énergie photochimique ("effet miroir") est un des principaux arguments de l'attribution de la fixation d'O₂ à l'activité oxygénasique de la RUBISCO chez les plantes C₃. Chez l'ananas, les différents tests précédents montrent que cette capacité n'est que partielle. Cette différence pourrait, comme nous l'avons évoqué, être attribuable à la présence de processus de fixation d'O₂ autres que ceux du cycle oxydatif (exemple de la non-répression de U à fort CO₂) ou être la conséquence de capacités photosynthétiques limitées par d'autres facteurs que la photorespiration (exemple de l'effet Warburg faible). Pour préciser ces points, nous avons tenté d'évaluer la proportion

de photoconsommation d'O₂ attribuable à la photorespiration dans le bilan de fixation.

IV.III - Hypothèses sur la nature de la photoconsommation d'O₂, part attribuable à la photorespiration

Placé devant le problème de la détermination de la nature d'un bilan de photoconsommation d'O₂, une méthode possible d'étude consiste, par référence aux propriétés enzymatiques de la RUBISCO, à évaluer la part attribuable à la photorespiration et d'en déduire si d'autres processus de fixation d'O₂ sont nécessaires pour expliquer le bilan des échanges. Nous décrirons dans ce qui suit un modèle biochimique de régulation in vitro des deux activités de la RUBISCO puis nous confronterons les données expérimentales précédentes à ce modèle.

IV.III.1 - Modèle biochimique de régulation des activités enzymatiques de la RUBISCO

a) Régulation des deux activités de la RUBISCO. La ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase-oxygénase initie le cycle photosynthétique de réduction du carbone et celui de la photorespiration (cycle oxydatif). L'importance relative de ces deux cycles, en compétition pour un substrat commun le RUBP, est déterminée par les propriétés carboxylase et oxygénase de l'enzyme et les concentrations d'oxygène et de gaz carbonique selon l'équation (Laing et al., 1974) :

$$\frac{V_o}{V_c} = \frac{V_o \max \times K_c}{V_c \max \times K_o} \times \frac{O}{C}$$

où V_o et V_c : vitesses d'oxygénation et carboxylation de RUBP.

$V_o \text{ max}$ et $V_c \text{ max}$: vitesses maximums d'oxygénation et carboxylation de RUBP.

K_o et K_c : constantes de Michaelis-Menten pour l' O_2 et le CO_2 .

O et C : concentrations d' O_2 et de CO_2 .

Cette équation est vérifiée quelles que soient les concentrations de l'enzyme, son état d'activation, la concentration de RUBP (Jordan et Ogren, 1981).

. Facteur de spécificité de la RUBISCO et principe de la comparaison entre le modèle biochimique et les fixations d' O_2 et CO_2 déterminées in vivo. Dans l'équation précédente, le quotient $(V_{o\text{max}} \times K_c) / (V_{c\text{max}} \times K_o)$ est le facteur de spécificité O_2/CO_2 ($F_s O_2/CO_2$) de la RUBISCO. Les travaux de Jordan et Ogren (1983) ont montré la constance de sa valeur chez le type photosynthétique C_3 ou C_4 . En conséquence, la variation de V_o/V_c en fonction du rapport des concentrations oxygène/gaz carbonique peut être assimilée à une droite passant par l'origine dont la pente est le facteur de spécificité :

$$\frac{V_o}{V_c} = F_s O_2/CO_2 \times \frac{O}{C} \quad (7)$$

Poursuivant ce raisonnement, la seule connaissance de $F_s O_2/CO_2$ et des concentrations d' O_2 et CO_2 permet de calculer le rapport des échanges photorespiration/photosynthèse. Une méthode possible pour étudier la nature de la fixation d' O_2 sous lumière consiste alors à :

- . Evaluer par référence aux propriétés in vitro de la RUBISCO le facteur de spécificité in vivo.
- . En déduire, connaissant les concentrations d' O_2 et CO_2 , la valeur "théorique" du rapport carboxylation/oxygénation du RUBP.

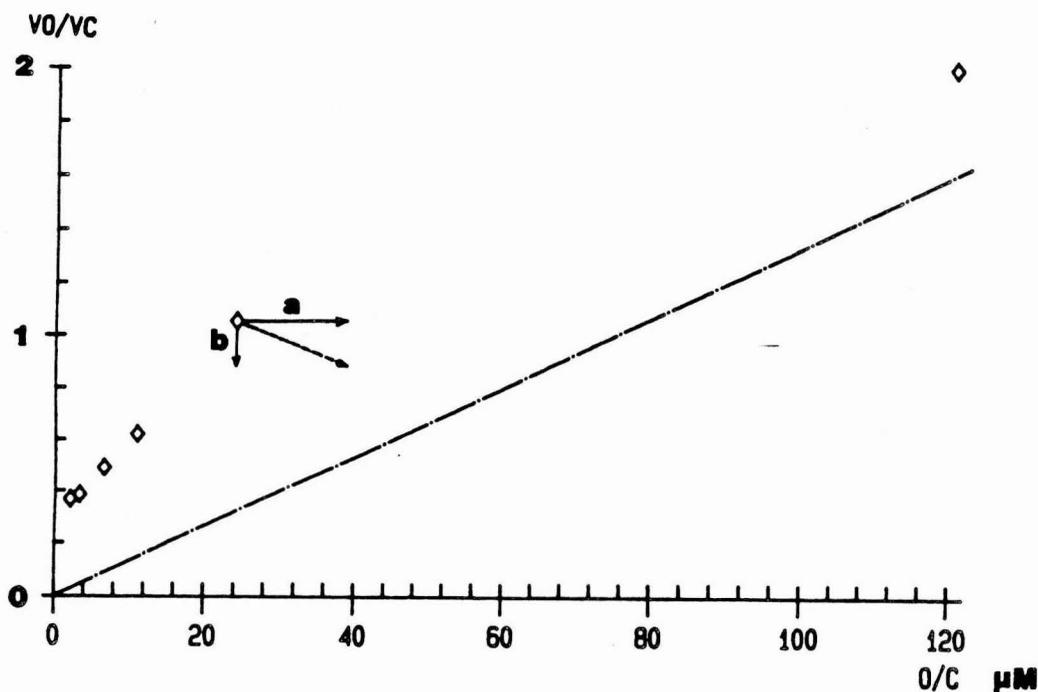


Figure 39 : Evolution du rapport des activités oxygénase et carboxylase de la RUBISCO en fonction du rapport des concentrations d'O₂ et de CO₂. Comparaison entre valeurs théoriques (prédites par les propriétés in vitro de l'enzyme) et expérimentales (calculées à partir des échanges gazeux chez un vitroplant d'ananas. VO, VC : vitesse d'oxygénation, carboxylation du RUBP ; O, C : concentrations d'O₂ et de CO₂ ; (- - -) : droite théorique de pente égale au facteur de spécificité ; (◇) : rapport expérimental VO/VC calculé à partir des échanges gazeux (calcul 1, voir texte) ; a : modification du rapport O/C expérimental lorsqu'il est calculé en tenant compte du gradient de concentration de CO₂ entre atmosphère et cavité sous-stomatique (calcul 2) ; b : modification du rapport VO/VC expérimentale en tenant compte de la persistance sous lumière d'une respiration mitochondriale d'amplitude égale à la respiration nocturne (calcul 3).

- . Comparer ce rapport "théorique" avec le rapport "expérimental" calculé à partir des mesures de fixation d'O₂ et CO₂ et la stoichiométrie des réactions de la photorespiration.
- . En déduire la part de fixation d'O₂ compatible avec l'activité du cycle oxydatif, celle attribuable aux autres réactions connues d'oxygénation.
- . Choix de la valeur du facteur de spécificité in vivo. Badger et al. (1974) ont déterminé que les caractéristiques enzymatiques carboxylase et oxygénase de la RUBISCO de Kalanchoe daigremontiana étaient voisines de celles de plantes de type C₃. Par référence à ces travaux, nous considèrerons en première approximation que le facteur de spécificité O₂/CO₂ de l'ananas est comparable à celui des plantes mésophytiques. Fs O₂/CO₂ varie essentiellement avec la température (Jordan et Ogren, 1984). Nous avons utilisé les données de ces auteurs pour choisir la valeur du facteur de spécificité retenue pour notre étude (soit Fs O₂/CO₂ = 1/75 pour une température foliaire de 29°5).

La représentation graphique de la régulation des activités enzymatiques de la RUBISCO est donnée dans la figure 39. Dans le rapport O₂/CO₂ les conditions sont exprimées en μM. Ce rapport tient compte de la solubilité différentielle de ces 2 gaz en fonction de la température (Ku et Edwards, 1977).

b) Evaluation des vitesses d'oxygénation (V_o) et carboxylation (V_c) du RUBP à partir des échanges gazeux

Différentes hypothèses de calcul peuvent être retenues pour évaluer à partir des mesures de photoconsommation d'O₂ et de fixation nette de CO₂ le flux de carboxylation et oxygénation du RUBP. Nous les décrirons successivement avant de présenter les résultats.

