

BBA 45549

ÉTUDE DE L'INDUCTION DE FLUORESCENCE DES ALGUES VERTES ET DES CHLOROPLASTES AU DÉBUT D'UNE ILLUMINATION INTENSE*

RENÉ DELOSME

Institut de Biologie Physico-chimique, Paris (France)

(Reçu le 17 novembre, 1966)

SUMMARY

Studies on the induction of fluorescence in green algae and chloroplasts under intense illumination

1. Green algae or isolated chloroplasts, when subjected to intense illumination after a long dark period, emit a fluorescence whose intensity rises from a minimum to a maximum level. A method for very rapid recording of the fluorescence permits the observation of two phases during this rise; the first phase is photochemical whilst the second is thermal.

2. The photochemical phase corresponds to the destruction of a quencher Q which is the primary reactant of the photoreaction II in photosynthesis (associated with O₂ emission). This reaction involves energy transfers between chlorophyll molecules and photochemical centres. A mathematical analysis of fluorescence-time curves is followed by a discussion on the nature and efficiency of these transfers.

3. The thermal phase corresponds to the destruction of a quencher R. The effect of inhibitors of O₂ emission on the fluorescence yield suggests that this quencher is associated with a pool of oxidant located between the two photochemical systems.

INTRODUCTION

L'étude de la fluorescence chlorophyllienne *in vivo* est très utile dans les recherches sur les mécanismes physiques de la photosynthèse, aussi les travaux sur ce sujet sont-ils nombreux. La fluorescence rouge des végétaux chlorophylliens est émise en majorité par une chlorophylle particulière (chlorophylle *a*₂)^{1,2}, directement impliquée dans la réaction photochimique d'oxydation de l'eau (réaction photochimique II, accompagnée d'un dégagement d'O₂). L'intensité de la fluorescence est en relation étroite avec la vitesse de cette réaction^{3,4}, non seulement à l'état stationnaire, mais aussi pendant la période transitoire consécutive à toute variation de lumière. L'intérêt de cette induction de fluorescence est qu'elle permet de suivre à chaque instant l'évolution des centres actifs responsables de la réaction photochimique. Cependant, l'induction de fluorescence est un phénomène complexe en relation

Abréviations: CMU, 3(4-chlorophényl)-1,1-diméthylurée; DCMU, 3(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée.

* Ce travail fait partie de la préparation d'une thèse de Doctorat-ès-Sciences qui sera présentée à la Faculté des Sciences de Paris.

avec plusieurs réactions, les unes photochimiques, les autres thermiques. Lorsqu'on illumine une suspension d'algues vertes unicellulaires ou de chloroplastes isolés, après une longue période d'obscurité, on observe d'abord une montée de fluorescence, qui est elle-même un phénomène composite, et dont l'analyse cinétique n'est pas simple⁵⁻⁷. MORIN⁷ a montré que sous illumination très intense cette montée initiale se décompose en deux phases: une phase photochimique suivie d'une phase thermique; la séparation de ces deux phases est bien marquée si la vitesse de réaction photochimique est très grande devant les vitesses de réactions thermiques, comme c'est le cas en lumière excitatrice très intense. L'objet du présent article est une étude plus approfondie de ces deux phases de montée de la fluorescence.

MÉTHODES

La Fig. 1 est un schéma de l'appareil mis au point pour l'enregistrement de la fluorescence d'une suspension d'algues microscopiques ou de chloroplastes pendant le début d'une illumination très intense. Cet appareil est inspiré de celui de MORIN⁷, dont la principale originalité est un système d'ouverture très rapide du faisceau lumineux: il faut en effet que le temps d'ouverture soit négligeable devant la durée du phénomène le plus rapide que l'on veut observer. MORIN a enregistré des courbes de fluorescence dont le temps de demi-montée était de 0.2 msec, l'ouverture du faisceau étant réalisée en 30 μ sec environ. L'intérêt des résultats obtenus justifiait une amélioration de cette technique. Le temps d'ouverture actuellement réalisé est de 5 μ sec (Fig. 2), et l'on peut étudier convenablement une courbe de fluorescence dont le temps de demi-montée atteint 50 μ sec (Fig. 3). On a obtenu ce résultat au moyen du dispositif suivant (Fig. 1). La source lumineuse S est une lampe à arc au xénon (Osram XBO, puissance électrique 1 kW). Un doublet achromatique convergent L_1 donne de cet arc une petite image S_1 . Dans le plan de cette image, on place un petit écran métallique E normal à l'axe optique. Cet écran peut être expulsé à grande vitesse par une balle de carabine (Anschutz 22 long rifle, cartouches 22 double

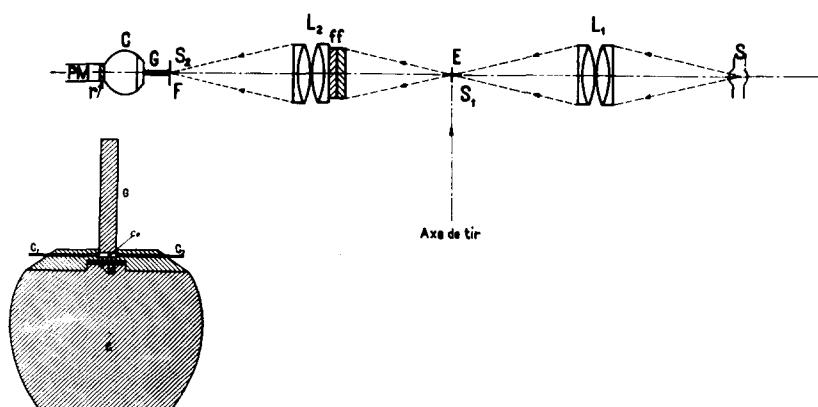


Fig. 1. Dispositif d'étude de l'induction de fluorescence au début d'une illumination intense. S, lampe à arc; L_1 , L_2 , lentilles; S_1 , S_2 , images de l'arc; E, écran éjectable; ff, filtres bleus; F, fente; G, guide de lumière; C, collecteur de fluorescence; r, filtres rouges; PM, photomultiplicateur; M, miroir; Ce, cellule d'expérience; C_1 , C_2 , canaux de remplissage de la cellule. L'éclairement maximum sur la face d'entrée de la cellule est voisin de 5 W/cm².

