

## PROPRIETES DES EXTRAITS AQUEUX DE CHLOROPLASTES AYANT UN MAXIMUM D'ABSORPTION A 740 m $\mu$ .

JACQUES AGHION

*Laboratoire du Phytotron, Gif-sur-Yvette, Seine et Oise (France)*

(Reçu le 13 septembre, 1962)

### SUMMARY

*Properties of aqueous extracts of chloroplasts with an absorbancy maximum at 740 m $\mu$*

The absorption spectrum of a detergent-buffer extract of tobacco chloroplasts is shifted toward the long-wavelength region (bathochromic shift) by a treatment with alcoholic or acetonnic solutions in water. This shift of the absorbancy maximum, from 668 to 740 m $\mu$  is due to the crystallization of chlorophyll molecules on chloroplast-protein particles. It is shown that the solvent acts on the whole protein-pigment complex. This aggregation of chlorophyll is proved to be in the range of  $10^9$  molecules per particle.

A possible relationship between this property of chlorophyll and its role in the first steps of photosynthesis is outlined, as well as the similarity between the spectra here shown by chlorophyll as solvent effects, and those shown by "phytochrome" as light effects.

### INTRODUCTION

Des broyats de feuilles vertes fixées dans des alcools divers bouillants puis dilués dans l'eau présentent d'emblée une absorption à 740 m $\mu$  au lieu de celle que la chlorophylle leur donne à 668 m $\mu$  environ<sup>1</sup>. En présence de concentrations convenables d'alcools divers, l'absorption d'une suspension aqueuse de chloroplastes de tabac montre un déplacement bathochromie<sup>2</sup> identique.

Le présent article a pour objet de préciser certaines modalités de cette transformation.

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les chloroplastes de *Nicotiana tabacum* (Wisconsin 38) sont extraits des feuilles par une méthode classique<sup>3</sup> dans une solution tamponnée de phosphates. Alors ils sont centrifugés à 5000  $\times g$  pendant 10 min et remis en suspension dans une solution de 0.01 M phosphates, contenant du détergent, et tamponnée à pH compris entre 7.8 et 8.0. Après une agitation de quelques instants, cette solution est centrifugée à 20000  $\times g$  pendant 20 min. L'expérimentation porte sur le fluide surnageant, limpide au microscope et vert plus ou moins foncé. Le spectre d'absorption en est

classiquement celui d'un extrait de feuilles vertes avec un pic à  $6680 \text{ \AA}$ ; excitée en lumière ultraviolette, cette solution émet une intense fluorescence rouge vif.

Les détergents utilisés sont le dodécyl-sulfonate de sodium à la concentration de  $0.004 \text{ M}$ , ou la digitonine à  $0.001 \text{ M}$ . Dans les deux cas, les résultats sont qualitativement identiques; il faut noter toutefois que la digitonine extrait des chloroplastes moins de pigments que le dodécyl-sulfonate de sodium<sup>4</sup>. C'est pourquoi ce dernier a été employé presque exclusivement au cours du travail qui suit.

Une telle préparation est utilisable telle quelle pendant plusieurs jours avant de perdre ses propriétés ou de former des phaeophytines. Sa conservation est, par contre, très durable—plusieurs mois—après lyophilisation.

Les solvants utilisés ont tous été redistillés: les alcools sur baryte anhydre ou potasse, et l'acétone sur  $\text{KMnO}_4$  puis sur  $\text{AgNO}_3$ . Enfin, les mesures d'absorption sont faites avec un spectrophotomètre enregistrateur à répétition de balayage Beckman modèle DK 2.