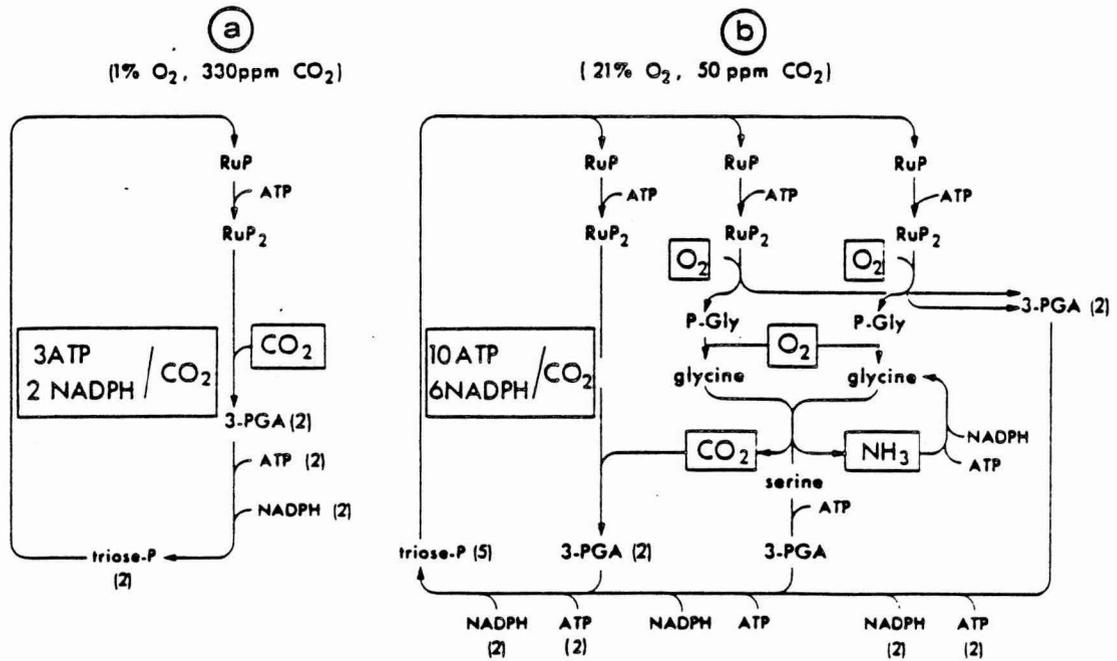


Figure 40 : Bilan énergétique de la fixation de CO₂ dans le cycle photosynthétique. a : en absence de photorespiration, b : au point de compensation de CO₂ (d'après Osmond, 1981).

Calcul 1 : Evaluation de V_o et V_c à partir des données expérimentales brutes

Si l'ensemble de la photoconsommation d' O_2 a pour origine l'activité du cycle photorespiratoire, cette fixation sera telle que :

$$U = V_o + \frac{V_o}{2} \quad (8)$$

Cette équation rend compte de la stoichiométrie la plus couramment admise du bilan de consommation d' O_2 dans le cycle oxydatif (fig. 40) (Osmond, 1981 ; Ogren, 1984 ; Badger, 1985). Elle considère que pour chaque fixation d'une mole d' O_2 au niveau du RUBP (V_o), une demi-mole d' O_2 sera fixée dans la réaction d'oxydoréduction du glycolate en glyoxylate ($V_o/2$). Dans la suite de cet exposé, nous appellerons flux photorespiratoire la somme $V_o + V_o/2$. Poursuivant le raisonnement précédent, le bilan de carboxylation de RUBP sera tel que :

$$V_c = PC + \frac{V_o}{2} \quad (9)$$

où PC est la fixation nette de CO_2 , $\frac{V_o}{2}$ le CO_2 d'origine photorespiratoire issu de la réduction de la glycine en sérine (fig. 40).

Dans l'hypothèse du calcul 1, le flux photorespiratoire $U_1 = V_o + V_o/2$ peut donc être déterminé par la résolution du système d'équations 7 et 9. Le rapport U_1/U mesuré évaluera, dans le bilan total de fixation d' O_2 , la part attribuable à l'activité du cycle photorespiratoire.

Calcul 2 : Evaluation de la concentration sous-stomatique de CO₂

Dans l'hypothèse précédente, la valeur théorique du rapport Vo/Vc est calculée à partir du rapport des concentrations externes d'oxygène et gaz carbonique. Cependant, liées à la résistance à la diffusion gazeuse de l'atmosphère au chloroplaste, les concentrations d'O₂ et CO₂ à proximité de la RUBISCO sont respectivement supérieures et inférieures aux concentrations externes de ces deux gaz. Dans le cas de l'oxygène, comme nous l'avons indiqué dans le chapitre précédent, le gradient de concentration atmosphère-feuille est faible, même en cas de résistance stomatique élevée. Pour le CO₂ par contre, compte-tenu de sa faible concentration dans l'air, les différentes résistances à la diffusion modifient ce gradient. Si aucune méthode directe ne permet à l'heure actuelle de déterminer la concentration intracellulaire de CO₂, on peut cependant évaluer le gradient de concentration de CO₂ entre l'atmosphère et la cavité sous-stomatique (ΔCO_2) à l'aide des systèmes d'équation 5 et 6 présentés dans le chapitre I :

$$\Delta \text{CO}_2 = \frac{T \times \Delta w}{1,6 \times P}$$

Pour le calcul de Δw , différence de gradient de concentration de vapeur d'eau entre la feuille et l'atmosphère, les hypothèses et mesures suivantes ont été faites : au site d'évaporation de la feuille, l'atmosphère est supposée être saturée en vapeur d'eau ; sa température a été évaluée par mesure à l'aide d'un thermocouple placé sous la feuille médiane du plant. Nous avons supposé que cette mesure était représentative pour l'ensemble des parties aériennes. Cette mesure permet d'approcher la valeur réelle du rapport intracellulaire O₂/CO₂. Dans l'hypothèse du calcul 2, le système d'équation pour évaluer le flux photorespiratoire est équivalent à celui du calcul 1. La valeur théorique Vo/Vc est cependant calculée à l'aide du rapport des concentrations (oxygène externe)/(CO₂ sous-stomatique).

Calcul 3 : Evaluation de V_o et V_c en présence d'une respiration de type mitochondriale sous lumière

En présence d'une respiration mitochondriale maintenue sous lumière (RD), le calcul de V_o et V_c est modifié. En estimant que le quotient respiratoire de cette respiration est proche de 1, les équations 8 et 9 deviennent :

$$U_3 = V_o + \frac{V_o}{2} + RD \quad (10)$$

$$V_c = P + \frac{V_o}{2} + RD \quad (11)$$

L'amplitude de la respiration mitochondriale maintenue sous lumière ne peut être évaluée que par détermination indirecte. Par comparaison du point de compensation de CO_2 théorique prédit par l'équation (7) et celui observé in vivo, Brooks et Farquhar (1985) ont conclu que chez des feuilles de plante C_3 elle ne représente qu'une fraction de la respiration nocturne. Sur l'ensemble des parties aériennes du blé incluant des parties non chlorophylliennes, Gerbaud et André (1980) ont estimé que l'amplitude de cette respiration pouvait être équivalente à celle de la respiration nocturne. Dans le cas de l'ananas, déterminée au point de compensation de CO_2 par le système des équations (7) et (11), l'amplitude de RD serait voisine de 0,8 R_0 . Par extrapolation à éclairement nul ou concentration d'oxygène nulle de la courbe de réponse de fixation d' O_2 à ces deux paramètres (fig. 36, 38), méthode possible d'évaluation de RD (Gerbaud, et André, 1980), des valeurs de respiration mitochondriale supérieures à R_0 sont déduites. Ces estimations rendent compte de la respiration des tissus non chlorophylliens et chlorophylliens. Dans nos calculs, nous avons retenu une hypothèse inférieure ($RD = R_0$) et une hypothèse supérieure ($RD = 2R_0$). Pour la détermination du flux photorespiratoire en présence d'une respiration mitochondriale, le rapport

**NATURE POSSIBLE DE LA FIXATION D'O₂ SOUS LUMIERE
EN CONDITIONS STANDARD (% DE LA FIXATION TOTALE)**

						1			2			3
Référence figure	C _i (μl/l)	Calcul 1	Calcul 2	Calcul 3 (R ₀)	Calcul 3 (2R ₀)				R ₀	Hypothèse R ₀	Hypothèse 2R ₀	
41	193	18,4	32,2	50,1	62				9,7	28,2	18,5	
42	202	17,3	31,6	41	50,3				8,9	40,8	31,9	
43	160	15,5	42,2	56	69,6				9,4	20,9	11,5	

Tableau VI : Nature possible de la fixation d'O₂ sous lumière en conditions standard. (Hypothèses de calcul : voir texte ; C_i = concentration sous-stomatique de CO₂ calculée par les lois de diffusion gazeuse)

- 1 :** Fixation d'O₂ explicable par l'activité du cycle photorespiratoire
- 2 :** Fixation d'O₂ explicable par la persistance d'une respiration mitochondriale d'amplitude égale à R₀
- 3 :** Fixation d'O₂ non expliquée (compte tenu d'une respiration mitochondriale égale à R₀ ou 2R₀)

des concentrations (O_2)/(CO_2 sous stomatique) a été utilisé.

Expression des résultats : La part de la fixation d' O_2 compatible avec l'activité du cycle photorespiratoire a été successivement déterminée par les calculs 1, 2 et 3 (pour les points expérimentaux des "effets" intensité lumineuse, CO_2 et O_2 de la plante 1, (fig. 35, 36, 38)). Les résultats ont été exprimés en pourcentage relatif pour les conditions standard (tableau VI) et en valeur absolue (fig. 41, 42, 43) de la fixation totale d' O_2 .