culot (bosquettes)) (l'axe de tir étant perpendiculaire à l'axe optique). Un second doublet achromatique L_2 , donne de S_1 une image S_2 , que l'on diaphragme au moyen d'une fente F . Le temps d'ouverture du faisceau est déterminé par la largeur de la fente F et par la vitesse de la balle. Il est donc d'autant plus court que la section des images S_1 et S_2 est plus petite. C'est pourquoi on a cherché à réduire les aberrations du système optique (doublets achromatiques).

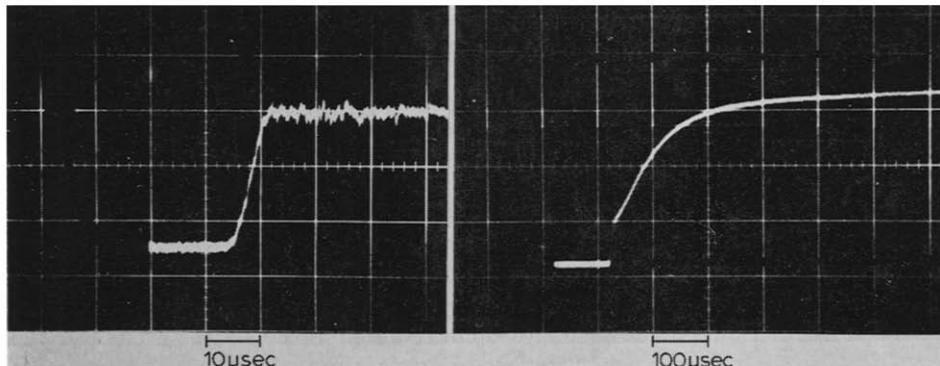


Fig. 2. Ouverture du faisceau lumineux (enregistrement oscillographique). Cellule d'expérience vide.

Fig. 3. Variation initiale de la fluorescence chez Chlorella, en présence de 0.5 mM orthophénanthroline (enregistrement oscillographique). Flux lumineux absorbé: $1.5 \cdot 10^{-2}$ Einstein/sec · g de poids sec, soit 0.3 Einstein/sec · g de chlorophylle.

Avant d'atteindre la cellule d'expérience, la lumière est homogénéisée par réflexions successives dans un guide de lumière G , dont le diamètre (4 mm) est celui de la face d'entrée de la cellule. La lumière excitatrice comprend une large bande de l'émission de l'arc (de 400 à 600 $\text{m}\mu$ environ), condition indispensable d'une illumination suffisamment intense. Des filtres bleus à bande large (Schott BG 38), ff, éliminent les radiations rouges et infrarouges. Au-delà de la face de sortie de la cellule est placé un miroir plan M , qui réfléchit vers l'arrière toute la lumière transmise par la suspension. La lumière fluorescente émise latéralement est au contraire dirigée, par réflexion totale sur les parois polies du collecteur de fluorescence C , vers la cathode d'un photomultiplicateur (Radiotechnique 150 CVP, alimentation haute tension stabilisée Fontaine H 1510) sensible aux radiations rouges et infrarouges. Une série de filtres rouges (Schott RG 8 + Wratten 97) élimine, juste avant l'entrée du photomultiplicateur, la lumière incidente diffusée. On donne au courant de sortie du photomultiplicateur une intensité voisine du maximum admissible, afin de diminuer l'importance relative du bruit créé par les photoélectrons.

La tension de sortie du photomultiplicateur, proportionnelle à l'intensité de la fluorescence, est appliquée à l'entrée d'un oscilloscopie cathodique (Oscilloscope Ribet-Desjardins 251 A, tiroir TD1, temps de montée < 0.4 μsec , enregistreur 1000 A; dos photographique Polaroid).

La Fig. 2 montre comment varie l'éclairement de la cellule de mesure au moment de l'ouverture du faisceau lumineux. L'éclairement atteint en 5 μsec une valeur stationnaire.

Toutes les expériences décrites ici ont eu lieu dans les conditions suivantes: un

barbotage d'air comprimé dans le réservoir contenant la suspension d'algues ou de chloroplastes en assure l'aération; le séjour de l'échantillon dans la cellule d'expérience est suffisamment court, et la concentration suffisamment faible ($25\text{--}100 \mu\text{g}$ de chlorophylle par ml) pour que l'appauvrissement en O_2 soit négligeable en cours d'expérience. Les phénomènes seraient sensiblement différents pour une suspension de Chlorella maintenue en anaérobiose.