#### RÉSULTATS

Un extrait aqueux de chloroplastes ainsi préparé est trop concentré pour être lu directement dans le spectrophotomètre; il est nécessaire de le diluer environ 10 fois dans l'eau; son spectre d'absorption n'est nullement changé par une telle manœuvre. Si par contre il est dilué dans la même proportion, mais par un mélange de méthanol et d'eau tel que la concentration finale de méthanol soit de 57.5% (v/v), la bande d'absorption à  $668 \text{ m}\mu$  disparaît lentement et il apparaît, en compensation, une bande qui prend de l'importance à  $730-740 \text{ m}\mu$ . La Fig. 1 montre cette transformation du spectre au cours du temps; elle met également en évidence que ces spectres forment une famille de courbes ayant un point commun (point isobestique) à  $680-690 \text{ m}\mu$  et un autre, un peu moins net, vers  $600 \text{ m}\mu$ . Simultanément, la préparation qui était verte, foncée, limpide et intensément fluorescente, devient jaunâtre, trouble

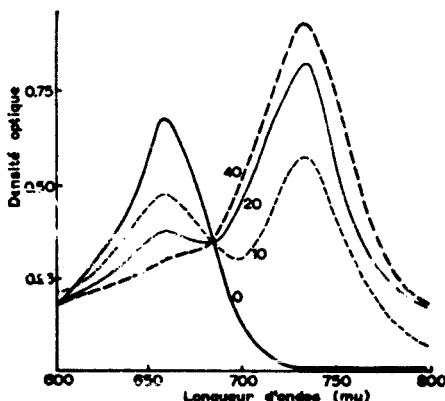


Fig. 1. Quelques spectres au cours de la transformation de chlorophylle en  $C_{740}$ . Noter le point de concours (point isobestique) de toutes ces courbes à  $685 \text{ m}\mu$ . Sur les courbes sont portés les temps (en minutes après le début de l'expérience) auxquels les spectres ont été faits.

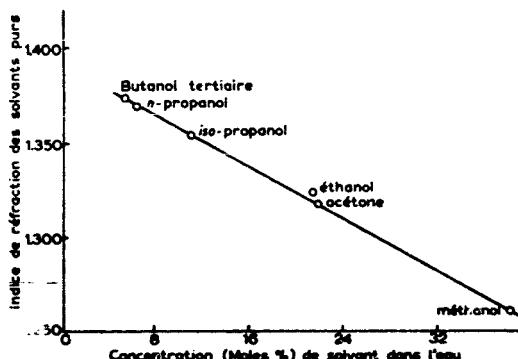


Fig. 2. Relation entre les indices de réfraction des solvants purs et leur concentration optimale pour le déroulement de la réaction  $C_{668} \rightarrow C_{740}$ .

et sa fluorescence tombe progressivement à zéro lorsque toute la chlorophylle se trouve sous la forme  $C_{740}$ .

Ces résultats sont répétables identiquement avec d'autres solvants que la méthanol; comme dans les expériences de LIPPINCOTT<sup>1</sup>, divers alcools, ainsi que l'acétone, se sont révélés propres à provoquer la transformation du spectre de la chlorophylle. (voir Fig. 2). De plus, si l'on porte sur un graphique, en ordonnées les indices de réfraction des solvants purs, et en abscisses les concentrations molaires optimales (en fractions molaires) des solvants pour la transformation de la chlorophylle en  $C_{740}$ , il apparaît que la relation entre ces deux grandeurs est linéaire, comme dans le cas décrit précédemment<sup>1</sup>. On note également sur cette Fig. 2 que l'indice de réfraction du mélange, dans tous les cas, est le même.

Lorsque toute la chlorophylle est transformée en  $C_{740}$  il est possible de centrifuger ( $20000 \times g$  pendant 20 min) le mélange méthanol-eau-chlorophylle dans lequel s'est faite la réaction, de façon à isoler  $C_{740}$  des autres pigments de la préparation. Le culot de centrifugation contient ce pigment que l'on peut remettre en suspension dans l'eau après quelques lavages dans l'eau par des centrifugations successives. La suspension de  $C_{740}$  ainsi obtenue est trouble, jaunâtre et n'émet aucune fluorescence. Sur cette préparation plusieurs réversions de la réaction "directe" sont expérimentées:

(a) L'addition à cette suspension aqueuse d'un excès de solvant choisi parmi ceux qui ont permis d'établir la Fig. 2 suffit à ramener l'absorption de la solution à  $668 \text{ m}\mu$  réversiblement; en ce sens que l'addition d'eau dans cette nouvelle suspension de chlorophylle, de façon à ramener la concentration de solvant à sa valeur optimale, permet à nouveau de parcourir les étapes de la réaction "directe". Cette réversion est plusieurs fois répétable, jusqu'à une trop grande dilution des pigments: alors le spectrophotomètre n'enregistre plus de variations de l'absorption.