IV.III.2 - Nature possible de la photoconsommation d' O_2

a) Fixation d' O_2 compatible avec la photorespiration en conditions standard. En appliquant de façon successive les calculs 1, 2 et 3 précédemment décrits, on estime la part potentielle que représente le cycle photorespiratoire dans le bilan de fixation d' O_2 . En conditions standard de mesure (concentration de CO_2 = 340 $\mu l/l$; concentration d' O_2 = 21 %, éclaircissement = 690 $\mu mol/m^2/s$), ce flux déterminé par le calcul 1 représente moins de 20 % de la fixation totale d' O_2 dans les différentes déterminations réalisées (tableau VI). Ce pourcentage est cependant augmenté si l'on considère d'une part l'influence de la résistance à la diffusion gazeuse, d'autre part celle de la présence d'une respiration mitochondriale.

Malgré les faibles valeurs de la photosynthèse, la résistance à la diffusion gazeuse conduit à un gradient relativement élevé de CO_2 entre l'atmosphère et la feuille. Les concentrations de CO_2 sous-stomatiques calculées sont souvent inférieures à 200 $\mu l/l$ en conditions standard. Par comparaison, une concentration de 230 $\mu l/l$ (pour une concentration externe de 340 $\mu l/l$) est rapportée pour les plantes C_3 (Farquhar et al., 1980). En tenant compte

de ces concentrations, le calcul 2 indique que 30 % au moins du bilan total de fixation d'oxygène sont compatibles avec l'activité du cycle photorespiratoire (tableau VI).

En présence d'une respiration mitochondriale, le flux net de fixation de CO_2 représente une partie seulement du bilan total de carboxylation du RUBP (V_c). Pour rendre compte du rapport V_o/V_c prédit par les propriétés de la RUBISCO, il est nécessaire "d'augmenter" la valeur de V_o . La part de la fixation d' O_2 attribuable à l'activité du cycle photorespiratoire s'accroît donc en présence d'une respiration mitochondriale. Le calcul 3 indique que pour une amplitude de respiration comprise entre R_0 et $2R_0$, la photorespiration représenterait de 40 à 70 % du bilan de fixation.

b) Bilan de fixation d' O_2 en conditions standard. Une respiration mitochondriale comprise entre R_0 et $2R_0$ représente de 9 à 20 % de la fixation totale d' O_2 sous lumière (tableau VI). Au bilan, la photorespiration et la persistance d'une respiration sous lumière peuvent rendre compte d'au moins 60 % du bilan de photoconsommation d' O_2 mesuré. Les calculs et hypothèses qui précèdent, pour imparfaits qu'ils soient, constituent une base quantitative qui permet d'émettre une hypothèse sur la valeur élevée du rapport (fixation d' O_2 /fixation de CO_2) observée chez l'ananas pendant la phase IV :

- . De faibles concentrations de CO_2 interne dues à des résistances stomatiques élevées favorisent l'activité oxygénasique de la RUBISCO.
- . La persistance d'une respiration mitochondriale sous lumière favorise l'expression d'un rapport élevé de fixation d' O_2 /fixation nette de CO_2 , en augmentant dans ce quotient la valeur du numérateur et en diminuant celle du dénominateur. Cette action est d'autant plus sensible chez l'ananas que l'amplitude d'une respiration mitochondriale voisine de celle de la respiration nocturne n'est pas négligeable comparée aux faibles fixations de CO_2 .

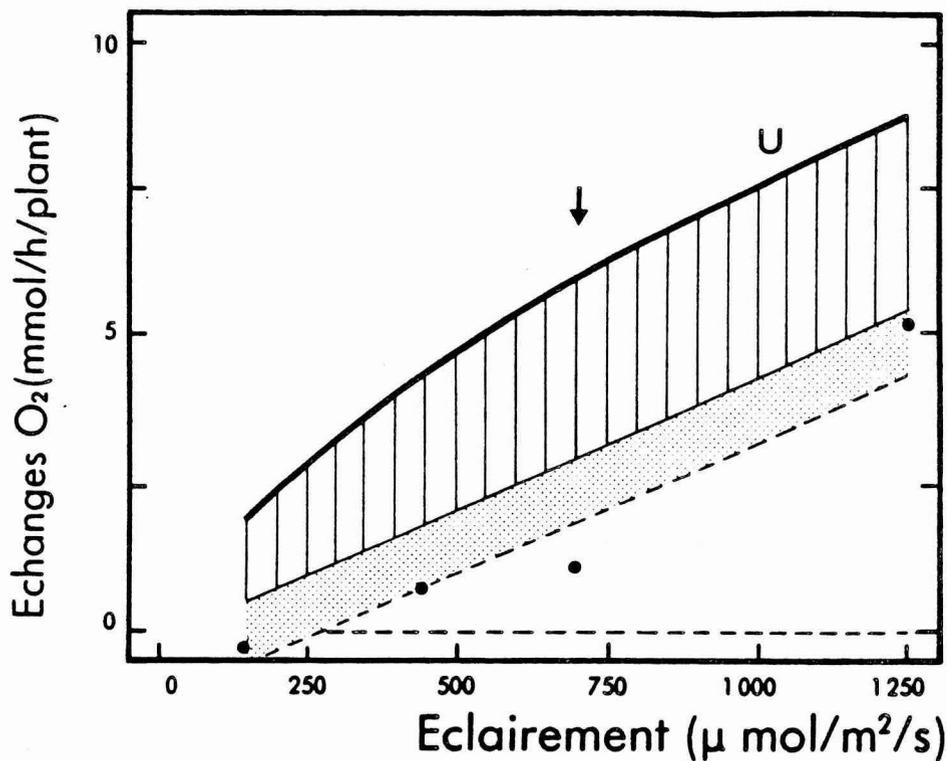


Figure 41 : Hypothèses sur la nature de la fixation d'O₂ sous lumière. Evaluation au cours d'un effet de variation de l'éclairement chez un vitroplant d'ananas placé sous éclairement continu. () : fixation d'O₂ explicable par l'activité du cycle photorespiratoire (détails de l'évaluation dans le texte) ; () : fixation d'O₂ explicable par une respiration mitochondriale d'amplitude égale à deux fois la respiration nocturne ; () : fixation d'O₂ non explicable par les deux processus précédents ; (●) : points expérimentaux du calcul de la fixation d'O₂ non expliquée. La flèche indique les conditions standard de mesure.

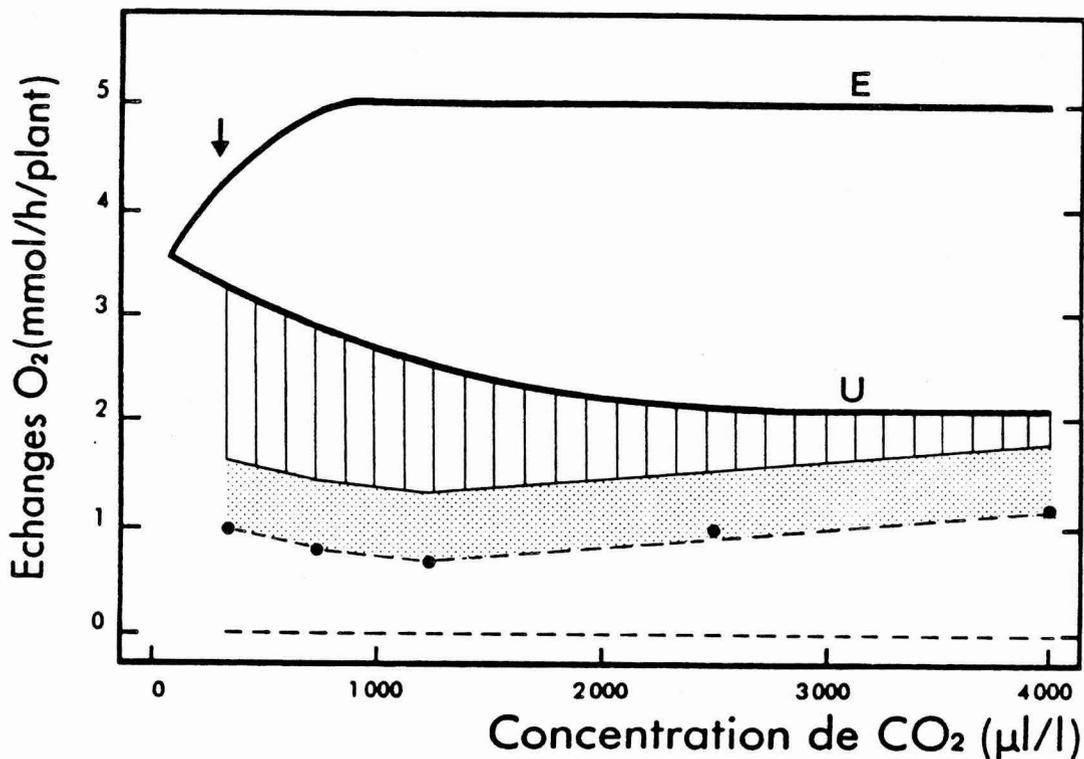


Figure 42 : Hypothèses sur la nature de la fixation d'O₂ sous lumière. Evaluation au cours d'un effet de variation de la concentration de CO₂ chez un vitroplant d'ananas placé sous un éclairement continu. Légendes identiques à la figure 41.