Enregistrement des courbes de fluorescence

MORIN⁷ a montré qu'aux fortes intensités lumineuses, la montée de fluorescence débute toujours par une phase photochimique (temps de demi-montée: 0.2 msec pour $4 \cdot 10^{-3}$ Einstein absorbé par g·sec), suivie généralement d'une phase thermique beaucoup plus lente (temps de montée: 0.2–0.5 sec). Pour étudier avec précision l'ensemble de ces phénomènes, dont la durée totale est de l'ordre de la seconde, on a eu recours à deux types d'enregistrement:

(i) la base de temps étant fournie par l'oscilloscope, chaque expérience donne lieu à plusieurs enregistrements successifs sur des échelles de temps différentes (Fig. 4a). Cela suppose d'assez nombreuses répétitions de chaque expérience, pour une quantité d'information chaque fois très fragmentaire. En outre, certains facteurs peuvent varier d'un enregistrement à l'autre;

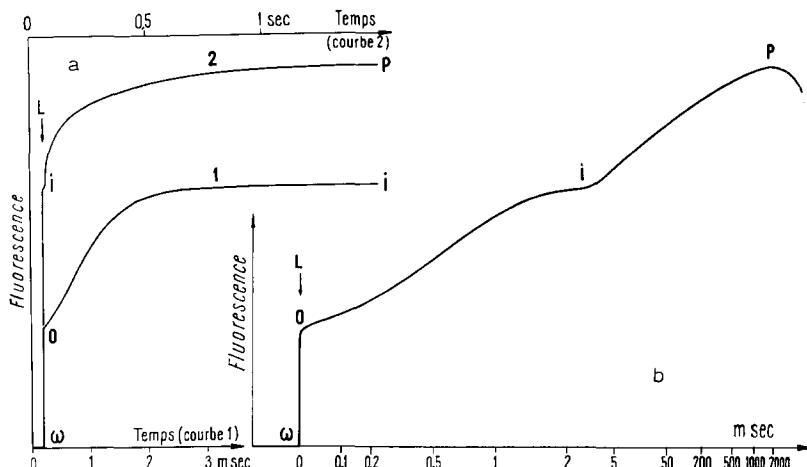


Fig. 4. Les deux phases de montée de la fluorescence chez Chlorella sans inhibiteur. Flux lumineux: $0.3 \text{ Einstein/sec} \cdot \text{g}$ de chlorophylle. (a) Courbes fluorescence-temps pour deux vitesses de balayage. (b) Courbes de fluorescence en fonction d'une tension de balayage $v(t) = V_1 e^{-t/R_1 C_1} + V_2 e^{-t/R_2 C_2}$, avec $R_1 C_1 = 2 \text{ msec}$, et $R_2 C_2 = 0.4 \text{ sec}$.

(2) il est souvent plus rationnel de remplacer la base de temps de l'oscilloscope par une fonction du temps $v(t)$, dont la variation est analogue à celle du phénomène étudié. Dans de nombreuses expériences, on a choisi comme tension de balayage une tension continue de la forme:

$$v(t) = V_1 e^{-t/R_1 C_1} + V_2 e^{-t/R_2 C_2}$$

fournie par la décharge de deux condensateurs de capacités C_1 et C_2 dans deux résistances R_1 et R_2 , les constantes de temps $R_1 C_1$ et $R_2 C_2$ étant proportionnelles aux temps de montée des deux phases d'évolution de la fluorescence.

La tension $v(t)$ étant appliquée en déviation horizontale, et la tension de sortie du photomultiplicateur (proportionnelle à l'intensité de fluorescence) en déviation verticale, on obtient sur l'écran de l'oscillographie une courbe qui se rapproche d'autant plus d'un segment de droite que la fonction $v(t)$ est une meilleure approximation du phénomène $f(t)$. Une telle courbe se trouve représentée sur la Fig. 4b. Comme on connaît la fonction $v(t)$, une transformation simple permet de rétablir les courbes de fluorescence en fonction du temps.

PRINCIPAUX RÉSULTATS

Les deux phases de croissance

Dans la suite, les niveaux de fluorescence remarquables seront désignés par des lettres, conformément à la nomenclature proposée par LAVOREL^{5,9}: O, niveau de fluorescence au temps zéro de l'illumination; P, niveau de fluorescence maximum; I, niveau de fluorescence intermédiaire entre la phase photochimique (OI) et la phase thermique (IP).

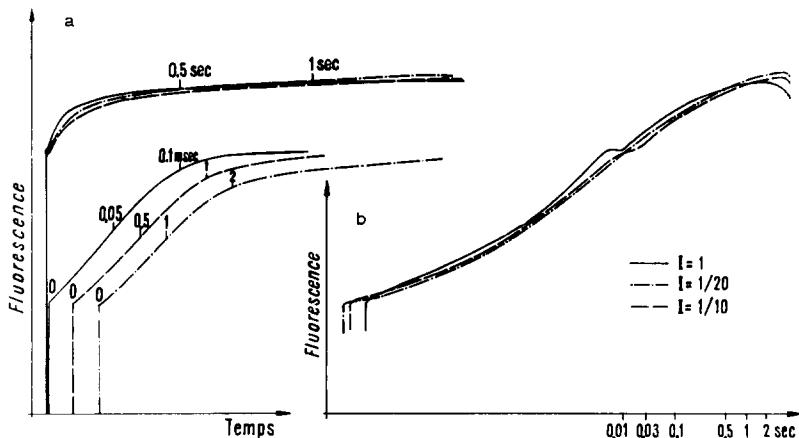


Fig. 5. Effet de l'intensité d'illumination sur les deux phases de croissance. $I = 1$ correspond à 0,3 Einstein absorbé par g de chlorophylle et par sec. (a) Rendement de fluorescence en fonction du temps, pour trois valeurs du flux lumineux. Courbes inférieures: phase photochimique. Courbes supérieures: phase thermique. (b) Rendement de fluorescence en fonction d'une tension de balayage $v(t) = V_1 e^{-t/R_1 C_1} + V_2 e^{-t/R_2 C_2}$; les valeurs de $R_1 C_1$ et $R_2 C_2$ sont données par le Tableau I. Au-delà de 1 sec d'illumination, on observe chez Chlorella un déclin de fluorescence d'autant plus rapide que l'illumination est plus intense, d'où la divergence des courbes au-delà de 1 sec.

