

# ÉTUDE DU MODE D'ACTION PHYSIOLOGIQUE D'UNE FAMILLE D'HERBICIDES :

## Les phényl-3, alkyl-5 et oxazolidine dione-2 -4

par René BILLAZ

*Ingénieur Agronome (I. N. A.). Docteur-Ingénieur.*

ÉTUDE DU MODE D'ACTION PHYSIOLOGIQUE  
D'UNE FAMILLE D'HERBICIDES par R. BILLAZ

*Fruits*, vol. 20, n° 8, p. 371 à 381, sept. 1965

**RÉSUMÉ.** — L'auteur étudie le mode d'action physiologique des composés herbicides appartenant à la famille des phényl 3, alkyl 5 et oxazolidine dione 2. 4. L'activité essentielle se situe au niveau du désaccouplement de la phosphorylation photosynthétique. Elle a pour conséquence l'inhibition de la fixation de  $\text{CO}_2$ , la baisse de teneur en amidon et sucres solubles, l'arrêt de la protéosynthèse chez les plantes traitées. L'inhibition du fonctionnement fusorial au cours de la mitose intervient aussi dans l'activité physiologique des dérivés métachlore substitués.

L'emploi d'herbicides a connu un essor considérable depuis l'apparition — vers les années 1930 — des premiers composés organiques actifs à très faible dose (de l'ordre de quelques kg/ha) par opposition aux herbicides minéraux, du type chlorate de soude, pour lesquels il faut utiliser des doses 10 à 40 fois plus élevées. L'apparition du 2. 4. D. (acide dichloro-2,4 phenoxy acétique) fut suivie de celle d'un très grand nombre de familles nouvelles : phénylcarbammates, urées substituées, triazines, anilides, aminotriazole, phényl pyridazones, sels de dipyridylum, etc. La très grande efficacité de ces composés a posé aux physiologistes d'intéressantes énigmes qu'ils se sont attachés à résoudre : le chapitre, relativement récent, de l'étude du mode d'action physiologique des herbicides, ne cesse de se développer, même en ne tenant pas compte de la littérature relative au 2. 4. D., à elle seule très considérable (on sait en effet que le 2. 4. D. partage un certain nombre des propriétés de l'auxine).

On a pu ainsi mettre en évidence des propriétés remarquables de quelques herbicides : on sait ainsi depuis les travaux de LOOMIS et LIPMANN (1948) que les dinitrophénols sont des désaccouplants des phosphorylations oxydatives ; on sait également que les phényl carbammates agissent comme inhibiteurs du fonctionnement fusorial au cours de la mitose (IVENS & BLACKMANN, 1950). Un autre type de propriétés remarquables fut mis en évidence par COOKE (1956) et précisé par BISCHOP (1958) : il s'agit de l'inhibition

de la réaction de Hill par l'herbicide DCMU (N (3-4 dichlorophényl-NN diméthyl urée) : en présence d'une concentration remarquablement faible en inhibiteur ( $10^{-6}$  à  $10^{-7}$  M) des chloroplastes isolés sont incapables de réduire *in vitro*, à la lumière, le ferricyanure en dégageant de l'oxygène. L'inhibition se situe en fait au niveau du dégagement d'oxygène : les électrons de l'eau n'étant plus disponibles pour réduire la chlorophylle oxydée, la photoréduction du ferricyanure ne peut avoir lieu. (Pour plus de précisions, nous renvoyons le lecteur à l'article de BOVÉ (1962) paru dans cette même revue).

Cette propriété est en fait partagée par un très grand nombre d'herbicides. EXER (1958), puis MORELAND & HILL (1959) montrèrent que c'était le cas des triazines symétriques du type de la Simazine et ces deux auteurs montrèrent ultérieurement (MORELAND & HILL 1959, 1962, 1963) qu'il en était de même, quoique pour des seuils d'activité différents, pour un grand nombre de phényl carbammates et d'anilides.

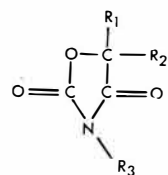
D'une façon générale, il existe une relation satisfaisante entre l'activité herbicide mesurée en serre et l'activité inhibitrice « *in-vitro* » de la réaction de Hill. Il n'est donc pas douteux que cette propriété joue un rôle essentiel dans le mode d'action de ces composés. On a d'ailleurs montré (MORELAND & HILL, 1959) que des plantes alimentées en glucose (dans une solution nutritive, par exemple) étaient insensibles à l'action de la Simazine : c'est donc bien la synthèse des glucides qui est inhibée par cet herbicide.

Ainsi, bien que le mode d'action de certains herbicides reste encore très mal connu (comme l'aminotriazole ou surtout le 2. 4. D.) les trois types de propriétés que nous avons vus (désaccouplement des phosphorylations oxydatives ; inhibition du dégagement d'oxygène dans la photosynthèse ; action mitoclasique) permettent d'expliquer de façon satisfaisante l'activité physiologique d'un grand nombre d'herbicides organiques.

Le présent article rapporte le résultat de recherches que nous avons réalisées pour déterminer le mode d'action d'herbicides appartenant à une famille synthétisée assez récemment : les phényl-3, alkyl-5 oxazolidine dione 2. 4.

### 1. Détermination des composés les plus phytotoxiques.

La famille des oxazolidine dione 2-4 dont nous disposons comprenait une cinquantaine de composés, ayant en commun le squelette ci-contre.



Les substitutions étaient respectivement les suivantes :

- R<sub>1</sub> : H, éventuellement méthyl,
- R<sub>2</sub> : H, alkyl de C<sub>1</sub> à C<sub>6</sub>, alkène (propényl), phényl
- R<sub>3</sub> : alkyl, phényl.

(R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> étaient dans ces deux cas associés pour former 1 cycle : cyclopentaméthyl ou cyclotétraméthyl).

Dans quelques cas, l'oxygène en 1 était remplacé par 1 atome de soufre, formant ainsi un cycle thiazolidine dione.

Des mesures de phytotoxicité effectuées en serre nous ont amené à ne conserver comme présentant une activité herbicide certaine que les 9 composés suivants (voir tableau ci-après).

Aucune thiazolidine dione n'est active ; pour les oxazolidine dione proprement dites, l'activité est faible si R<sub>3</sub> n'est pas un noyau phényl ou, dans ce cas, pour des substitutions en R<sub>2</sub> supérieures à C<sub>6</sub>, ou inférieures à C<sub>1</sub>(H).