A l'issue de ces déterminations et compte tenu des hypothèses émises, une partie de la fixation d'O₂ ne peut être explicable par la photorespiration et la persistance d'une respiration mitochondriale. La suite de cet exposé décrit ses caractéristiques.

c) Caractéristiques de la fixation d'O₂ non explicable par la photorespiration et une respiration mitochondriale maintenue sous lumière

. Fixation d'O₂ non expliquée à faible éclairement, concentration de CO₂ et d'O₂. Pour les plus faibles éclairagements et concentrations de CO₂ et d'O₂ la photorespiration et une respiration mitochondriale d'amplitude égale à 2R₀ permettent de rendre compte de la majeure partie du bilan de fixation d'O₂ (fig. 41, 42, 43). En conditions standard, la part de U "non expliquée" représente sur la moyenne de 3 déterminations de 20 % (hypothèse RD = 2R₀) à plus de 30 % (hypothèse RD = R₀) de la fixation d'oxygène. Chez le blé, la photoconsommation d'O₂ non compatible avec l'activité du cycle oxydatif et la persistance d'une respiration mitochondriale d'amplitude égale à la respiration nocturne serait négligeable comparée au bilan de fixation (André et Massimino, étude en cours). Des études similaires chez d'autres végétaux sont cependant nécessaires pour confirmer (en valeur relative comme en valeur absolue) l'importance de la fixation d'O₂ non expliquée chez l'ananas par rapport aux plantes C₃.

. Fixation d'O₂ non expliquée à fort éclairement, concentrations de CO₂ et d'O₂ élevées. Lorsqu'augmentent l'éclairement, la concentration d'O₂ et dans une moindre mesure celle de CO₂, une part de plus en plus importante du bilan de fixation d'O₂ devient inexplicable par la photorespiration et une respiration mitochondriale d'amplitude égale à 2R₀. En gardant à l'esprit que ces observations sont déduites d'un modèle biochimique, par définition

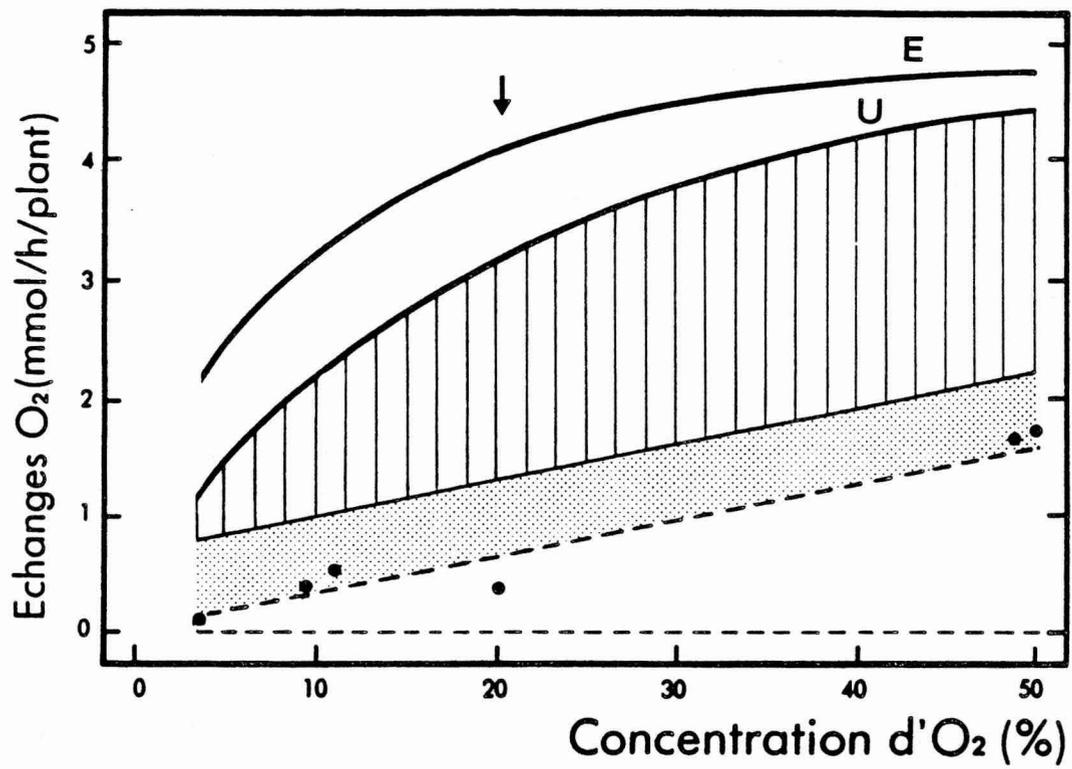


Figure 43 : Hypothèses sur la nature de la fixation d'O₂ sous lumière. Evaluation au cours d'un effet de variation de la concentration d'O₂ chez un vitroplant d'ananas placé sous un éclairage continu. Légendes identiques à la figure 41.

simplificateur, nous discuterons l'origine possible de cette fixation.

Deux types de réactions pourraient rendre compte de la fixation d'O₂ non expliquée : une respiration mitochondriale d'amplitude supérieure à 2R₀ et/ou des réductions directes d'O₂ au niveau des photosystèmes (réactions de type Mehler). Du strict point de vue du modèle biochimique, la première hypothèse ne peut être exclue. Nous pensons cependant qu'elle joue un rôle limité dans le bilan de fixation d'O₂ non expliquée. Gans et Rébeillé (1987) ont en effet récemment mis en évidence chez un mutant de Chlamydomonas déficient en RUBISCO, une inhibition de la respiration mitochondriale sous lumière. Des observations semblables ont été réalisées par Bate et al. (1987) chez Dunaliella tertiolecta. Il semble également peu probable qu'une respiration mitochondriale puisse être "stimulée" en présence d'une activité RUBP-oxygénase élevée (cas des fortes concentrations d'O₂). Dans ces conditions en effet, la glycine, substrat préférentiel de respiration pour les mitochondries (Walker et al., 1982) est déjà produite à un rythme important par le cycle photo-respiratoire.

A l'issue des différentes hypothèses émises, la présence d'oxydations membranaires de type Mehler est une alternative possible pour expliquer la totalité du bilan de fixation d'O₂ mesurée. A l'appui de cette proposition rappelons que la répression de la fixation d'O₂ est incomplète à CO₂ saturant chez l'ananas. L'augmentation de la fixation d'O₂ non expliquée sous fort éclairage peut également s'accorder à la présence de réactions de type Mehler. In vitro en effet, les travaux de Furbank et Badger (1983), Furbank et al. (1983) indiquent que la photoréduction d'O₂ est (par l'intermédiaire de la disponibilité de NADP) en compétition avec la photosynthèse et la photo-respiration pour l'utilisation de l'énergie photochimique. Lorsque, sous fort éclairage, cette énergie n'est plus limitante, des conditions favorables sont donc réunies pour que s'expriment des oxydations membranaires.

Cependant les résultats présentés sur la figure 43 indiquent que la fixation d'O₂ "non expliquée" est un phénomène oxygène-dépendant quelque soit les concentrations d'O₂ étudiées. Cette observation est incompatible avec les valeurs du Km(O₂) de l'ordre de quelques pour-cent d'oxygène généralement rapportées in vitro pour les réactions Mehler (Osmond, 1981). Précisons toutefois que Furbank et al. (1983) ont montré sur chloroplastes de cellule du mésophylle de plantes C₄, que ce type de réaction n'est pas toujours saturé à plus de 21 % d'O₂. Le terme "réactions de Mehler" pourrait regrouper des processus de fixation d'O₂ présentant des affinités différentes pour l'oxygène.

d) Discussion des hypothèses de calcul

L'interprétation de la nature des processus impliqués dans la fixation d'O₂ chez l'ananas est fondée sur deux principales hypothèses dont nous discuterons ici les limites de validité.

Choix du facteur de spécificité in vivo. Le choix du facteur de spécificité est discutable sur deux principaux points : l'extrapolation in vivo de caractéristiques enzymatiques déterminées in vitro et sa valeur considérée égale à celle des plantes C₃. A notre connaissance, on ne connaît pas, in vivo, de processus capable de réguler une des deux activités de la RUBISCO et donc de modifier la valeur du facteur de spécificité. Notons également que chez le blé, le facteur de spécificité mesuré in vitro permet de rendre compte en grande partie de la stoechiométrie de la fixation d'O₂ in vivo (André et Massimino, étude en cours). Précisons cependant que la constance du facteur de spécificité chez le type photosynthétique C₃ est remise en question par les travaux de Just (1985), Ranty et al. (en préparation) qui

ont déterminé pour le tournesol un facteur de spécificité O_2/CO_2 inférieur à celui classiquement rapporté pour les plantes C_3 . Concernant le second point, il est évident que la validation des hypothèses émises passe par une étude des caractéristiques enzymatiques de la RUBISCO des plantes à métabolisme CAM.