Par définition, au cours de la phase photochimique, le rendement de fluorescence à un instant t est entièrement déterminé par le nombre de photons déjà absorbés par le système, soit $I \cdot t$ (I , nombre de photons absorbés par unité de temps). Au cours de la phase thermique, au contraire, le rendement de fluorescence ne dépend plus du nombre de photons absorbés. Ces propriétés sont mises en évidence par l'expérience de la Fig. 5, dans laquelle on a donné au flux lumineux trois valeurs différentes. On a utilisé dans le diagramme de droite le balayage "analogique" décrit plus haut. Pour les trois valeurs du flux lumineux, on a appliqué trois tensions de balayage différentes, dont la variation en deux phases est déterminée par les constantes de temps électriques données par le Tableau I.

TABLEAU I

I_{rel}	$R_1 C_1$ (sec)	$R_2 C_2$ (sec)
1	$1 \cdot 10^{-4}$	0.4
$1/10$	$1 \cdot 10^{-3}$	0.4
$1/20$	$2 \cdot 10^{-3}$	0.4

Ainsi, en choisissant la première constante de temps inversement proportionnelle au flux lumineux, tandis que la seconde constante de temps est maintenue invariable, on obtient trois courbes identiques (Fig. 5b). Il est donc clair que la première partie de ces courbes correspond à un phénomène photochimique, tandis que la seconde correspond à un phénomène thermique (indépendant du flux lumineux).

En lumière très intense, une faible diminution de fluorescence apparaît souvent entre les deux phases de croissance (Fig. 6). Cette "oscillation" rappelle un phénomène analogue décrit par KAUTSKY, APPEL ET AMANN¹⁰ chez Chlorella en anaérobiose (*cf.* aussi réf. 4). Mais le phénomène décrit ici est observé en aérobiose, comme tous ceux dont il est question dans le présent travail.

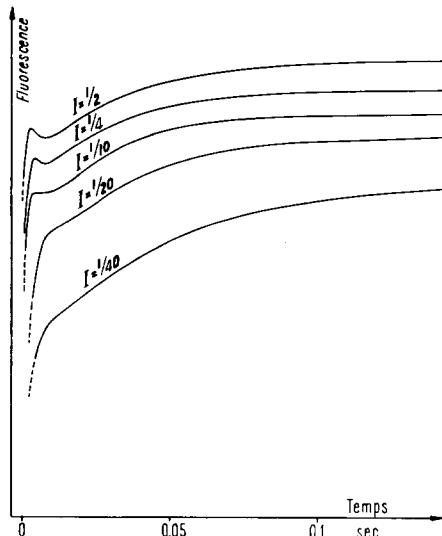


Fig. 6. Effet de l'intensité d'illumination sur la séparation des deux phases de croissance. Aux très fortes intensités, on observe une oscillation caractéristique. Pour la clarté de la figure, on a décalé les différentes courbes parallèlement à l'axe des ordonnées. En réalité, le niveau de fluorescence correspondant à la séparation des deux phases (niveau I dans le texte) est le même pour les quatre intensités les plus fortes ($I = 1/2$, $I = 1/4$, $I = 1/10$ et $I = 1/20$). Pour $I = 1/40$, le niveau de séparation est nettement plus bas, et la seconde phase est plus développée.

Un des résultats les plus frappants de l'expérience de la Fig. 5 est le niveau invariable I de la séparation entre les deux phases de montée de la fluorescence: dans l'intervalle de flux lumineux considéré, les amplitudes respectives des deux phases sont indépendantes du flux lumineux. Il importe donc de bien distinguer l'évolution de fluorescence en forte lumière et l'évolution observée par d'autres auteurs⁶ en faible lumière (existence d'une phase photochimique et d'une phase thermique, mais niveau de séparation d'autant plus élevé que l'illumination est plus intense).

L'amplitude relative de la phase thermique est variable suivant les préparations. Elle peut être aussi importante que celle de la phase photochimique (chloroplastes d'Épinard, certaines cultures de *Chlorella pyrenoidosa*), ou au contraire à peine visible.

Effet d'inhibiteurs de la photosynthèse sur l'évolution de la fluorescence (Figs. 7 et 8)

Certaines substances connues pour inhiber l'émission d' O_2 (réaction II), telles que l'orthophénanthroline ou certaines urées substituées (CMU, DCMU), ont la propriété de supprimer la phase thermique, et d'augmenter la phase photochimique. Ce phénomène a été signalé par MORIN⁷ dans le cas de l'orthophénanthroline. Il avait été observé par KAUTSKY, APPEL ET AMANN¹⁰ dans des conditions expérimentales différentes (illumination moins intense), où la séparation des deux phases n'était pas totale.

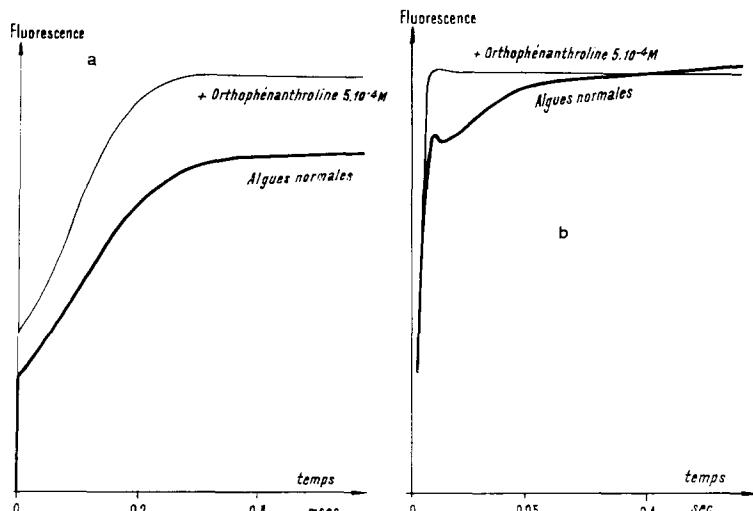


Fig. 7. Effet de l'orthophénanthroline (0.5 mM) sur la montée de fluorescence chez *Chlorella*. (a) Effet sur la phase photochimique. (b) Effet sur la phase thermique. L'effet du CMU (ou du DCMU) est identique à celui de l'orthophénanthroline.