Une mesure plus précise de la phytotoxicité nous a montré que les dérivés parachlorosubstitués sont très sensiblement plus actifs que leurs homologues méta chloro substitués ou que le composé PMOD (phényl 3, méthyl 5). D'ailleurs, les symptômes présentés par les plantes traitées sont très différents, au moins aux faibles doses : les dérivés para-

	R <sub>1</sub>	H			
	R <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	iC <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	nC <sub>3</sub> H <sub>7</sub>
R <sub>3</sub>	Phényl	PMOD	×	×	×
	Méta-chloro-phényl	mCPMOD	mCPEOD	mCPiPOD	mCPnPOD
	Para-chloro-phényl	pCPMOD	pCPEOD	pCPiPOD	pCPnPOD

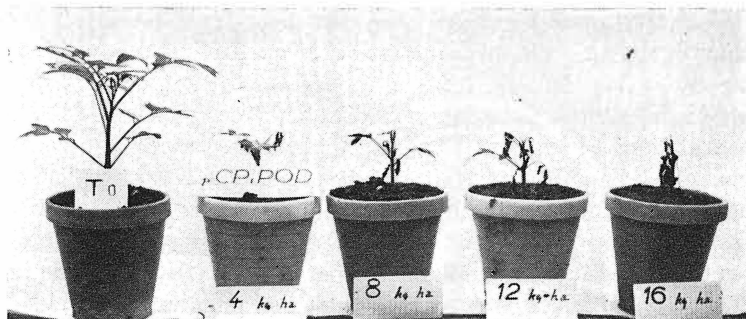
chloro-substitués appliqués sur des tomates à 4 kg/ha provoquent un flétrissement rapide des feuilles et un dessèchement progressif, accompagné de nécroses, des feuilles les plus jeunes aux plus âgées (figure n° 1) ; par contre, les dérivés méta-chlorosubstitués ne provoquent, à ces mêmes doses, que des symptômes de nanisme (inhibition du développement du bourgeon terminal) sans flétrissement. Les plantes traitées ne montrent un aspect analogue à celles ayant subi un traitement avec les dérivés parachlorosubstitués que pour des doses beaucoup plus élevées (12 à 16 kg/ha). (Fig. n° 2).

Il semble donc qu'aux faibles doses les deux groupes de composés présentent des propriétés sensiblement différentes. Ce point de vue est confirmé par l'étude de leurs propriétés mitoclasiques.

### 2. Action mitoclasique.

La parenté des phényl oxazolidine dione avec les phényl carbamates d'alkyl suggère la possibilité de propriétés mito-inhibitrices communes. On sait en effet, depuis les travaux d'IVENS & BLACKMAN (1950) que les phényl carbamates herbicides sont de puissants inhibiteurs de la division cellulaire : ils troublent le fonctionnement fusorial au cours de la mitose, pro-

FIG. 1. — Tomates : à gauche : témoin ; à droite : traitées avec des doses croissantes de pCPiPOD (parachlorophényl-3 isopropyl-5 oxazolidine dione 2-4).



voquant une répartition anarchique des chromosomes de la cellule (stathmocinèse) associée le plus souvent à une inhibition du cloisonnement cellulaire (stathmodiérèse). Ce type d'action est identique à celui de la colchicine.

Nous avons donc observé les figures de division de racines d'orge (*Hordeum vulgare*) ayant germé à l'obscurité 48 h, en présence de doses variables de chacun de ces composés. Il s'est ainsi avéré qu'aucun dérivé parachlorosubstitué n'avait d'activité mitoclasique : le rythme et le déroulement étaient parfaitement normaux. On n'avait d'ailleurs observé aucune inhibition de la croissance des racines, alors que les dérivés méta-chlorosubstitués et la PMOD avaient provoqué une inhibition très forte de cette croissance dès la dose de  $5.10^{-5}$  M. Cette inhibition était due à une forte action mitoclasique, les figures de division présentant les aspects caractéristiques de stathmométa-phase (Fig. n° 3).

La différence d'activité herbicide et de symptômes correspond donc bien à une différence de propriétés physiologiques. Il est d'ailleurs intéressant de noter que dans le groupe de dérivés mitoclasiques, les composés les plus phytotoxiques sont également les plus actifs comme mitoinhibiteurs (BILLAZ et MOREL, 1961).

L'activité mitoclasique joue donc probablement un rôle important dans l'activité herbicide des dérivés métachlorosubstitués. La question se pose cependant de déterminer les causes de l'activité des composés parachlorosubstitués. L'absence totale d'inhibition de la croissance des racines d'orge, à l'obscurité, alors qu'en serre ils présentent une activité herbicide supérieure aux autres,

pose le problème du stade à partir duquel les plantes sont sensibles à leur action.

### 3. Détermination des stades de la croissance sensibles à l'action de la pCPEOD.

Dans le but d'éclaircir cette question, nous avons traité des plantules de Soja (*Glycine maximum*) de 4 en 4 jours, depuis le 2<sup>e</sup> jour suivant la germination, jusqu'au 14<sup>e</sup> jour. Jusqu'au 6<sup>e</sup> jour, les plantules germaient à l'obscurité; à ce stade elles étaient repiquées en pot, à la serre, à la lumière. Nous avons expérimenté l'action du dérivé pCPEOD (parachlorophényl, éthyl), l'un des plus actifs du groupe, en l'appliquant sur la plantule à une dose correspondant à 4 kg/ha.

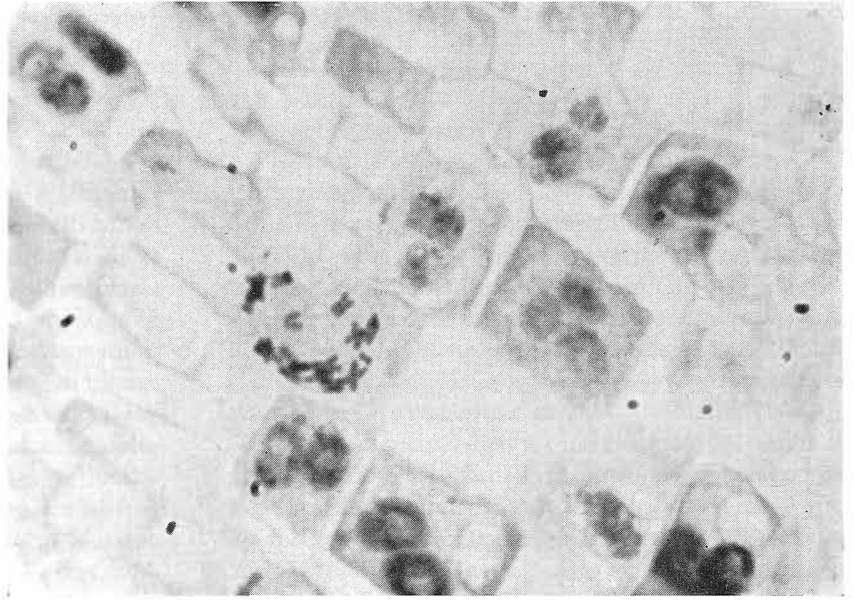


FIG. 3. — Cellule de méristème de racine d'Orge après 48 heures de contact avec  $5.10^{-5}$  M de mCPMOD : au centre : une cellule en stathmometa-phase caractéristique.