(b) Les solvants non polaires (éther éthylique, éther de pétrole, hexane, benzène, méthylcellosolve...) extraient de façon irréversible la chlorophylle dans la phase hydrophobe; aucune réversion n'est alors possible.

(c) En présence d'éthanol ou de méthanol à une concentration trop faible pour transformer la chlorophylle en  $C_{740}$ , une suspension aqueuse de ce dernier pigment reste telle quelle. Si cependant elle est chauffée à  $75^\circ$  environ, son pic d'absorption est transféré à  $668 \text{ m}\mu$ . Alors la refroidir à 20 ou  $25^\circ$  suffit à rétablir l'absorption à  $740 \text{ m}\mu$ , et ainsi de suite, plusieurs fois.

(d) Enfin, la lyophilisation d'une suspension aqueuse de  $C_{740}$  transforme cette préparation en une légère poudre verte qui, remise en suspension dans l'eau, présente une absorption à  $668 \text{ m}\mu$  exclusivement, et se trouve être fluorescente. Cette préparation est alors prête à subir toutes les réactions décrites jusqu'ici, et il est permis de penser que la lyophilisation, ici, a remis la chlorophylle dans les conditions exactes où elle se trouve après la lyophilisation de l'extrait initial aux détergents (voir la section MATÉRIEL ET MÉTHODES).

Observée au microscope, une préparation de  $C_{740}$  dans l'eau est composée de petites sphères vertes, de  $7-10 \mu$  de diamètre environ. Lorsque l'eau est éliminée de la préparation microscopique et remplacée par de l'éthanol ou de l'acétone, la chlorophylle se répand dans toute la préparation, et les particules initiales sont décolorées; elles subsistent toutefois, fantômes incolores sur le fond bleu-vert de la préparation (on se souvient que dans ces conditions, la préparation absorbe à  $668 \text{ m}\mu$ ).

Si donc, dans une préparation de  $C_{740}$  la chlorophylle est agrégée, elle l'est sur

des particules de lipo-protéines ou de protéines. Comme, par la méthode de LOWRY *et al.*<sup>5</sup> il a été montré que dans une telle suspension, le rapport du poids de chlorophylle à celui des protéines (référence : sérumalbumine de cheval) est voisin de 1 : 10, et que d'autre part, cette préparation, lyophilisée, pèse moins de 11 fois son poids de chlorophylle, il est plausible d'imaginer que le seul constituant des fantômes incolores observés ci-dessus est protéique. De plus, cette hypothèse est confirmée par le fait que mélanger une solution acétonique de chlorophylle avec une suspension des protéines du chloroplaste, puis diluer dans l'eau de façon à arriver à la concentration optimale d'acétone favorisant la réaction chlorophylle  $\rightarrow$   $C_{740}$  permet effectivement d'obtenir du  $C_{740}$  "synthétique" en quelque sorte.

Il semble ainsi établi que les protéines du chloroplaste suffisent à la réaction étudiée ici, et qui est impossible avec la chlorophylle pure sans support. Il semble vraisemblable que d'autres protéines ont la même propriété, puisque la chlorophylle absorbée sur des protéines aussi éloignées de celles des chloroplastes que la sérum-albumine de boeuf ou le blanc d'oeuf possède encore des propriétés photochimiques (réaction de HILL)<sup>6</sup>.