Calcul de la concentration interne de CO_2 . Calculées par référence aux lois de la diffusion gazeuse, les valeurs moyennes de concentration sous-stomatique de CO_2 sont, en conditions standard, comparables à celles déterminées pendant la phase IV chez le genre Kalanchoe (Winter, 1980 ; Holthum et al., 1983). Si chez les plantes C_3 , la concentration sous-stomatique est peu différente de celle présente au site de carboxylation (Sharkey et al., 1982), chez l'ananas et les plantes CAM en général, l'épais mésophylle pourrait être responsable d'une résistance à la diffusion de CO_2 supplémentaire non négligeable. Rappelons à l'appui de cette hypothèse, que la limitation de la photosynthèse par la résistance à la diffusion, déterminée par l'émission nette d' O_2 , dépassait 60 %. Dans cette optique, la photorespiration serait susceptible de rendre compte d'une part plus importante du bilan de photoconsommation d' O_2 . Avec une meilleure connaissance des caractéristiques de la RUBISCO des plantes CAM, la vérification de cette hypothèse est nécessaire à la poursuite de l'étude de la nature de la fixation d' O_2 chez l'ananas.

IV.IV - Conclusions

La fixation d' O_2 sous lumière des parties aériennes de vitroplant d'ananas se distingue de celles du type photosynthétique C_3 par deux principales caractéristiques :

- . Son amplitude est variable au cours des 3 phases diurnes du métabolisme CAM. Les plus faibles valeurs de fixation sont atteintes pendant la première partie du jour, elles augmentent ensuite progressivement et sont maximales vers le milieu de la phase IV.

. Au cours de la deuxième partie du jour, l'amplitude de la fixation est élevée comparée aux échanges photosynthétiques nets de CO_2 et O_2 . Le rapport photoconsommation d' O_2 /photosynthèse atteint souvent des valeurs proches de 3 pendant l'étape de fixation de type C_3 de la phase IV. Près des trois quarts de l'énergie photochimique sont ainsi utilisés par des processus de réduction d'oxygène pendant cette période.

Une limitation de l'activité oxygénasique de la RUBISCO consécutive à l'augmentation de la concentration interne de CO_2 lors de la décarboxylation du malate est l'origine principale de la faible fixation d' O_2 pendant la première partie du jour.

Etudiée chez des plants placés sous éclairage continu pour maintenir une fixation photosynthétique de type C_3 d'amplitude comparable à celle de la phase IV, la fixation d' O_2 présente les caractéristiques suivantes. C'est un processus photodépendant non saturé à plus de $1200 \mu\text{moles photons/m}^2/\text{s}$. Sa réponse à des variations de concentration de CO_2 ou d' O_2 se distingue principalement de celle du type photosynthétique C_3 par l'absence "d'effet miroir" strict entre fixation de CO_2 et d' O_2 .

Par référence aux propriétés enzymatiques rapportées *in vitro* pour la RUBISCO, nous avons tenté d'évaluer la nature possible des processus impliqués dans la fixation d' O_2 . Selon ces hypothèses, en conditions standard de mesure, la photorespiration et la présence d'une respiration mitochondriale (d'amplitude comprise entre 1 à 2 fois celle de la respiration nocturne) sont capables de rendre compte jusqu'à près des deux tiers du bilan total de fixation d' O_2 . Le rapport élevé photoconsommation d' O_2 /photosynthèse observée pourrait alors s'expliquer en grande partie par une activité oxygénasique de la RUBISCO (et cycle oxydatif) stimulée par de faibles concentrations internes de CO_2 consécutives à une résistance à la diffusion gazeuse importante et la présence d'une respiration mitochondriale dont l'amplitude n'est pas négligeable

comparée à celles des échanges photosynthétiques. La part de la fixation d'O₂ non explicable par les deux processus précédents augmente avec l'intensité de l'éclairement et la concentration d'O₂. Une hypothèse pour expliquer cette fixation est la présence de réactions d'oxydations membranaires de type Mehler chez l'ananas.

Parmi les fonctions possibles proposées pour la photorespiration (et les fixations d'O₂ sous lumière en général), le rôle protecteur qu'elle jouerait face à des situations de photoinhibition est souvent évoqué. L'énergie photochimique produite dans les photosystèmes est en effet susceptible de causer des dommages aux membranes chloroplastiques lorsqu'elle ne peut pas être consommée dans le cycle photosynthétique et photorespiratoire (Powles et Osmond, 1978). Dans cette optique, la fixation d'O₂ constituerait une "échappatoire" à l'excès de pouvoir réducteur produit. A l'appui de cette hypothèse, André (1986) rapporte que les capacités de fixation d'O₂ sont de façon générale élevées chez les végétaux occupant des biotopes où les capacités de production d'énergie photochimique dépassent fréquemment celles de sa consommation dans le cycle photosynthétique (exemple des habitats à éclairement élevé et disponibilité en eau réduite). La vérification expérimentale du rôle protecteur que jouerait la photorespiration reste cependant incertaine (Osmond, 1981). Compte tenu de l'importance de la fixation d'O₂ chez l'ananas pendant la phase IV, une partie de ce travail a été consacrée à l'étude de cette hypothèse. Le protocole d'étude retenu consistait, pour une assimilation de CO₂ égale et une amplitude de fixation d'O₂ variable, à comparer chez des vitroplants les capacités photosynthétiques avant et après exposition du plant à plusieurs heures d'éclairement d'intensité supérieure à 1500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Les résultats obtenus ont montré qu'en présence de photorespiration (21 % d'O₂) ou dans des conditions de fixation d'O₂ limitée (3 % d'O₂) les capacités photosynthétiques sont peu affectées après des trai-

tements à forte intensité lumineuse. Ces observations indiquent l'absence de photoinhibition en présence ou en absence de photorespiration. Sans tirer de conclusions définitives de tels tests, il semble nécessaire pour comprendre les stratégies qu'utilisent les végétaux face à des situations de photoinhibition potentielle de mieux connaître les possibilités de régulation du flux électronique au niveau des photosystèmes.

CONCLUSIONS GENERALES

Au terme de cette étude, quelques caractéristiques photosynthétiques et photorespiratoires de l'ananas peuvent être précisées :

- . Placés dans des conditions climatiques voisines de celles du champ, les ananas issus de rejet fixent le CO_2 principalement en phase nocturne. Les capacités de fixation de CO_2 de cette plante sont faibles en valeur absolue, 4 à 5 fois inférieures à celles du blé à l'échelle d'un couvert végétal. En contrepartie son efficacité de l'eau est élevée, plus de 3 fois supérieure à celle du blé. Le type photosynthétique de plants d'ananas issus de culture in vitro évolue en quelques mois d'une fixation essentiellement diurne, à capacités de fixation de CO_2 réduites par rapport aux plantes C_3 , vers un métabolisme CAM d'intensité comparable à celle d'ananas issus de rejets.
- . La comparaison des échanges nets d' O_2 et CO_2 est un moyen de préciser et de quantifier les différentes phases d'activité du cycle photosynthétique CAM. La refixation par la RUBISCO du CO_2 "interne" libéré par la décarboxylation du malate a lieu pendant les 3 phases diurnes de ce cycle mais intervient principalement pendant la phase III et le tout début de la phase IV. Pendant ces deux périodes, l'amplitude de l'assimilation est plusieurs fois supérieure à celle de la fixation maximum de CO_2 "externe" au cours de la phase IV. Cette observation confirme l'existence d'une augmentation de concentration interne de CO_2 accompagnant l'étape de décarboxylation du malate-refixation du CO_2 par la RUBISCO. Quand le pool de malate est complètement épuisé, la fixation de CO_2 est transitoirement (pendant 1 à 2 heures) de type purement C_3 . A l'aide des lois de la diffusion gazeuse, nous avons évalué qu'au cours de cette période la photosynthèse est diminuée

de près de 60 % par les résistances à la diffusion de CO_2 . En fin de phase diurne le quotient photosynthétique (O_2 émis/ CO_2 fixé), inférieur à 1, témoigne d'une synthèse de malate anticipant celle de la nuit. Cette observation confirme l'activité possible de la PEP-case en fin de jour chez les plantes CAM et permet de la quantifier : au cours de la dernière heure du jour, près de la moitié du CO_2 peut être fixé par cette enzyme plutôt que par la RUBISCO.

. La fixation d' O_2 sous lumière présente deux caractéristiques : un rythme (faible valeur de fixation pendant la première partie du jour) ; une amplitude élevée, comparativement aux échanges photosynthétiques nets de CO_2 et O_2 , pendant la deuxième partie de la phase diurne. La plus faible valeur de la fixation d' O_2 de la première partie de la phase diurne est principalement due à une diminution de l'activité du cycle photo-respiratoire consécutive à l'augmentation de la concentration interne de CO_2 précédemment décrite. La possibilité de limiter l'amplitude du rythme de fixation d' O_2 en augmentant la concentration externe de CO_2 confirme cette interprétation. La nature précise des processus impliqués dans la photoconsommation d' O_2 reste incertaine. L'importance du rapport fixation d' O_2 /photosynthèse pendant la seconde partie du jour, de l'ordre de 3, pourrait cependant en grande partie être expliqué par les caractéristiques photosynthétiques du métabolisme CAM. L'activité oxygénasique de la RUBISCO serait, pendant la deuxième partie du jour, favorisée par une faible concentration interne de CO_2 due à une résistance à la diffusion gazeuse élevée ; comparée aux faibles échanges photosynthétiques, la persistance sous lumière d'une respiration mitochondriale d'amplitude voisine de celle de la respiration nocturne contribuerait à augmenter le rapport fixation d' O_2 /photosynthèse. Le potentiel de

production d'énergie photochimique (identifié à l'émission brute d'O₂) reste pratiquement stable sur l'ensemble de la phase diurne. C'est surtout la photosynthèse qui utilise cette énergie pendant la première partie du jour ; à l'inverse, les processus de fixation d'O₂ en consomment près des 3/4 au cours de la seconde partie de la phase diurne.