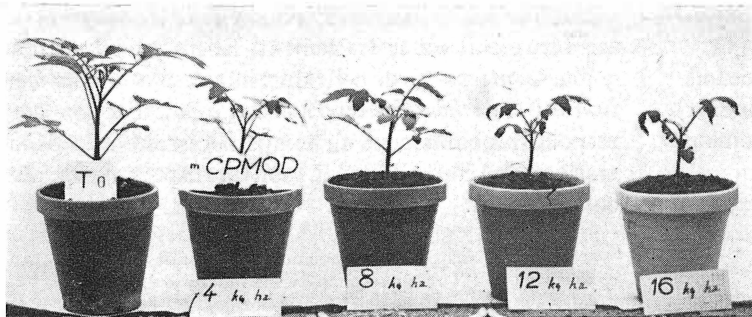


FIG. 2. — Tomates : à gauche : témoin ; à droite : traitées par des doses croissantes de mCPMOD (méta-chlorophényl-3 méthyl-5 oxazolidine dione 2-4)

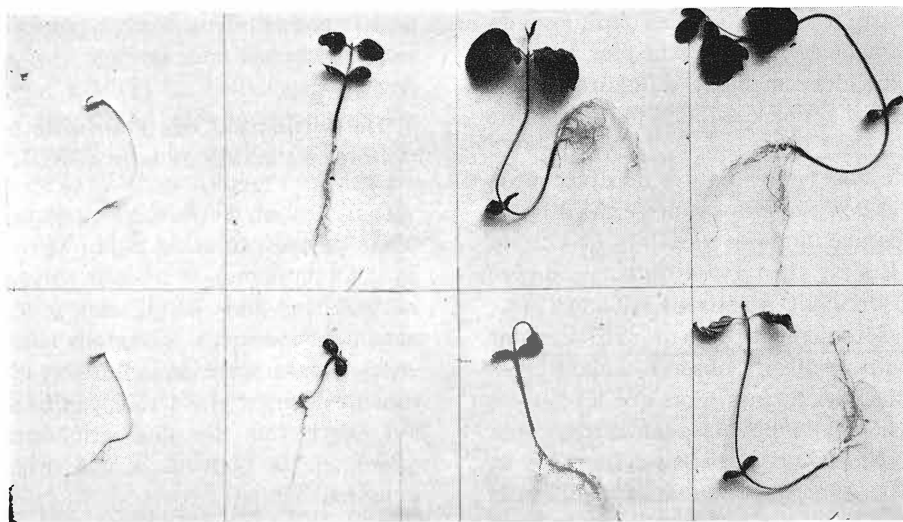


FIG. 4. — Soja : de gauche à droite :  
 en bas : plantes traitées, respectivement :  
 — le 2<sup>e</sup> jour et récoltées le 6<sup>e</sup> (à l'obscurité) ; — le 10<sup>e</sup> jour et récoltées le 14<sup>e</sup> (à la lumière) ;  
 — le 6<sup>e</sup> jour et récoltées le 10<sup>e</sup> (à la lumière) ; — le 14<sup>e</sup> jour et récoltées le 18<sup>e</sup> (à la lumière).  
 en haut : plantes témoins, récoltées au même stade.

La figure n° 4 montre l'aspect des plantes aux différents stades. On voit qu'à l'obscurité le traitement a été sans action sur la croissance. Par contre, ultérieurement, les plantes traitées présentent un flétrissement accentué. Elles en restent d'ailleurs au même stade de croissance où elles étaient au moment du traitement.

Il est manifeste que le traitement est sans effet tant que les plantules sont à l'obscurité. La mesure de la croissance confirme d'ailleurs cette observation. Par contre, dès qu'elles sont à la lumière, les plantes y deviennent sensibles, particulièrement en ce qui concerne la formation de nouveaux tissus foliaires. La mesure de la croissance montre qu'il y a inhibition quasi totale de la croissance en poids de matière sèche, aussi bien de la partie aérienne que des racines, dès que la plante ne dépend plus, pour son approvisionnement énergétique, que de la photosynthèse (c'est-à-dire après épuisement des réserves cotylédonaire).

L'hypothèse d'une action inhibitrice des processus photosynthétiques par la pCPEOD s'impose donc.

Pour la vérifier, nous avons mesuré la fixation de  $^{14}\text{CO}_2$  par des plantes entières, traitées.

#### 4. Inhibition de la fixation de $\text{CO}_2$ , IN VIVO.

Le choix de la fixation de  $\text{CO}_2$  comme critère de

l'inhibition des processus photosynthétiques découle des connaissances récentes sur le mécanisme de la photosynthèse. On sait en effet, depuis les travaux de CALVIN, d'ARNON et de leurs collaborateurs, que la fixation de  $\text{CO}_2$  représente l'aboutissement du fonctionnement harmonieux de la machinerie biochimique des chloroplastes : réduction de la NADP (1) à partir des électrons de l'eau, formation d'ATP (2) par photophosphorylation et déroulement du cycle de Calvin (voir l'article de synthèse de Bové, 1962). Le non-fonctionnement d'un de ces processus se répercute obligatoirement dans une inhibition de la fixation de  $\text{CO}_2$ .

Nous avons donc fait fixer à des plantes (tomates, soja), à la lumière, du  $^{14}\text{CO}_2$  dégagé dans une chambre étanche de plexiglas, à partir de  $^{14}\text{CO}_3\text{Ba}$ . Nous avons représenté dans la figure n° 5 les résultats obtenus dans plusieurs expériences.

La fixation baisse très fortement entre la 7<sup>e</sup> et la 16<sup>e</sup> heure suivant le traitement. Elle n'est plus, après 4 jours, que 20 % de celle du témoin. *Il y a donc bien inhibition de la photosynthèse.* Le délai d'action correspond probablement au temps nécessaire à la pénétration du composé et à son transport jusqu'aux chloroplastes.

(1) NADP : Nicotine amide adénine dinucléotide phosphate. (Anciennement : TPN : Triphosphopyridine nucléotide).

(2) ATP : Acide adenosine triphosphorique.

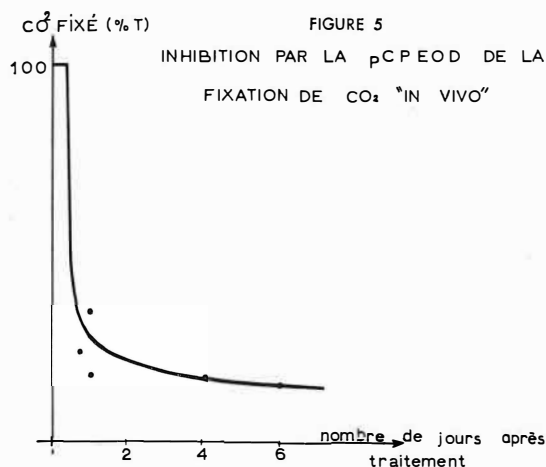


FIG. 5. — Fixation de  $^{14}\text{CO}_2$ , en % du témoin, par des plantes de Tomates et Soja, traitées avec 4 kg/ha de pCPEOD, en fonction du temps s'écoulant après le traitement.