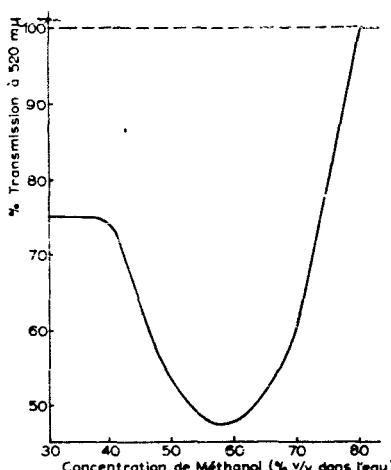


Fig. 3. Action du solvant sur (a) le complexe total (trait plein) et (b) le support protéique seul (tirets). La turbidité du support n'est pas changée par les diverses concentrations de méthanol; seul le "complexe total" subit les effets du solvant.

La transformation de chlorophylle en  $C_{740}$  consiste donc en un réarrangement des molécules de chlorophylle sur des particules protéiques sous l'effet des solvants divers utilisés. La Fig. 3 montre que le solvant n'agit pas plus sur le substratum seul, que sur les pigments seuls. Il n'agit que sur l'ensemble (l'association moléculaire) chlorophylle-protéine. La figure montre en effet que seule cette association présente un maximum de turbidité à la concentration de solvant qui par ailleurs permet la formation de  $C_{740}$ .

L'action plus précise du solvant est étudiée par quelques expériences utilisant du [ $^{14}\text{C}$ ]méthanol; si une préparation initiale dans les détergents est additionnée de méthanol contenant une certaine proportion de méthanol marqué, après centrifugation de  $C_{740}$  lorsqu'il s'est formé, la radioactivité reste, en partie, fixée au culot de centrifuge.

gation, c'est à dire à cette forme agrégée de chlorophylle. Lorsque dans ces conditions la chlorophylle est séparée de son support protéique par de l'éther éthylique par exemple, la phase éthérée contient encore de la radioactivité; en fait il semble que chaque molécule de chlorophylle fixe environ une molécule de méthanol; ces expériences pour n'être pas encore assez précises donnent néanmoins des indications sur la manière dont les solvants peuvent être utilisés dans la transformation de chlorophylle en C<sub>740</sub>.

Afin d'assigner un état physique déterminé à la chlorophylle dans les préparations de C<sub>740</sub>, un extrait typique aux détergents est mis en présence de méthanol et amené de la sorte à se transformer en une préparation de C<sub>740</sub>. Celui-ci est séparé des autres pigments par centrifugation comme il est indiqué plus haut, et déposé sur une lame de microscope, en couche d'épaisseur aussi régulière que possible. Après dessiccation, l'absorption de cette préparation est observée: elle se trouve toujours à 740 m $\mu$ , ce qui prouve que le dessiccation n'était pas complète. Ensuite, cette lame de microscope est mise sur la trajet du faisceau d'un appareil à diffraction de rayons-X: le spectre de diffraction ainsi obtenu est identique à celui donné par JACOBS *et al.*<sup>7</sup>. Il paraît donc établi que la chlorophylle adsorbée sur les particules protéiques pour former C<sub>740</sub> est, ici, cristallisée.

Enfin par observation microscopique il est possible de mesurer le diamètre, donc la surface des particules composant la suspension de C<sub>740</sub> et par un dosage à l'acétone, de connaître la quantité de chlorophylle (*a* + *b*) contenues dans cette suspension. Ainsi il est facile de calculer que chaque particule est recouverte d'environ 10<sup>9</sup> molécules de chlorophylle, ce qui, en considérant que chaque molécule occupe une surface d'environ 100–200 Å<sup>2</sup> (ref. 7), signifie l'équivalent de 10 ou 15 monocouches de pigments sur chaque particule.

Il est donc établi que la formation de C<sub>740</sub> est due à la cristallisation de chlorophylle sur des particules protéiques; la réversion donnant à nouveau la chlorophylle, qui吸吸 à 668 m $\mu$ , elle remet la chlorophylle en solution dans le milieu. Ces réactions se faisant à la température ordinaire, ne relèvent pas de la classique chimie, mais contribuent plutôt à la formation ou à la destruction d'associations moléculaires faibles, puisque les déplacements de l'équilibre C<sub>668</sub> → C<sub>740</sub> sont extrêmement faciles. Il paraît donc très vraisemblable, bien que rien ne le prouve encore, que la liaison de la chlorophylle avec les protéines se fasse par des ponts-hydrogène. Les points d'attache de ces liaisons restent à trouver.