La potentialité de substitution de la réduction du CO₂ par celle de l'oxygène , l'effet miroir, est bien connue chez les plantes C₃ (Radmer et Kok, 1976 ; Gerbaud et André, 1980). Son intervention en conditions naturelles n'est démontrée actuellement que dans quelques situations (territoirement, par exemple, pendant un stress hydrique, Thomas et André, 1982 ; Just et Renou, étude en cours). Chez l'ananas, la fluctuation de la teneur de CO₂ interne fait intervenir quotidiennement cette alternance entre réduction de CO₂ et d'O₂ ce qui conduit à une activité relativement constante des photosystèmes. Ces observations sont-elles l'indice d'un rôle "utile" de la fixation d'O₂ sous lumière dans le maintien de l'activité de la phase photochimique de la photosynthèse ? Les éléments de réponse à ce débat classique chez l'ensemble des végétaux passe par l'étude in vivo et in vitro de la physiologie de la photorespiration et celle des possibilités de régulation du transport des électrons au niveau des membranes chloroplastiques.

Les plantes CAM privilégient l'économie de l'eau par rapport aux performances photosynthétiques, leur utilisation dans la valorisation de milieux semi-arides, de plus en plus étendus, pourrait se développer. Est-il cependant envisageable chez l'ananas en conditions de culture irriguée d'améliorer

le rendement de la photosynthèse ? Compte tenu des connaissances actuelles sur le métabolisme CAM et des observations réalisées dans cette étude, on peut, d'un point de vue théorique, évaluer cette possibilité.

Notons tout d'abord qu'une diminution de l'intensité du métabolisme CAM (du pourcentage de la fixation nocturne de CO_2) ne serait probablement pas synonyme d'une évolution vers des performances photosynthétiques voisines de celles du type C_3 . Comme le montre l'évolution de la photosynthèse au cours du développement d'ananas issus de culture in vitro, le bilan de la fixation nette de CO_2 (sur l'ensemble de la photopériode et exprimé par unité de surface foliaire) reste comparable quelle que soit l'importance de la fixation nocturne de CO_2 . Cette observation témoigne des faibles capacités intrinsèques de la fixation diurne de CO_2 chez l'ananas. Si on envisage d'augmenter les performances photosynthétiques de cette plante, ce n'est probablement pas une diminution de l'intensité du métabolisme CAM qui est à rechercher mais l'augmentation des capacités de fixation diurne de CO_2 .

Chez une plante CAM, les capacités de fixation diurne de CO_2 sont limitées en durée et en amplitude. La limitation en durée est directement liée au métabolisme du malate : lorsque la décarboxylation de ce composé n'alimente plus suffisamment en CO_2 le cycle photosynthétique et que la résistance stomatique à la diffusion diminue, la fixation de CO_2 "externe" peut reprendre. Plus le pool de malate sera rapidement dégradé, plus la fixation de CO_2 débutera tôt. Trois processus imposent une limite à la vitesse de disparition de ce pool : l'efflux de malate depuis la vacuole, sa décarboxylation, la refixation dans le cycle photosynthétique du CO_2 libéré. Dans la régulation de ces 3 étapes, les capacités de refixation de CO_2 par la photosynthèse jouent un rôle majeur (Fischer et Kluge, 1985). On peut penser que de faibles concentrations de RUBISCO, telles que celles déterminées par Winter (1982) chez Kalanchoe pinnata, jouent un rôle clef dans l'économie de l'eau des

plantes CAM en augmentant la durée de la phase III. En poursuivant ce raisonnement, chez un cultivar d'ananas présentant des concentrations de RUBISCO "importantes", la fixation diurne de CO₂ devrait débiter rapidement. Une meilleure connaissance des caractéristiques de la RUBISCO des plantes à métabolisme crassulacéen permettrait de cerner ces possibilités.

La comparaison des échanges nets d'O₂ et CO₂ a permis de mettre en évidence une limitation de la photosynthèse de près de 60 % par la disponibilité du CO₂ au cours de la phase IV chez l'ananas. L'influence respective dans cette limitation de la résistance stomatique et mésophyllienne à la diffusion est à préciser. Quelle qu'en soit l'origine, cette limitation handicape la productivité photosynthétique. Le bilan net de fixation de CO₂ sur 24 heures est par exemple multiplié par 2,4 par rapport à un jour standard lorsque la concentration de CO₂ est augmentée de 340 à 3000 µl/l chez un vitroplant de 4 mois. Remarquons que si les possibilités de réduire cette limitation sont hypothétiques en station agronomique, chez des vitroplants en conditions contrôlées, une augmentation de la concentration de CO₂ de l'atmosphère de croissance pourrait raccourcir le temps de développement avant repiquage au champ.

En résumant, l'ananas "performant" du point de vue photosynthétique serait une plante qui, tout en exploitant ses capacités de prise nocturne de CO₂, réussirait à s'affranchir des contraintes accompagnant le métabolisme CAM en présentant une fixation diurne de CO₂ augmentée en durée et en amplitude. La contrepartie de cet accroissement de la photosynthèse serait une moindre économie de l'eau par la plante. La nature précise des facteurs limitant la fixation diurne de CO₂ (faible teneur de RUBISCO, résistance à la diffusion gazeuse élevée...) et les possibilités de pouvoir diminuer facilement leur seuil par sélection ou mutation restent à définir.

BIBLIOGRAPHIE

Acevedo E, I Badilla, PS Nobel 1983 Water relations, diurnal acidity changes, and productivity of a cultivated cactus, Opuntia ficus-indica. Plant Physiol 72 : 775-780.

Amagasa T 1982 The influence of leaf age on the diurnal changes of malate and starch in the CAM plant Kalanchoe daigremontiana Hamet et Perr. Z Pflanzenphysiol 108 : 93-96.

André M, A Daguinet, D Massimino, J Vivoli, C Richaud 1979a Le Laboratoire C₂3A. Un outil au service de la physiologie de la plante entière I. Les chambres de culture et les systèmes de mesures associés. Ann Agron 30 : 135-151.

André M, A Daguinet, J Massimino, D Massimino, C Richaud 1979b Le Laboratoire C₂3A. Un outil au service de la physiologie de la plante entière II. Possibilités de la mini-informatique et premiers résultats. Ann Agron 30 : 153-166.

André M, DA Thomas, OJ Von Willert, A Gerbaud 1979 Oxygen and carbon dioxide exchanges in crassulacean acid metabolism plants. Plant 147 : 141-144.

André M, A Daguinet, D Massimino, A Gerbaud 1985 The C₂3A system an example of quantitative control of plant growth associated with a data base. In proceeding of the fifteenth intersociety conference on environmental system.

André M 1986 Capacité oxydative et résistance à la sécheresse de différentes plantes supérieures CAM-C₃-C₄ et de végétaux inférieurs Bull Soc Fr 133 lettres Bot 3 : 207-212.

Aubert B, S de Parcevaux 1969 Résistance à la diffusion gazeuse au niveau de l'épiderme foliaire de quelques plantes fruitières tropicales et subtropicales. Fruits 24 : 177-185.

Aubert B 1970 Etude de la résistance à la diffusion gazeuse au niveau de l'épiderme foliaire du bananier (Musa acuminata Colla cv. sinensis) et de l'ananas (Ananas comosus (L.) Merr) en conditions naturelles. Fruits 25 : 495-507.

Badger MR, TJ Andrews, CB Osmond 1974 Detection in C₃, C₄ and CAM plant leaves of a low-K_m (CO₂) form of RUBP carboxylase, having high RUBP oxygenase activity at physiological pH. In M Avron ed, Proceeding of the 3rd International Congress on Photosynthesis, Amsterdam, pp 1421-1429.

Badger MR, DT Canvin 1981 Oxygen uptake during photosynthesis in C₃ and C₄ plants. In G Akoyonoglou ed, Proceeding of the 5th International Congress on Photosynthesis, Philadelphia pp 151-161.

Badger MR 1985 Photosynthetic oxygen exchange. Annu Rev Plant Physiol 36 : 27-53.

Bartholomew D 1982 Environmental control of dry-matter production in pineapple. In IP Ting, M Gibbs eds, Crassulacean acid metabolism. American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp 278-294.

Bartholomew DP, SB Kadzimin 1977 Pineapple. In PT Alvin, TT Kozlowski eds, Ecophysiology of tropical crops. Academic Press, New-York, pp 113-156.

Bate GC, F Dieter, Süttemeyer, HP Fock 1987 Evidences for the inhibition of mitochondrial O₂ uptake in the light in Dunaliella tertiolecta. Résumé présenté au XIV congrès botanique Berlin 24 juillet - 1er Août 1987.

Bierhuizen JF 1976 Irrigation and water use efficiency. In Lange OL, L Kappen, ED Schulze eds, water and plant life. Springer-verlag Berlin Heidelberg New-York, pp 421-431.

Black CC 1973 Photosynthetic carbon fixation in relation to net CO₂ uptake. Annu Rev Plant Physiol 24 : 253-286.

Black CC, NW Carnal, WH Kenyon 1982 COmpartmentation and the regulation of CAM. In IP Ting, M Gibbs eds, Crassulacean acid metabolism. American society of Plant Physiologists, Rockville, pp 51-91.

Brooks A, GD Farquar 1985 Effect of temperature on the CO₂/O₂ specificity factor of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the rate of respiration in the light. Planta 165 :397-406.