Nous avons recherché si d'autres oxazolidine diones partagent cette propriété ; nous avons ainsi trouvé que, sous réserve de l'appliquer aux doses où ils provoquent un arrêt total de la croissance en poids de matière sèche, les dérivés PMOD, mCPMOD et pCPMOD entraînent également, dans les 48 heures qui suivent, une baisse de la fixation de l'ordre de 50 à 65 %. *Il semble donc que cette propriété soit commune aux phényloxazolidine diones herbicides.*

Il convient cependant de préciser si l'action inhibitrice résulte bien d'une action directe au niveau des processus photosynthétiques (et non d'une action indirecte comme par exemple la fermeture de stomates) et si c'est bien la molécule elle-même d'inhibiteur qui est active et non un éventuel produit de transformation après qu'elle a pénétré dans le tissu. Pour ce faire, nous avons expérimenté l'action inhibitrice de la pCPEOD « *in vitro* » sur les réactions photosynthétiques de chloroplastes isolés.

### 5. Inhibition de la photosynthèse IN VITRO.

Travaillant avec des chloroplastes isolés d'épinard et de chou chinois, nous avons utilisé les schémas expérimentaux d'ARNON et ses collaborateurs et en particulier le « système reconstitué » réalisé par LOSADA, TREBST et ARNON (1960). Dans ce système, on utilise d'une part des chloroplastes éclatés dans une solution hypotonique de NaCl (0,035 M) qui assurent, moyennant l'addition de cofacteurs solubles appropriés, le déroulement du transport d'électrons, la phosphorylation couplée à ce transport et éventuel-

lement la phosphorylation cyclique et, d'autre part, un extrait aqueux de chloroplastes (E. A. C.) qui contient les enzymes nécessaires au déroulement du cycle de Calvin (BASSHAM et CALVIN, 1957 ; TREBST, TSUJIMOTO et ARNON, 1958).

L'inhibiteur était véhiculé dans du méthanol et additionné dans le milieu réactionnel au dernier moment. Les fioles témoins recevaient la même quantité de méthanol, sans inhibiteur. Avec un volume de 0,2 ml pour 3 ml de mélange réactionnel, le méthanol ne gêne pratiquement pas le déroulement des réactions des chloroplastes.

### A. FIXATION DU CO<sub>2</sub> DANS UN SYSTÈME « CATALYTIQUE » ILLUMINÉ.

Nous avons tout d'abord vérifié si la pCPEOD inhibait la fixation de CO<sub>2</sub> *in-vitro*. Pour cela, nous l'avons ajouté à des milieux réactionnels contenant des quantités catalytiques de NADP et d'ADP (1) (0,5  $\mu\text{M}$ ). Dans un tel système, l'énergie lumineuse sert à régénérer NADPH<sub>2</sub> et ATP au fur et à mesure qu'ils sont utilisés dans la réaction réductrice de CO<sub>2</sub>.

Nous avons ainsi trouvé une baisse de la fixation de CO<sub>2</sub>, variant de 50 % en présence de  $3 \cdot 10^{-4}$  M de pCPEOD à 60 à 75 % avec  $1 \cdot 7 \cdot 10^{-3}$  M et 90 % avec  $3 \cdot 10^{-3}$  M (moyenne de 3 expériences). La pCPEOD est donc bien un inhibiteur de la fixation de CO<sub>2</sub> « *in vitro* » : *c'est donc bien la molécule elle-même qui est active et c'est bien une action directe que nous avons observée dans la photosynthèse « in vitro ».*

Mais quel est celui des trois processus fondamentaux concourants à la fixation de CO<sub>2</sub> qui est inhibé par la pCPEOD ? Le transport d'électron de l'eau au NADP, la formation d'ATP par photophosphorylation ou la régénération de l'accepteur de CO<sub>2</sub>, le ribulose diphosphate, à travers le cycle de Calvin ?

### B. FIXATION DE CO<sub>2</sub> A L'OBSCURITÉ EN PRÉSENCE DE NADPH<sub>2</sub> ET D'ATP.

On peut tout d'abord déterminer si c'est le cycle de Calvin qui est en cause. On sait en effet, depuis les travaux de TREBST, TSUJIMOTO et ARNON (1958) que celui-ci peut se dérouler à l'obscurité, à condition de fournir au milieu réactionnel la NADP réduite (NADPH<sub>2</sub>) et l'ATP qui sont formés, eux, au cours de réactions purement photochimiques. Nous avons

(1) Acide adenosine diphosphorique.

donc formé, à la lumière, en l'absence d'inhibiteur, des quantités « substrat » d'ATP et de  $\text{NADPH}_2$  (2,5 et 2,0  $\mu\text{M}$ /fiole), le mélange réactionnel étant, quant au reste, identique à celui des premières expériences. Nous avons ensuite ajouté, à l'obscurité, le  $^{14}\text{CO}_3\text{HNa}$  et l'inhibiteur. Dans ces conditions, l'action inhibitrice se limite aux réactions thermochimiques du cycle de Calvin. Nous avons alors obtenu les résultats suivants (Tableau 2).

TABLEAU N° 2.

*Fixation de  $\text{CO}_2$  à l'obscurité, par des chloroplastes isolés d'épinards, en présence de pCPEOD.*

INHIBITEUR	FIXATION TOTALE (cpm/fiole)
o	67 000 (100)
$3 \cdot 10^{-4}$ M	67 000 (100)
$1,6 \cdot 10^{-3}$ M	57 000 (86)

Milieu réactionnel : ( $\mu\text{M}$ /3 ml).

TRIS-HCl pH 7,5 : 80 ;  $\text{MgCl}_2$  : 5 ;  $\text{MnCl}_2$  : 2 ; ascorbate de sodium : 10 ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  : 5 ; Ribulose — 5 ; Phosphate : 1 ; Glutathion : 1 ; FMN (1) : : 0,001 ; ADP : 2,5 ; NADP : 2,0 (ajouté au début de l'expérience, à la lumière) ;  $^{14}\text{CO}_3\text{HNa}$  : 10 (ajouté, avec l'inhibiteur, à l'obscurité, après 7 mn de réactions lumineuses).

E. A. C. : 1 ml préparé à partir d'une suspension de chloroplastes à 2 mg de chlorophylle/ml.

Chloroplastes éclatés : 0,5 mg de chlorophylle

Il n'y a donc qu'une inhibition très faible, comparée à celle observée à la lumière (60 à 75 % à  $1,6 \cdot 10^{-3}$  M). *L'essentiel de l'inhibition se manifeste donc au cours des réactions lumineuses.* L'examen des produits de la fixation montre d'ailleurs que la proportion de sucres monophosphates, de sucres diphosphates, de dihydroxyacétone phosphate et d'acide 3 phospho-glycérique est la même en absence ou en présence d'inhibiteurs.

La pCPEOD agit donc soit sur le transport d'électrons, soit sur la photophosphorylation. Pour décider lequel de ces deux processus est en cause, nous avons mesuré séparément la réduction de NADP et l'estérification du phosphore minéral dans un milieu réac-

tionnel identique au précédent mais sans addition de  $^{14}\text{CO}_3\text{HNa}$ .