GOVINDJEE<sup>8</sup> a découvert dans diverses algues monocellulaires, des pigments absorbant dans la région des longueurs d'ondes de l'infra rouge proche (730–750 m $\mu$ ) et il attribue de telles absorptions soit à des microcristaux de chlorophylle, soit au "phytochrome", le pigment photomorphogénique découvert et isolé par BUTLER<sup>9</sup>.

ARNOLD *et al.*<sup>10</sup> ont montré que les premières étapes de la photosynthèse sont vraisemblablement réduites à la séparation, sous l'effet de la lumière d'un électron et d'un trou, au sein de la molécule de pigment, à l'image des phénomènes caractéristiques des semi-conducteurs. Or, en général, les semi-conducteurs sont cristallins; il n'est donc pas impossible que la cristallisation de chlorophylle sur des protéines du chloroplaste soit un phénomène essentiel des premières étapes de la photosynthèse. On peut, par exemple, imaginer que la lumière agit sur l'environnement des molécules de chlorophylle comme les solvants dans nos expériences.

## REMERCIEMENTS

L'auteur tient à remercier Messieurs J. DURANTON et E. ROUX de leur aide et de leurs constants encouragements. Le Professeur J. BARRAULT a bien voulu réaliser les spectres de diffraction de rayons-X. Le Docteur NITSCH et le Professeur CHOUPARD ont mis à sa disposition les installations du laboratoire du Phytotron. Enfin, le Professeur LAVOREL s'est intéressé de très près à ce travail, aidant à son développement.

## RÉSUMÉ

Traité par des solutions aqueuses d'alcools ou d'acétone, un extrait de chloroplastes de tabac dans une solution tamponnée de détergent manifeste un déplacement de son pic d'absorption vers les grandes longueurs d'ondes. Ce déplacement qui amène le pic de  $668 \text{ m}\mu$  à  $740 \text{ m}\mu$  est dû à la cristallisation des molécules de chlorophylle sur des particules de protéines chloroplastiques. L'action du solvant s'exerce sur l'ensemble chlorophylle-protéines; enfin chaque particule contient environ  $10^8$  molécules de chlorophylle.

Il est suggéré que cette propriété de la chlorophylle peut expliquer les premières étapes de la photosynthèse. De plus, il est remarquable que la chlorophylle présente réversiblement, sous l'action de solvants divers, les pics d'absorption que le "phytochrome" présente réversiblement sous l'action de la lumière.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> J. A. LIPPINCOTT, J. AGHION, E. PORCILE ET W. F. BERTSCH, *Arch. Biochem. Biophys.*, 98 (1962) 17.
- <sup>2</sup> J. AGHION, J. A. LIPPINCOTT ET E. PORCILE, *Compt. Rend.*, 251 (1960) 2072.
- <sup>3</sup> D. I. ARNON, M. D. ALLEN ET F. R. WHATLEY, *Biochim. Biophys. Acta*, 20 (1956) 449.
- <sup>4</sup> E. L. SMITH ET E. G. PICKELS, *J. Gen. Physiol.*, 24 (1941) 753.
- <sup>5</sup> O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR ET R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- <sup>6</sup> D. I. SAPOZHNIKOV ET T. G. MASLOWA, *Ts. Inst. Botan. Akad. Nauk SSSR Ser. IV*, 11 (1956) 97.
- <sup>7</sup> E. E. JACOBS, A. E. VATTER ET A. S. HOLT, *Arch. Biochem. Biophys.*, 53 (1954) 228.
- <sup>8</sup> R. GOVINDJEE, C. CEDERSTRAND ET E. RABINOWITCH, *Science*, 134 (1961) 391.
- <sup>9</sup> W. L. BUTLER, K. H. NORRIS, H. W. SIEGELMANN ET S. B. HENDRICKS, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 45 (1959) 1703.
- <sup>10</sup> W. A. VOLD ET R. CLAYTON, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 46 (1960) 769.