Brulfert J, D Guerrier, O Queiroz 1982 Photoperiodism and crassulacean acid metabolism. II Relations between leaf aging and photoperiod in crassulacean acid metabolism induction. *Planta* 154 : 332-338.

Brünnhofer H, H Schaub, K Egle 1968 Der Verlauf des CO₂ und O₂ Gaswechsels bei Bryophyllum daigremontianum in Abhängigkeit von der Temperatur. *Z Pflanzenphysiol* 59 : 285-292.

Buchanan-Bollig IC 1984 Circadian rhythms in Kalanchoe : effects of irradiance and temperature on gas exchange and carbon metabolism. *Planta* 160 : 264-271.

Buchanan-Bollig IC, A Fisher, M Kluge Circadian rhythms in Kalanchoe : the pathway of ¹⁴C₂ fixation during prolonged light. *Planta* 161 : 71-80.

Canvin DT, JA Berry, MR Badger, H Fock, CB Osmond 1980 Oxygen exchange in leaves in the light. *Plant Physiol* 66 : 302-307.

Cockburn W, IP Ting, LO Sternberg 1979 Relationships between stomatal behaviour and internal carbon dioxide concentration in crassulacean acid metabolism plants. *Plant Physiol* 63 : 1029-1032.

Connely PR 1972 The effects of thermoperiod on the carbon dioxide uptake and compensation point of the pineapple plant, *Ananas comosus* (L.) Merr. Thèse Université d'Hawaï, 81 p.

Crews CE, HM Vines, CC Black 1975 Postillumination burst of carbon dioxide in crassulacean acid metabolism plants. *Plant Physiol* 55 : 652-657.

Denius HR, PH Homann 1972 The relation between photosynthesis, respiration and crassulacean acid metabolism in leaf slices of Aloe arborescens Mill. *Plant Physiol* 49 : 873-880.

Dimon B 1977 Contribution à l'étude du métabolisme de l'oxygène au cours de la photorespiration. Thèse d'état, Université de Montpellier, 118 p.

Edwards GE, JG Foster, K Winter 1982 Activity and intracellular compartmentation of enzymes of carbon metabolism in CAM plants in IP Ting, M Gibbs eds, Crassulacean acid metabolism. American Society of plant Physiologists, Rockville, pp 92-111.

Farquhar GD, S Von Caemmerer, JA Berry 1980 A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta* 149 : 78-90.

Farquhar GD, TD Sharkey 1982 Stomatal conductance and photosynthesis. *Ann Rev Plant Physiol* 33 : 317-345.

Fisher A, M Kluge 1985 Light period of crassulacean acid metabolism : control of carbon from malic acid to carbohydrates by CO₂ concentration. *Planta* 63 : 327-331.

Friemert V, M Kluge, JAC Smith 1986 Net CO₂ output by CAM plants in the light : the role of leaf conductance. *Physiol Plantarum* 68 : 353-358.

Furbank RT, MR Badger 1982 Photosynthetic oxygen exchange in attached leaves of C₄ monocotyledones. *Aus J Plant Physiol* 9 : 553-558.

Furbank RT, MR Badger, CB Osmond 1982 Photosynthetic oxygen exchange in isolated cells and chloroplasts of C₃ plants. *Plant Physiol* 70 : 927-931.

Furbank RT, MR Badger 1983 Oxygen exchange associated with electron transport and photophosphorylation in spinach thylakoids. *Biochim. Biophys. Acta* 723 : 400-409.

Furbank RT, MR Badger, CB Osmond 1983 Photoreduction of oxygen in mesophyll chloroplasts of C₄ plants. A model system for studying an in vivo Mehler reaction. *Plant Physiol* 73 : 1038-1041.

Gans P, F Rebeillé 1987 Light inhibition of mitochondrial respiration in a mutant of Chlamydomonas devoid of RUBISCO activity. *Arch Biochem Biophys.*
In press

Gerbaud A, M André 1979 Photosynthesis and photorespiration in whole plants of wheat. *Plant Physiol* 64 : 735-738.

Gerbaud A 1981 Etude par ^{18}O des échanges gazeux de plantes entières. Thèses d'état, Université de Paris sud, 85 p.

Gerbaud A, M André 1980 Effect of CO_2 , O_2 and light on photosynthesis and photorespiration in wheat. *Plant Physiol* 66 : 1032-1036.

Gerbaud A, A Dagueneat 1984 Un système d'arrosage multivoie quantitatif. *Agro-nomie* 4 : 1009-1013.

Gerbaud A, M André 1987 An evaluation of the recycling in measurements of photorespiration. *Plant Physiol* 83 : 933-937.

Gerbaud A, M André, JP Gaudillère 1987 The influence of low oxygen pressure on long term growth and development of wheat. *Physiologia Plantarum*. In press

Gutmann I, AW Wahlefeld 1974 L(-) Malate determination with malate dehydrogenase and NAD. In HV Bermeyer ed, *Methods of enzymatic Analysis* vol 3, Verlag chemie Weinheim, Academic Press. Inc, New York and London pp 1585-1589

Hatch 1975 The C_4 pathway of photosynthesis : mechanism and function. In RH Burris, CC Black eds, CO_2 metabolism and plant productivity. University park press, Baltimore, Londres, Tokyo pp 59-81.

Hoagland DR, DJ Arnon 1950 The water culture method for growing plants without soil. *Calif Agric Exp Stn Circ* 347.

Holthum JAM, MH O'Leary, CB Osmond 1983 Effect of varying partial pressure on photosynthesis and on carbon isotope composition of carbon-4 of malate from the crassulacean acid metabolism plant Kalanchoë daigremontiana Hamet et Perr. 71 : 602-609.

Heller R, 1977 *Physiologie Végétale* tome 1. nutrition, Masson ed, Paris, 239 p.

Jewer PC, TF Neales, LD Incoll 1985 Stomatal responses to carbon dioxide of isolated epidermis from a C_3 plant, the Argentum mutant of Pisum sativum L., and a crassulacean-acid-metabolism plant Kalanchoe daigremontiana Hamet et Perr. *Planta* 164 / 495-500.

Jones MB 1975 The effect of leaf age on leaf resistance and CO₂ exchange of the CAM plant Bryophyllum fedtschenkoï. *Planta* 96 : 183-196.

Jordan DB, WL Ogren 1983 Species variation in kinetic properties of RUBP carboxylase/oxygenase. *Arch Biochem Biophys* 227 : 425-433.

Jordan DB, WL Ogren. The CO₂/O₂ specificity of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. Dependence on ribulose bisphosphate concentration, pH and temperature. *Planta* 161 : 308-313.

Just D 1985 La ribulose bisphosphate carboxylase oxygenase du tournesol : propriétés cinétiques et régulation. Thèse Université de Toulouse, 80 p.

Kaplan A, J Gale, A Poljakoff-Mayber 1976b Resolution of net dark fixation of carbon dioxide into its respiration and gross fixation components in Bryophyllum daigremontianum. *J. Exp. Bot.* 97 : 220-230.

Kaplan A, O Björkman 1980 Ratio of CO₂ uptake to O₂ evolution during photosynthesis in higher plants. *Z Pflanzenphysiol* 96 : 185-188

Kenyon WH, RF Severson, CC Black 1985 Maintenance carbon cycle in crassulacean acid metabolism plant leaves. *Plant Physiol* 77 : 183-189.

Kluge M 1969 Verändliche Markierungsmuster bei ¹⁴CO₂-Fütterung von Bryophyllum tubiflorum zu verschiedenen Zeitpunkten der Hell/Dunkelperiode I. Die ¹⁴CO₂ Fixierung unter Belichtung. *Planta* 88 : 113-129.

Kluge M, CH Kriebitzsch, DJ Von Willert 1974 Dark fixation of CO₂ in crassulacean acid metabolism : are two carboxylation steps involved ? *Z Pflanzenphysiol* 72 : 460-465.

Kluge M, IP Ting 1978 Crassulacean acid metabolism : Analysis of an ecological adaptation. *Ecological studies*, vol 30, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-york.

Kluge M, C Bohlke, O Queiroz 1981 Crassulacean acid metabolism (CAM) in Kalanchoe : changes in intercellular CO₂ concentration during a normal CAM cycle and during cycle in continuous light or darkness. *Planta* 152 : 87-93.

Kluge M, A Fisher, IC Buchanan-Bollig 1982 Metabolic control of CAM In IP Ting, M. Gibbs eds, Crassulacean acid metabolism. American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp 278-294.

Ku SB, GE Edwards 1977 Oxygen inhibition of photosynthesis. I. Temperature dependence and relation to O₂/CO₂ solubility ratio. *Plant Physiol* 59 : 986-990.

Lacoeuïhle JJ 1976a Croissance de l'ananas en fonction du type de rejet et de la fumure. Bilans en matière fraîche et sèche et en éléments minéraux. Réunion annuelle IRFA, doc. interne n° 11.

Laing WA, WL Ogren, RH Hageman 1974 Regulation of soybean net photosynthetic CO₂ fixation by the interaction of CO₂, O₂ and ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase. *Plant Physiol* 54 : 678-685.

Lerman JC, E Deleens, A Nato, A Moyse 1974 Variation in the carbon isotope composition of a plant with crassulacean acid metabolism. *Plant Physiol* 53 : 581-584.