### C. TRANSPORT D'ÉLECTRONS ET PHOTOPHOSPHORYLATION.

Dans ces conditions, le mélange réactionnel contenant au départ des quantités « substrat » de NADP et d'ADP et l'absence de  $\text{CO}_3\text{HNa}$  empêchant que le  $\text{NADPH}_2$  et l'ATP formés soient utilisés dans la fixation de  $\text{CO}_2$ , la réaction se déroule comme une réaction de Hill, avec le NADP comme accepteur d'électrons. ( $\text{NADPH}_2$  est mesuré par la densité optique, à 360 m $\mu$  du milieu réactionnel, après centrifugation ; l'ATP formé est déterminé par la radioactivité du milieu après élimination du Phosphore minéral — marqué au  $^{32}\text{P}$  — en excès.)

Pour mettre clairement en évidence le rôle de l'inhibition des réactions lumineuses dans l'inhibition de la fixation de  $\text{CO}_2$ , nous avons mesuré en parallèle, dans des fioles recevant les mêmes quantités d'inhibiteur, la fixation de  $\text{CO}_2$  (on remplace le  $^{32}\text{PO}_4\text{HK}_2$  par du phosphate « froid » et on ajoute 10  $\mu\text{M}$  de  $^{14}\text{CO}_3\text{HNa}$ ). Nous avons ainsi obtenu les résultats suivants (Tabl. n°3).

TABLEAU N° 3.

*Action de la pCPEOD sur la réduction de NADP, la phosphorylation couplée et la fixation de  $\text{CO}_2$ , par des chloroplastes d'épinards, à la lumière.*

	N° DES FIOLES	NADP réduit $\mu\text{M}$	P estérifié $\mu\text{M}$	$\text{CO}_2$ fixé cpm/fiole
Témoin	1	1,9	1,3 (100)	
	2			349 000 (100)
$3 \cdot 10^{-4}$ M	3	2,0	0,7 (54)	
	4			268 000 (76)
$1,6 \cdot 10^{-3}$ M	5	1,5	0,5 (39)	
	6			166 000 (47)

Milieu réactionnel : comme dans le tableau n° 2, excepté ;

(1) FMN : Flavine mononucléotide.



— fioles 1, 3 et 5 :  $\text{PO}_4\text{HK}_2$  est remplacé par  $^{32}\text{PO}_4\text{HK}_2$  : il n'y a pas de  $^{14}\text{COHN}_3\text{a}$ .

— fioles 2, 4 et 6 : on ajoute  $^{14}\text{CO}_3\text{HNa}$  au début de la réaction.

— chloroplastes éclatés : 0,5 mg de chlorophylle.

E. A. C. : 1 ml préparé à partir d'une suspension de chloroplastes à 1,14 mg de chlorophylle par ml.

L'inhibition porte essentiellement sur la phosphorylation : à  $3.10^{-4}$  M la réduction de NADP n'est pas affectée alors que la formation d'ATP est freinée dès 50 %. A  $1.6.10^{-3}$  M, le transport d'électrons est ralenti de 20 % alors que l'estérification du phosphate l'est de 60 %. La fixation de  $\text{CO}_2$  est inhibée de façon très parallèle à la phosphorylation. *La pCPEOD agit donc essentiellement comme un désaccouplant.*

Nous en trouvons la confirmation en mesurant la phosphorylation liée à un transport cyclique d'électrons, catalysée par le méthyl sulfate de N méthyl phenazonium (PMS). (Tableau n° 4).

TABLEAU n° 4.

*Inhibition de la pCPEOD de la photophosphorylation cyclique catalysée par P. M. S.*

INHIBITEUR	Pm estérifié ( $\mu\text{M}/\text{mg}$ de chlorophylle/heure)	
	Chloroplastes d'épinards	Chloroplastes de choux chinois
0	640 (100)	520 (100)
$3.10^{-4}$ M		430 (83)
$1.7.10^{-3}$ M		56 (14)
$3.3.10^{-3}$ M	140 (22)	

Milieu réactionnel : ( $\mu\text{M}/3$  ml) TRIS/HCl pH 8,0 : 80 ;  $\text{MgCl}_2$  : 5 ; ADP : 10 ;  $^{32}\text{PO}_4\text{HK}_2$  : 10.

Chloroplastes : épinards : 0,15 mg de chlorophylle choux chinois : 0,05 mg de chlorophylle.

Les chloroplastes de choux chinois étaient préparés suivant GOFFEAU et BOVÉ (1962) qui ont mis au point les conditions d'extraction de ce matériel.

On voit que la pCPEOD inhibe très fortement cette phosphorylation cyclique.

#### D. PRODUITS DE LA FIXATION DE $\text{CO}_2$ .

Une dernière confirmation est obtenue par l'analyse des produits de fixation de  $^{14}\text{CO}_2$  en présence de pCPEOD (déterminés par chromatographie sur papier, suivant LOSADA, TREBST et ARNON (1960) et autoradiographie de ces chromatogrammes). On sait que le cycle de Calvin fait intervenir l'ATP en deux endroits : formation de ribulose-diphosphate à partir de ribulose-5-phosphate, et transformation d'acide-3-phosphoglycérique (P. G. A.) en acide 1.3. diphosphoglycérique. Le ribulose diphosphate étant l'accepteur de  $\text{CO}_2$ , le déficit d'ATP provoque une diminution de la fixation c'est ce que nous avons mesuré), ce déficit entraîne également une accumulation du PGA. C'est bien ce que nous observons dans nos expériences. L'analyse des produits de fixation de  $\text{CO}_2$  à la lumière montre dans toutes nos expériences une accumulation de PGA. Par exemple (Fig. 6) nous trouvons dans les extraits témoins qu'il représente 10 % de la fixation totale, alors qu'à  $1.7.10^{-3}$  M de pCPEOD ce pourcentage s'élève à 85 %.

*Fixation totale de  $\text{CO}_2$ , analyse des produits de la fixation, mesure de la réduction du NADP et mesure directe de la photophosphorylation cyclique ou non, conduisent à attribuer à la pCPEOD le rôle d'un désaccouplant de la phosphorylation photosynthétique.*

#### 6. Action de la pCPEOD sur les phosphorylations oxydatives.

La phosphorylation photosynthétique n'étant pas la seule source d'ATP dans les plantes, nous avons voulu vérifier si la pCPEOD ne désaccouplait pas également les phosphorylations oxydatives, autre source essentielle d'ATP.

Limités pour expérimenter cette action « *in vitro* » directement par le volume d'éthanol (nécessaire pour véhiculer l'inhibiteur) tolérable par des homogénats de mitochondries, nous avons effectué cette mesure en utilisant des mitochondries de plantules traitées, isolées suivant les techniques classiques, dans les jours qui suivent le traitement. Utilisant comme matériel végétal des mitochondries d'hypocotyles étiolés de concombre (*Cucumis sativum*) et utilisant un protocole expérimental, légèrement modifié (1) de STENLID et SADDIK (1962) nous avons trouvé que, seules, des doses de traitement de 10 à 15 fois plus élevées que

(1) Pour les détails expérimentaux, nous nous permettons de renvoyer le lecteur à notre thèse, intitulée « Étude du mode d'action physiologique des phényl-3 alkyl oxazolidine dione 2.4 herbicides », en cours de publication.