On observe d'autre part une augmentation significative du niveau initial de fluorescence (niveau O) en présence de ces substances⁶. Autrement dit, la courbe de fluorescence en présence d'inhibiteur est située au-dessus de la courbe de fluorescence normale. Comme cet effet sur le niveau initial O est important pour l'interprétation des résultats, on l'a étudié en détail, afin d'éliminer l'éventualité d'une erreur expérimentale. En effet, puisque la présence d'un inhibiteur accélère la réaction photochimique, une faible pré-illumination accidentelle pourrait éléver le niveau initial de fluorescence d'une façon plus sensible que la même pré-illumination en absence d'inhibiteur. On a cherché à éliminer cette éventualité par deux sortes d'expériences :

(a) en lumière très faible il est possible de supprimer toute pré-illumination parasite. Dans ces conditions, l'élévation du niveau initial de fluorescence en présence d'inhibiteur subsiste ;

(b) les variations de température (entre 2° et 20°) n'ont aucun effet sur le niveau initial de fluorescence en présence d'inhibiteur. Il devrait en être autrement

si ce niveau initial était déterminé par la concurrence entre une réaction photochimique (due à une faible pré-illumination parasite) et la réaction obscure inverse.

L'élévation du niveau initial de fluorescence O sous l'effet des inhibiteurs est plus ou moins grande suivant les préparations, et semble en corrélation avec l'amplitude de la phase thermique IP. La variation du niveau O atteint généralement une valeur comprise entre 10 % et 20 % de la fluorescence initiale normale, pour les cultures de *Chlorella pyrenoidosa* utilisées dans ce travail, en présence d'orthophénanthroline ou de CMU 0.1 mM.

L'hydroxylamine, qui est un autre inhibiteur connu de l'émission d' O_2 , a sur la fluorescence un effet très différent de celui qu'on vient de décrire pour l'orthophénanthroline ou le CMU. Tandis que ces inhibiteurs ont la propriété de supprimer la phase thermique, l'hydroxylamine a un premier effet qui est de supprimer la phase photochimique (un second effet se manifeste, à concentration d'inhibiteur plus élevée, sur la phase thermique). Ainsi l'effet sur la fluorescence permet de confirmer que, comme le pensent différents auteurs, le mécanisme d'inhibition de la réaction photochimique II n'est pas le même pour l'hydroxylamine et pour les autres inhibiteurs déjà cités. Les seuls inhibiteurs dont il sera question dans la suite sont l'orthophénanthroline et le CMU.

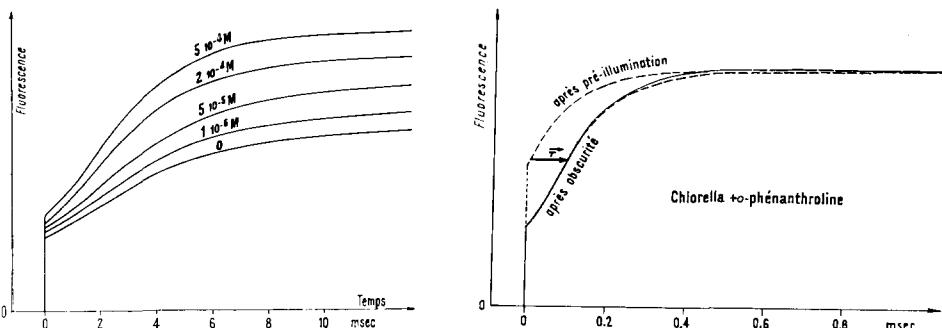


Fig. 8. Influence de la concentration d'orthophénanthroline sur la phase photochimique.

Fig. 9. Effet d'une pré-illumination de faible intensité sur la montée de fluorescence chez Chlorella en présence d'orthophénanthroline 0.5 mM. Pré-illumination de 30 sec à raison de $3 \cdot 10^{-5}$ Einstein absorbé par g de chlorophylle et par sec.

Effet d'une pré-illumination sur la montée de fluorescence

Les phénomènes décrits plus haut étaient observés après une longue période d'obscurité. La montée de fluorescence est sensiblement modifiée si l'échantillon a subi une illumination préalable.

Pré-illumination de faible intensité (durée de 30 sec à plusieurs minutes) (Fig. 9): Le niveau initial est plus élevé, et la forme de la courbe est modifiée (*cf. MORIN*⁷):

(a) en présence d'inhibiteur, la courbe de fluorescence après pré-illumination de faible intensité est identique à la partie supérieure de la courbe de fluorescence après obscurité (elles coïncident par translation parallèle à l'axe des temps). Il s'agit d'un cas particulièrement simple, où intervient seulement une réaction photochimique. La courbe observée correspond à la fin de cette réaction;

(b) en l'absence d'inhibiteur, les deux phases de croissance sont moins nettement

séparées après pré-illumination qu'après une longue période d'obscurité: on n'observe plus aucune oscillation entre ces deux phases.