Littlejohn Ro, MSB Ku, 1984 Characterization of early morning crassulacean acid metabolism in Opuntia erivacea var Columbiana (Griffiths) L. Benson. *Plant Physiol* 74 : 1050-1054.

Loomis RS, PA Gerakis 1975 Productivity of agricultural ecosystems. In Cooper JP ed, Photosynthesis and productivity in different environments. Cambridge University press, pp 145-172.

Marcelle R 1975 Effect of photoperiod on the CO₂ and O₂ exchange in leaves of Bryophyllum daigremontianum. In R Marcelle, ed, Environmental and biological control of photosynthesis. W Junk publisher, Hague, pp 349-356.

Moradshahi A, HM Vines, CC Black 1977 CO₂ exchanges and acidity levels in detached pineapple, Ananas comosus (L.) Merr, leaves during the day at various temperatures O₂ and CO₂ concentrations. *Plant Physiol* 59 : 274-278.

Neales TF, PJM Sale, CP Meyer 1980 Carbon dioxide assimilation by pineapple plants, Ananas comosus (L.) Merr. II Effects of variation of the day night temperature regime. Aust. J. Plant Physiol 7 : 375-385.

Nishida K 1978 Effect of leaf age on light and dark ^{14}C fixation in a CAM plants, Bryophyllum calycinum. Plant Cell Physiol 19 : 935-941.

Nobel PS, TL Hartsock 1986 Short-term and Long-term responses of crassulacean acid metabolism plants to elevated CO_2 . Plant Physiol 82 : 604-606.

Nose A, M Shiroma, K Miyazato, S Murayama 1977 Studies on Matter Production in Pineapple Plants. I Effects of light intensity in light period on the CO_2 exchange and CO_2 balance of pineapple plants. Japan. Jour. Crop Sci. 46 : 580-587.

Nose A, K Heima, K Miyazato, S Murayama 1986 Effects of day-length on CAM type CO_2 and water vapour exchange of Pineapple plants. Photosynthetica 20 : 20-28.

Ogren WL 1984 Photorespiration pathways, regulation and modification. Annu Rev Plant Physiol 35 : 415-442.

Osmond CB, WG Allaway 1974 Pathways of CO_2 fixation during photosynthesis in Kalanchoe daigremontiana. I. Patterns of ^{14}C fixation in the light Aust J Plant Physiol 1 : 503-511.

Osmond CB 1975 CO_2 assimilation and dissimilation in the light and dark in CAM plants. In RH Burris, CC Black eds, CO_2 metabolism and plant productivity. University park press Baltimore, Londres, Tokyo pp 217-233.

Osmond CB, O Björkman 1975 Pathway of CO_2 fixation in the CAM plant Kalanchoe daigremontiana. II. Effects of O_2 and CO_2 concentration on light and dark CO_2 fixation. Aust J. Plant Physiol 2 : 155-162.

Osmond CB 1978 Crassulacean acid metabolism : A curiosity in context. Annu Rev Plant Physiol 29 : 379-414.

- Osmond CB 1981 Photorespiration and photoinhibition. Some implications for the energetics of photosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 630 : 77-98.
- Perchorowicz JT, DA Raynes, RG Jensen 1981 Light limitation of photosynthesis and activation of ribulose biphosphate carboxylase in wheat seedlings; *Proc Natl Acad Sci USA* 78 : 2895-2989.
- Powles SB, CB Osmond 1978 Inhibition of the capacity and efficiency of photosynthesis in bean leaflets illuminated in a CO₂-free atmosphere at low oxygen : a possible role for photorespiration. *Aust J Plant Physiol* 10 : 378-387
- Py C, JJ Lacoueilhe, C Teisson 1984 L'ananas, sa culture, ses produits. GP Maisonneuve et Larose eds, Agence de coopération culturelle et technique 13, Quai A. Citroën Paris, 562 p.
- Queiroz O 1974 Circadian rhythms and metabolics patterns. *Annu Rev Plant Physiol* 25 : 115-134.
- Radmer RJ, E Kok 1976 Photoreduction of O₂ primes and replaces CO₂ assimilation. *Plant Physiol* 58 : 338-340.
- Ritz D, M Kluge, HJ Veith 1986 Mass-spectrometric evidence for the double-carboxylation pathway of malate synthesis by crassulacean acid metabolism plants in light. *Planta* 167 : 284-291.
- Ritz D, M Kluge 1987 Circadian rhythmicity of CAM in continuous light : coincidences between gas exchanges parameters, ¹⁴CO₂ fixation patterns and PEP-carboxylase properties. *J of Plant Physiol*. In press
- Sale PJM, TF Neales 1980 Carbon dioxide assimilation by pineapple plant, *Ananas comosus*, (L.) Merr. I Effects of daily irradiance. *Aust. J. Plant Physiol* 7 : 363-373.
- Samish YB 1975 Oxygen build-up in photosynthesizing leaves and canopies is small. *Photosynthetica* 9 : 372-375.
- Sharkey TD, K Imai, G Farquhar, D Cowen 1982 A direct confirmation of the standard method of estimating intercellular partial pressure of CO₂. *Plant Physiol* 69 : 657-659.

Spalding MH, GE Edwards 1978 Photosynthesis in enzymatically isolated leaf cells from the CAM plant Sedum telephium. *Planta* 141 : 59-63.

Spalding MH, DK Stumpf, MSB Ku, RH Burris, GE Edwards 1979 Crassulacean acid metabolism and diurnal variations of internal CO₂ and O₂ concentrations in Sedum praealtum. *Aust J Plant Physiol* 6 : 557-567.

Szarek SR, IP Ting 1975 Photosynthetic efficiency of CAM plants in relation to C₃ and C₄ plants. In R Marcelle ed, *Environmental and biological control of photosynthesis*. W Junk publisher, la Hague, pp 289-298.

Thomas D, M André 1982 The response of oxygen and carbon dioxide exchanges and nutrient uptake to short term water stress in soybean. *J. Exp. Bot.* V. 134 : 393-405.

Thomas DA, M André 1987 Oxygen and carbon dioxide exchange in Crassulacean acid metabolism plants I. Effect of water stress on hourly and daily patterns. *Plant Physiol Biochem* 25 : 85-93.

Thomas DA, M André, AM Ganzin 1987 Oxygen and carbon dioxide exchanges in crassulacean acid metabolism plants : II Effects of CO₂ concentration and irradiance *Plant Physiol Biochem* 25 : 95-103.

Walker GH, DJ Olivier, G Sarojini 1982 Simultaneous oxidation of glycine and malate by pea leaf mitochondria. *Plant Physiol* 70 : 1465-1468.

Winter K, DJ Von Willert 1972 NaCl-induzierter crassulaceensäurestoffwechsel bei Mesembryanthemum crystallinum. *Z Pflanzenphysiol* 67 : 166-170.

Winter K, U Lüttge 1976 Balance between C₃ and CAM pathway of photosynthesis in Lange OL, L Kappen, ED Schulze eds, *Water and plant life*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New-York, pp 321-333.

Winter K 1982 Regulation of PEP carboxylase in CAM plants in IP Ting, M Gibbs eds, Crassulacean acid metabolism. American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp 153-169.

Winter K, JG Foster, MR Schmitt, GE Edwards 1982 Activity and quantity of ribulose biphosphate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxylase-protein in two Crassulacean acid metabolism plants in relation to leaf age, nitrogen nutrition, and point in time during a day/night cycle. *Planta* 154 : 309-317.

Winter K 1985 Crassulacean acid metabolism. In J Barber NR Baker eds, Photosynthetic mechanisms and the environment. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp 329-387.

RESUME

La photosynthèse et la photorespiration de la plante à métabolisme acide crassulacéen (CAM) Ananas comosus (L.) Merr sont étudiées par la détermination des échanges nets de CO₂ et d'O₂ et la fixation d'O₂ sous lumière.

La fixation de CO₂ est principalement nocturne chez des ananas issus de rejets. Celle de plants obtenus par des méthodes de culture in vitro est diurne au cours des premiers stades de développement, puis évolue en quelques mois vers un métabolisme CAM d'intensité comparable à celle des plants issus de rejets.

La comparaison des échanges nets de CO₂ et d'O₂ permet de discriminer l'assimilation photosynthétique du gaz carbonique fixé pendant la phase diurne de celle du CO₂ libéré par la décarboxylation du malate synthétisé la nuit précédente. Cette méthode témoigne de la vitesse élevée de fixation par la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase du CO₂ issu du métabolisme du malate et de la participation de la phosphoénolpyruvate carboxylase à la prise de CO₂ en fin de phase diurne.

La fixation d'O₂ sous lumière présente sa plus faible valeur au cours de la première partie du jour. Une répression de la photorespiration consécutive à une augmentation de la concentration interne de CO₂ explique cette observation. Pendant la seconde partie du jour, le rapport fixation d'O₂ / photosynthèse est voisin de 3. Cette valeur importante comparée à celle des plantes de type C3 (voisine de 1) pourrait s'expliquer par l'existence d'une résistance à la diffusion gazeuse élevée conduisant à de faibles concentrations intracellulaires de CO₂ capables de stimuler la photorespiration et par le maintien sous lumière de la respiration mitochondriale.

Mots clés : Métabolisme CAM, photosynthèse, photorespiration, Ananas comosus, échanges gazeux.

Ce travail a été réalisé dans le service de Radioagronomie du centre d'étude nucléaire de Cadarache, laboratoire d'Agrophysiologie
13108 St-Paul-lez-Durance