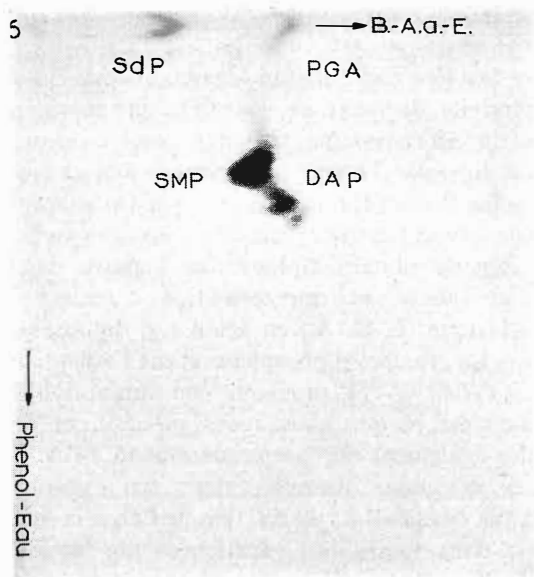


FIG. 6 a.

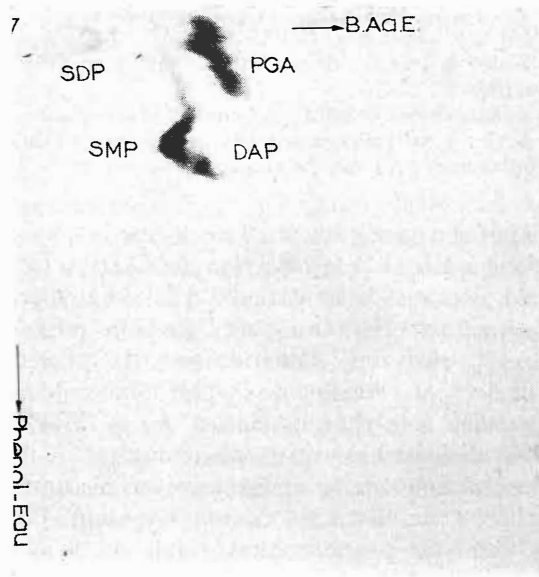


FIG. 6 b.

FIG. 6 a, 6 b et 6 c. — Autoradiogrammes de chromatogrammes réalisés avec les produits solubles de la fixation de  $^{14}\text{C}$   $\text{CO}_2$  à la lumière au moyen d'un d'un extrait aqueux de chloroplastes.

ceux actifs sur des plantes en serre étaient nécessaires pour obtenir un désaccouplement de 50 à 100 %. Pratiquement, seul un contact de 48 heures des racines avec une émulsion titrant à  $5 \cdot 10^{-3}$  M de pCPEOD affecte sensiblement la croissance des hypocotyles : les mitochondries qu'on en extrait oxydent le succinate à un taux sensiblement équivalent aux lots témoins mais n'estérifient plus le phosphate minéral qu'avec un rendement deux à trois fois plus faible. Un contact de racines de plantules vertes, à la lumière, avec des émulsions titrant entre  $5 \cdot 10^{-5}$  et  $10^{-4}$  de pCPEOD suffit par contre à tuer les plantes.

*Il n'est donc pas douteux que la pCPEOD est susceptible d'agir comme désaccouplant des phosphorylations oxydatives mais qu'aux doses normales d'emploi herbicide, cette action ne doit pas intervenir.* Le désaccouplement de la photophosphorylation est donc le processus le plus profondément affecté par la pCPEOD que nous ayons trouvé jusqu'à maintenant. Nous allons cependant examiner à présent si les troubles du métabolisme azoté et glucidique de plantes traitées permettent d'envisager d'autres hypothèses.

La photosynthèse conduisant normalement chez les plantes essentiellement à la formation de glucides, nous examinerons pour commencer l'action de la pCPEOD et de trois autres oxazolidine diones sur le métabolisme glucidique de plantes traitées.

#### 7. Action sur le métabolisme glucidique de plantes traitées.

La mesure de la teneur en amidon des parties aériennes (suivant HASSID et ABRAHAM) de tomates et de sojas traités par la pCPEOD (à 4 kg/ha) indique une baisse très sensible. La figure n° 7 montre l'évolution de ces teneurs dans les jours qui suivent le traitement, pour des sojas.

On voit que la teneur baisse régulièrement, pour n'être plus égale, après 8 jours, qu'à 9 % de celle du témoin. Des mesures effectuées sur des tomates donnent des résultats identiques. Il s'agit donc bien d'un phénomène général.

Nous observons les mêmes baisses de réserves amyliques de parties aériennes de tomates traitées avec la mCPEOD à 8 kg/ha, la PMOD ou la pCPMOD à 16 kg/ha. Comme pour la fixation photosynthétique de  $\text{CO}_2$ , les quatre oxazolidine diones expérimentées sont inhibitrices du maintien des teneurs en amidon, aux doses où elles provoquent une inhibition complète de la croissance. *Il est donc fort probable qu'elles ont le même mode d'action.*

La mesure des teneurs en sucres solubles de plantes traitées avec la pCPEOD (4 kg/ha) montre que le fructose et le glucose baissent, eux aussi, sensiblement. (Tableau n° 5).



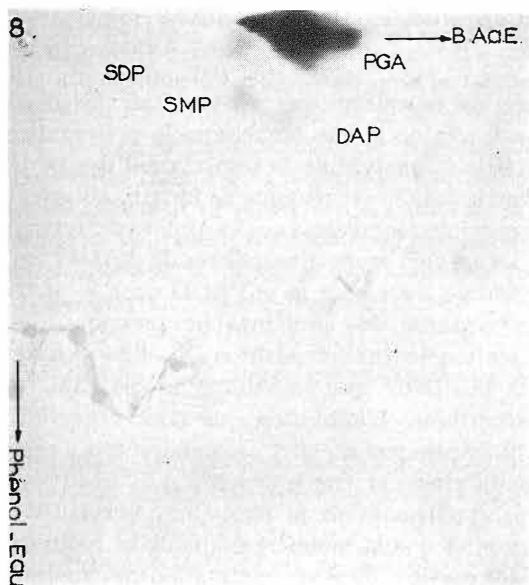
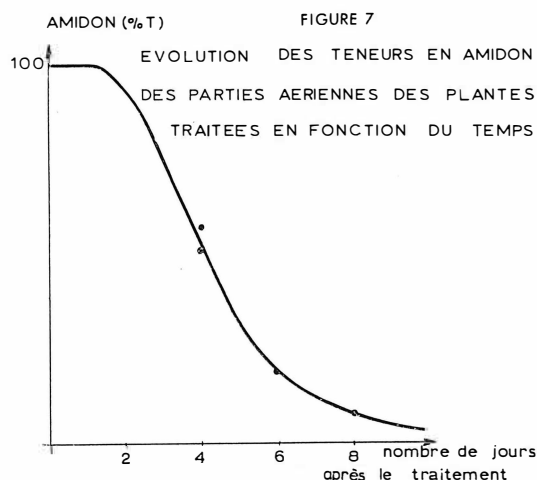


FIG. 6 c.