Pré-illumination intense (durée 0.5-10 sec) suivie d'une courte obscurité (1-5 sec): l'effet sur les courbes de fluorescence est identique à celui des inhibiteurs: suppression de la phase thermique, augmentation de la phase photochimique, élévation du niveau initial (Fig. 10).

Pré-illumination par un flash électronique (durée 10^{-4} sec, énergie totale émise 10^{-10} J): les courbes de fluorescence sont très peu modifiées. Pourtant, la phase photo-chimique de croissance s'est déjà entièrement développée sous l'action de la lumière intense du flash. Il se produit donc une réaction obscure rapide entre la fin du flash et le début de l'illumination continue; elle s'accompagne d'un retour du rendement de fluorescence à sa valeur minimale 0.

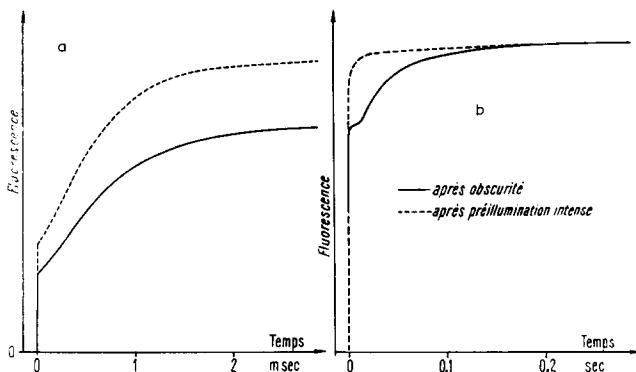


Fig. 10. Effet d'une pré-illumination de forte intensité sur la montée de fluorescence chez Chlorella sans inhibiteur. Pré-illumination de 1 sec à raison de $3 \cdot 10^{-2}$ Einstein par g de chlorophylle et par sec, suivie de 3 sec d'obscurité.

DISCUSSION

Interprétation de la montée de fluorescence en présence d'inhibiteur (phase photochimique)

En présence d'un inhibiteur en concentration convenable, on observe uniquement la phase photochimique. Dans tout ce chapitre, on suppose cette condition réalisée. La montée de fluorescence traduit la destruction photochimique d'une substance Q capable d'éteindre la fluorescence de la chlorophylle ("quencher" de fluorescence, ou "piège"¹):



La courbe de variation de la fluorescence en fonction du temps d'illumination (Fig. 3) présente deux particularités que n'explique pas l'Éqn. 1:

(i) au début de l'illumination, la fluorescence n'est pas nulle: le rendement de fluorescence initial (niveau O) est égal au tiers du rendement maximum (niveau P);

(2) la forme de la courbe n'est pas exponentielle; elle présente une inflexion caractéristique. JOLIOT ET JOLIOT, puis MORIN⁷ avaient déjà observé cette forme chez Chlorella traitée par l'orthophénanthroline, et en avaient cherché la signification. Dans des expériences antérieures sur Chlorella traitée par le phényluréthane, KAUT-

SKY, APPEL ET AMANN¹⁰ avaient obtenu des courbes analogues, mais avaient négligé cette particularité. Elle est restée assez longtemps sans explication satisfaisante, l'Éqn. 1 étant considérée comme représentant un réaction monomoléculaire d'ordre 1. JOLIOT ET JOLIOT¹² ont proposé une interprétation qui explique très bien la forme infléchie. L'appareil chlorophyllien étant constitué d'unités photosynthétiques, dont chacune contient un centre photochimique associé à une centaine de molécules de chlorophylle, l'énergie d'excitation électronique non convertie par le centre photochimique d'une unité peut être transférée au centre photochimique d'une unité voisine. Autrement dit, l'énergie d'excitation électronique peut circuler entre les différentes unités. DUYSENS¹³ a récemment émis une hypothèse analogue à propos des centres photochimiques des bactéries pourpres. Deux conséquences importantes résultent de cette possibilité de transfert entre unités:

(a) la réaction photochimique (1) n'est pas d'ordre 1 (en d'autres termes, sa vitesse n'est pas proportionnelle à la concentration des centres photochimiques intacts);

(b) l'intensité de fluorescence n'est pas une fonction linéaire de la concentration des centres photochimiques transformés. En calculant les lois de variation de la vitesse de réaction et de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration des pièges photochimiques, JOLIOT ET JOLIOT¹² ont donné une représentation très satisfaisante des courbes expérimentales qu'ils obtenaient d'une part en dosant l' O_2 d'origine photochimique, d'autre part en mesurant l'intensité de fluorescence.

Pour la discussion du présent travail, il a paru utile d'introduire l'hypothèse précédente dans un raisonnement plus général, où intervient non seulement la partie OP des courbes de fluorescence, mais aussi la partie initiale ωO (croissance pratiquement instantanée d'une intensité de fluorescence nulle à une intensité f_0).

Dans cette discussion, on considérera que la chlorophylle a_2 est seule capable d'émettre de la fluorescence. En effet, on peut admettre que la fluorescence de la chlorophylle b *in vivo* est négligeable, les transferts d'énergie d'excitation de la chlorophylle b vers la chlorophylle a_2 étant extrêmement efficaces et pratiquement irréversibles^{1,2}.

Signification de la fluorescence "initiale" (niveau O)

Dans leur calcul, JOLIOT ET JOLIOT¹² ont considéré uniquement la circulation de l'énergie entre les différentes unités photosynthétiques (ou, si l'on veut, entre les différents centres photochimiques). En effet, cette notion est nécessaire et suffisante pour expliquer la partie OI des courbes de fluorescence. Bien entendu, il existe aussi des transferts d'énergie à l'intérieur de chaque unité, l'énergie d'un photon subissant en moyenne une centaine de transferts successifs entre molécules de chlorophylle, avant d'atteindre le centre photochimique. Même si les transferts entre molécules de chlorophylle ont une efficacité excellente, il se produit inévitablement des pertes au cours de ces transferts, avec ou sans émission de fluorescence. L'intensité de fluorescence initiale est proportionnelle à la quantité d'énergie ainsi dissipée avant qu'aucun centre photochimique n'ait été excité. Il est facile de calculer cette quantité en fonction de la concentration initiale des pièges photochimiques.

Soit Q le rapport de la concentration initiale des pièges à la concentration de chlorophylle a_2 . Toute excitation électronique survenant au temps zéro de l'éclairage affecte soit un centre photochimique ChlQ (piège), soit une molécule de Chla₂

ordinaire (non piège). La probabilité du premier événement est Q , celle du second est $1 - Q$. Dans le premier cas (excitation immédiate d'un piège), l'énergie d'excitation n'a plus aucune possibilité d'être ré-émise par fluorescence. Dans le second cas (excitation d'une molécule non piège), il existe une probabilité a que l'excitation soit transférée à une deuxième molécule, et une probabilité $1 - a$ que l'énergie correspondante soit immédiatement convertie en chaleur ou ré-émise par fluorescence. La probabilité composée de cet événement (dissipation aussitôt après la première excitation) est $(1 - Q)(1 - a)$.

Dans le cas du transfert à une deuxième molécule, se présentent à nouveau les deux éventualités: excitation d'une molécule piège, excitation d'une molécule non piège; la probabilité composée de ce dernier événement est $(1 - Q)a(1 - Q)$; lorsqu'il s'est produit, il existe une probabilité de dissipation thermique ou fluorescence (après excitation successive de deux molécules), qui est $(1 - Q)a(1 - Q)(1 - a)$.

On calcule ainsi que la probabilité de ré-émission après excitation successive de n molécules est proportionnelle à:

$$(1 - a)(1 - Q)a^{n-1}(1 - Q)^{n-1}$$

La probabilité totale de ré-émission du quantum par fluorescence est donc proportionnelle à:

$$(1 - a)(1 - Q)[1 + a(1 - Q) + a^2(1 - Q)^2 + \dots + a^n(1 - Q)^n + \dots]$$

c'est à dire à

$$\frac{(1 - a)(1 - Q)}{1 - a(1 - Q)}$$

Si le système reçoit l'énergie de I photons par unité de temps, il doit donc émettre une intensité de fluorescence initiale

$$f_0 = kI \frac{(1 - a)(1 - Q)}{1 - a(1 - Q)}$$

Le coefficient k ($k \ll 1$) représente la proportion d'énergie dissipée qui est émise par fluorescence. On sait que cette proportion est très faible *in vivo* (quelques centièmes), l'énergie dissipée étant en grande majorité convertie en chaleur. Dans la suite, on considérera cette proportion comme invariable: on supposera que la fluorescence constitue une fraction constante de l'énergie dissipée.

A la fin de la réaction photochimique, lorsque tous les pièges ont été transformés, toute l'énergie d'excitation est évidemment dissipée, et l'intensité de fluorescence atteint une valeur maximale:

$$F = kI$$

On a donc:

$$f_0/F = \frac{(1 - a)(1 - Q)}{1 - a(1 - Q)} \quad (2)$$

La valeur expérimentale du rapport fluorescence initiale:fluorescence maximale est toujours voisine de 0.3 (valeur moyenne: 0.32 ± 0.02). Si l'on suppose qu'il existe un centre photochimique pour 100 molécules de chlorophylle a_2 , on en déduit une efficacité de transfert $a = 0.995$.

Évidemment, le calcul que l'on vient de faire pour la fluorescence initiale reste

valable quelle que soit la structure de l'ensemble de molécules considéré, c'est à dire qu'il soit divisé ou non en unités photosynthétiques, puisque à l'instant zéro de l'illumination, il n'existe aucun centre sous la forme transformée ChlQ'.

Il faut remarquer que l'existence d'une relation hyperbolique entre l'intensité de fluorescence et la concentration des pièges est classique¹⁴⁻¹⁶. La formule utilisée par DUYSENS¹⁵:

$$E = \frac{nf}{1 + nf} \quad (3)$$

(E , rendement du transfert d'énergie de la chlorophylle aux pièges; f , rapport de la concentration des pièges à la concentration de chlorophylle; n , nombre moyen de transferts subis par un quantum) est équivalente à celle que l'on obtient en calculant, par la méthode exposée plus haut, la probabilité du transfert $\text{Chl}^* \rightarrow \text{ChlQ}$, soit:

$$E = \frac{aQ}{1 - a(1 - Q)} \quad (4)$$

En effet, les deux expressions (3) et (4) sont équivalentes si

$$n = \frac{a}{1 - a}$$

relation que l'on démontre aisément: s'il se produit en moyenne a transferts pour $1 - a$ pertes, cela signifie que chaque quantum absorbé subit en moyenne $a/(1 - a)$ transferts avant d'être dissipé.

Analyse de la phase photochimique. Transferts d'énergie entre les centres photochimiques

Au début de l'illumination, aucun piège n'étant encore détruit, le niveau de fluorescence O est déterminé par la concentration des pièges et par l'efficacité moyenne des transferts d'énergie dans le système II, l'énergie d'excitation étant transférée uniquement par des molécules de Chla_2 ordinaires. Ensuite, à mesure que la réaction photochimique détruit les pièges ChlQ, apparaissent des centres ChlQ' qui ne sont plus des pièges. L'énergie d'excitation de ces centres ChlQ' est soit convertie en chaleur, soit ré-émise par fluorescence, soit transférée à une molécule voisine¹². L'hypothèse la plus simple consiste à admettre que les centres ChlQ' se comportent comme des molécules de chlorophylle a_2 ordinaire.