Le traitement provoque donc non seulement la disparition de l'amidon mais également d'une partie des sucres solubles. Cependant, ces derniers baissent proportionnellement moins que l'amidon.

L'interprétation de ces résultats est aisée, une fois mis en évidence le rôle découplant de la photophosphorylation de la pCPEOD. On sait en effet, depuis HANES (1940) que la synthèse de l'amidon se fait à partir de glucose-phosphate, la réaction étant catalysée par la phosphorylase. Le sens de la réaction est déterminé par le rapport glucose  $\times$  phosphate/phosphate minéral. Quand ce rapport est faible, ce qui doit être le cas de la plante traitée, (la pCPEOD provoque une baisse de la formation des hexoses phosphates « in vitro »), la réaction se déroule dans le sens de la dégradation de l'amidon. D'où la disparition progres-



sive de l'amidon de la partie aérienne des plantes traitées. Il est probable en outre qu'après un certain degré d'épuisement de ces réserves, l'utilisation de hexoses phosphates de la glycolyse par la chaîne respiratoire provoque une baisse des teneurs en sucres solubles.

### 8. Action sur le métabolisme azoté des plantes traitées.

#### A) Bilan azoté.

Nous examinerons pour commencer quelle est l'influence de la pCPEOD, appliquée à 4 kg/ha sur des plantes de tomates, sur le bilan de l'azote dans les parties aériennes. Les mesures des différentes formes d'azote étaient faites de la façon suivante :

- azote nitrique, selon MORRIS-GONZALEZ-MAS (1958) ;
- azote aminé soluble, par calcul après dosage des acides aminés solubles extraits selon J. BOVÉ, C. BOVÉ et

TABLEAU n° 5.

Teneur en amidon et en sucres solubles (mg/g de m. s.) des parties aériennes de tomates traitées avec la pCPEOD.

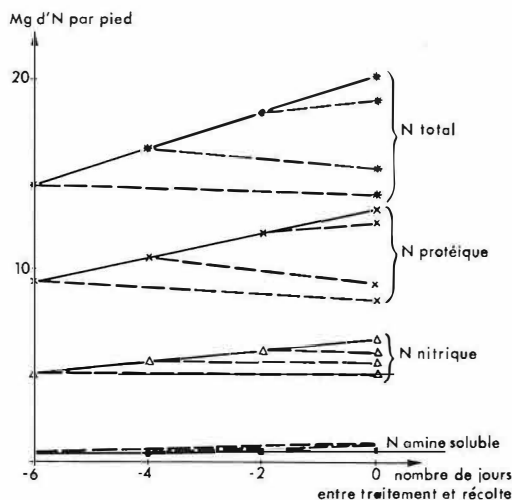
	AMIDON	SUCRES SOLUBLES			
		Glucose	Fructose	Saccharose	Total
Témoin.....	49,7 (100)	6,8 (100)	6,5 (100)	1,6 (100)	14,9 (100)
Plantes traitées.....	8,5 (17)	4,7 (69)	4,0 (62)	1,5 (91)	10,2 (68)

RAVEUX (1957), séparés et dosés suivant MENORET (1960) ;

— *azote insoluble* : soit directement, par Kjeldahl sur le résidu après extraction des éléments solubles, soit par calcul après extraction, séparation et dosage des acides aminés insolubles.

La figure n° 8 montre l'évolution de ces différentes formes d'azote exprimées en mg/pied, dans les jours qui suivent le traitement (les plantes ont été traitées respectivement 6, 4 et 2 jours avant la récolte).

FIGURE 8  
EVOLUTION DES DIFFERENTES FRACTIONS AZOTEES EN  
FONCTION DU TEMPS APRES TRAITEMENT (ex 9C)



On voit essentiellement :

- Une augmentation de l'azote aminé soluble,
- Une baisse de l'N insoluble (protéique) après 4 et 6 jours, alors qu'après 2 jours il augmente mais plus lentement que dans le témoin.

Deux autres expériences, dont nous ne rapporterons pas ici le détail des résultats, nous ont donné des résultats analogues, c'est-à-dire essentiellement : arrêt de la protéosynthèse dans les 4 jours qui suivent le traitement, tendance à l'accumulation de l'azote aminé soluble. Par contre, l'azote nitrique varie de façon très différente d'une expérience à l'autre. Il n'y a donc pas de règle générale dans ce domaine, ce qui n'est guère étonnant, étant donné que la quantité de nitrates présents dans les parties aériennes dépend de facteurs très différents : absorption, activité de la nitrate réductase, activité photosynthétique, etc.

Par contre, l'arrêt de la protéosynthèse et l'accumulation d'acides aminés solubles sont bien établis. Avant d'envisager d'en interpréter les causes, il convient d'examiner la composition de ces deux fractions.

## B) Composition des fractions azotées soluble et insoluble.

Nous ne fournirons par ici le détail des résultats obtenus, afin de ne pas surcharger la présentation de cet article. L'analyse de la composition des protéines de plantes traitées et témoins ne montre aucune différence sensible : les mêmes acides aminés s'y retrouvent dans les mêmes proportions. Il serait douteux qu'une intervention directe de la pCPEOD dans le processus de la synthèse des protéines ne provoque aucune modification de leur composition. Il semble donc exclu que la pCPEOD soit un inhibiteur spécifique de la protéosynthèse. L'inhibition que nous observons est plus probablement un effet secondaire, qui s'explique d'ailleurs aisément par le déficit d'ATP que provoque le désaccouplement de la photophosphorylation : on sait en effet que la première étape de la synthèse des peptides consiste dans une activation des acides aminés par l'ATP (HOAGLAND, 1955 ; KINGDOM, 1958 ; BELJANSKY, 1961).

L'analyse de la composition de la fraction aminée soluble montre dans les trois expériences que l'accumulation observée dans les plantes traitées est essentiellement due à 3 acides : glutamique,  $\gamma$ -aminobutyrique, arginine ; et à 2 amides : glutamine et asparagine. L'interprétation de ces résultats nous paraît se rattacher aux connaissances classiques sur le métabolisme azoté de feuilles excisées. (BONNER, 1950 ; MOYSE, 1951). On sait en effet que ce métabolisme se caractérise par l'arrêt de la protéosynthèse, la manifestation d'une protéolyse plus ou moins accentuée et l'accumulation de plusieurs acides aminés libres, particulièrement des amides qui représentent une forme de récupération de l'ammonium libéré par désamination oxydative (VICKERY et coll., CHIBNALL, MOTHES etc.). Nous pensons que dans le cas des plantes traitées par la pCPEOD l'arrêt de la protéosynthèse permet la manifestation de la protéolyse concomitante (nous observons bien une baisse de l'N protéique par pied après 4 et 6 jours) et de ses corollaires : accumulation d'acides et d'amides.

Les troubles du métabolisme azoté de plantes traitées nous paraissent donc n'être qu'une manifestation secondaire du déficit d'ATP.

## 9. Discussion-Conclusion.

### A) Mode d'action de la pCPEOD.

Dans ces conditions, l'inhibition de la photophosphorylation nous paraît constituer la cause essentielle,

sinon exclusive, de la phytotoxicité de la phenyl-3 ethyl-5 oxazolidine dione 2.4. En effet, elle n'a aucune activité mito-inhibitrice, elle n'agit qu'à la lumière et le trouble des métabolismes azoté et glucidique des plantes traitées ne laissent supposer aucune inhibition spécifique. *Baisse de la fixation de CO<sub>2</sub>, baisse des teneurs en amidon et en sucres solubles, arrêt de la protéosynthèse et phénomènes connexes nous paraissent donc refléter uniquement le déficit d'ATP provoqué par le désaccouplement de la photophosphorylation.*

B) *Mode d'action des autres oxazolidinediones herbicides.*

Trois dérivés autres que la pCPEOD partagent avec elle, sous réserve des doses d'emploi, la propriété

*Remerciements.*

*Je tiens à exprimer ma vive reconnaissance à M. Morel, Directeur de Recherches au C. N. R. A., qui a dirigé ces travaux, ainsi qu'à M. Bové, Chef du Service de Biochimie à l'I. F. A. C., qui m'a réservé un précieux accueil dans son laboratoire pour les expériences relatives à la photosynthèse « in vitro » ; enfin je dois beaucoup à M. Goffeau, collaborateur de M. Bové, dont les connaissances dans ce domaine m'ont été des plus précieuses.*

BIBLIOGRAPHIE

- (1) BASSHAM (J. A.), CALVIN (M.). — The path of Carbon in Photosynthesis. Prentice Hall, 1957.
- (2) BELJANSKI (M.). — Ribonucléosides-Triphosphates et synthèses de peptides spécifiques par des enzymes purifiés. *Bull. Soc. Chim. Biol.* XLIII, 1017-1030, 1961.
- (3) BILLAZ (R.), MOREL (G.). — Action mitoclasique de diverses oxazolidine dione-2-4. *CRAS* 253 (1961) 2248-2250.
- (4) BISCHOP (N. I.). — The Influence of the herbicide DCMU on the oxygen evolving system of Photosynthesis. *Bioch. Bioph. Acta*, 27, 1, 205-206, 1958.
- (5) BONNER (J.). — Plant Biochemistry. *Acad. Press* (New York), 572-592, 1950.
- (6) BOVÉ (J.). — Quelques aspects anciens et modernes de la Photosynthèse. I. *Fruits*, 16 (3), 89-101, 1961 ; II. *Fruits*, 16 (10), 479-512, 1961 ; III. *Fruits*, 17 (2), 55-74, 1962.
- (7) BOVÉ (J.), BOVÉ (C.), RAVEUX (R.). — Extraction, séparation et déterminations de certains composés hydrosolubles dans les plantes et diverses cultures de tissus de *Citrus limonum*. *Rev. Gén. Bot.*, 64 572-592, 1957.
- (8) COOKE (A. R.). — A possible mechanism of action of the Urea type herbicides. *Weeds* 4 397-398, 1956.
- (9) EXER (B.). — Uber Pflanzenwachstums regulatoren : Der Einfluss von Simazin auf den Pflanzenstoffwechsel. *Experimentia* 14 136-137, 1958.
- (10) HANES (C. S.). — The reversible formation of starch from glucose 1-phosphate catalysed by potato phosphorylase. *Proc. Roy. Soc. (London)*, B 129 174-208, 1940.
- (11) HASSID (W. Z.), ABRAHAM (S.). — Chemical Procedures for [Analysis of Polysaccharides : Determination of Starch. *Methods in Enzymology*, III, 38-40.
- (12) HOAGLAND (M. B.). — An enzymatic mechanism for amino acid activation in animal tissues. *Bioch. Bioph. Acta* 16, 228-229, 1955.
- (13) IVENS (C. W.), BLACKMAN (G. E.). — Inhibition of growth of apical meristems by ethyl phenyl carbamates. *Nature*, (G. B.), 166, 954-955, 1950.
- (14) KINGDON (H. S.), WEBSTER (L. T.), DAVIE (E. D. Jr.). — Enzymatic formation of adenylyl tryptophane : isolation and identification. *Proc. Nat. Ac. Sci.*, 44, 757-765, 1958.
- (15) LOOMIS (W. F.), LIPMANN (F.). — Reversible inhibition of the coupling between phosphorylation and oxydation. *J. Biol. Chem.*, 173, 807-808, 1948.
- (16) LOSADA (M.), TREBST (A. V.), ARNON (D. I.). — Photosynthesis by isolated chloroplasts. — XI : CO<sub>2</sub> Assimilation in a reconstituted chloroplast system. *J. Biol. Chem.*, 235, 832-839, 1960.
- (17) MÉNORET (Y.). — Action de l'acide 2.4. dichlorophenoxy acétique sur le métabolisme azoté des tissus de carotte cultivés *in vitro*. Thèse, Paris, 23-1-1960.
- (18) MORELAND (D. E.), GENTNER (W. A.), HILTON (L. J.) HILL (K. L.). — Studies on the mechanism of herbicidal action of 2 chloro-4-6 bis (éthylamino)s-triazine. *Plant Physiology*, 34, 432-435, 1959.
- (19) MORELAND (D. E.), HILL (K. L.). — The action of Alkyl N Phenylcarbamate on the Photolytic activity of Isolated chloroplasts. *Ag. and Food Chem.*, 7, 832-837, 1959.
- (20) MORELAND (D. E.), HILL (K. L.). — Interference of herbicides with the Hill reaction of isolated chloroplasts. *Weeds*, 10, 229-236, 1962.
- (21) MORELAND (D. E.), HILL (K. L.). — Inhibition of Photochemical activity of isolated chloroplasts by acylanilide. *Weeds*, 11, 55-60, 1963.
- (22) MORRIS (M. P.), GONZALES MAS (A.). — A simple colorimetric method for the determination of nitrates in forage crops. *Ag. and Food Chemistry*, 6, 456-457, 1958.
- (23) MOYSE (A.). — Le métabolisme protidique des plantes (2<sup>e</sup> partie). *Année Biologique*, 3<sup>e</sup> série, 27, 581-649, 1951.
- (24) STENLID (G.), SADDIK (K.). — The effect of some growth Regulators and Uncoupling Agents on Oxidative Phosphorylation in mitochondria of Cucumbers Hypocotyls. *Phys. Plant.*, 15, 369-379, 1962.
- (25) TREBST (A. V.), TSUJIMOTO (H. Y.), ARNON (D. I.). — Separation of Light and Dark Phases in the Photosynthesis of isolated chloroplasts. *Nature*, 182, 351-355, 1958.