(a) *Première hypothèse: après excitation, le centre photochimique revient à l'état de molécule de Chla_2 ordinaire.* Dans ce cas, on est ramené au problème traité plus haut, d'un ensemble de molécules Chla_2 (transporteuses d'énergie) et de pièges ChlQ. Pour calculer l'intensité de fluorescence à l'instant t , il suffit de remplacer, dans l'Éqn. 2, la proportion initiale de pièges (soit Q) par la proportion de pièges à l'instant t (soit q). On trouve ainsi:

$$f/F = \frac{(1 - a)(1 - q)}{1 - a(1 - q)} \quad (5)$$

Remarquons que cette quantité peut s'écrire aussi:

$$f/F = 1 - \frac{q}{1 - a(1 - q)} \quad (6)$$

et que la vitesse de la réaction photochimique, qui est proportionnelle à la probabilité de capture de l'énergie d'excitation, est :

$$v = KI \frac{q}{1 - a(1 - q)}$$

En présence d'un inhibiteur, la seule réaction qui intervient est la destruction photochimique des pièges. Donc :

$$-\frac{dq}{dt} = KI \frac{q}{1 - a(1 - q)}$$

et l'on peut, en intégrant cette équation, connaître la loi de variation de q en fonction du temps :

$$a(Q - q) - (1 - a) \ln q/Q = KIt \quad (7)$$

La loi de variation de l'intensité de fluorescence en fonction du temps est donnée par les Éqns. 6 et 7. Pour certaines valeurs de a , la courbe représentative (Fig. 11) présente un point d'inflexion dont on peut calculer la position exacte. En effet, la dérivée seconde de f par rapport au temps s'annule pour

$$q = \frac{1 - a}{2a}$$

et le niveau de fluorescence correspondant est :

$$\frac{f_1}{F} = 1 - \frac{1}{3a}$$

la position de ce point d'inflexion est déterminée entièrement par l'efficacité moyenne des transferts de molécule à molécule.

Si l'on compare la famille de courbes théoriques (Fig. 11) aux courbes expérimentales, on constate que l'hypothèse précédente n'est pas satisfaisante. En effet, pour qu'il y ait coïncidence, il faudrait donner à Q une valeur voisine de 0,4, c'est à dire admettre qu'il existe en moyenne un centre photochimique pour 2 ou 3 molécules de chlorophylle a_2 . Ceci est en contradiction absolue avec ce qu'on sait de l'appareil photosynthétique. Il est vraisemblable en effet que les centres photochimiques sont environ 80 fois moins concentrés que la chlorophylle a_2 (réf. 17).

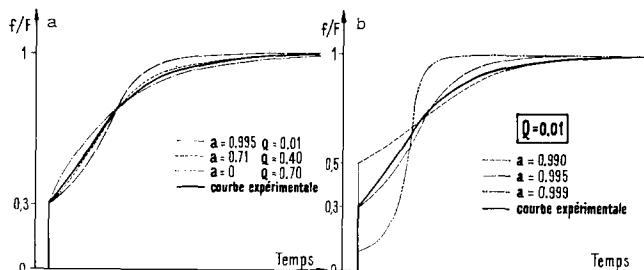


Fig. 11. Courbes théoriques de variation de la fluorescence en fonction du temps, en présence d'inhibiteurs de l'émission d' O_2 , dans l'hypothèse où tout centre photochimique désactivé se comporte comme une molécule de chlorophylle a_2 quelconque. Les diverses courbes correspondent à différentes valeurs de l'efficacité moyenne de transfert a . (a) On se donne le niveau initial $f_0/F = 0.3$ (valeur conforme à l'expérience). (b) On se donne la concentration $Q = 1/100$ (un centre photochimique pour 100 molécules de chlorophylle a_2). La courbe expérimentale est représentée en trait fort.

(b) *Deuxième hypothèse.* D'après ce qui précède, on ne peut admettre que la transmission de l'énergie d'un centre ChlQ' à un autre centre se fait par une suite de transferts tous identiques, du type Chla₂ → Chla₂, comme dans un ensemble homogène de molécules de chlorophylle a₂. D'autres transferts, dont l'efficacité est différente, doivent intervenir dans la transmission d'énergie entre les centres. On peut envisager plusieurs possibilités qui seront discutées plus loin, mais pour l'instant peuvent être incluses dans une même analyse mathématique. Il suffit de considérer maintenant non pas une, mais deux efficacités de transfert:

(i) L'efficacité moyenne a des transferts entre les molécules de chlorophylle a₂. C'est elle qui détermine l'intensité de la fluorescence initiale, déjà calculée (Éqn. 2):

$$f_0/F = \frac{(1-a)(1-Q)}{1-a(1-Q)}$$

(2) L'efficacité moyenne p des transferts entre les centres photochimiques. Elle détermine la cinétique de la montée de fluorescence pendant la phase photochimique. On attribue aux centres photochimiques les propriétés suivantes:

(i) tout centre qui n'a pas encore été excité est un piège pour l'énergie d'excitation (forme ChlQ);

(ii) tout centre qui a déjà été excité (forme ChlQ') n'est plus piège; s'il reçoit une nouvelle excitation, il peut la retransmettre à un autre centre, avec une efficacité moyenne p .

Un calcul très analogue à celui de la fluorescence initiale, mais dans lequel on considère les centres photochimiques (et non plus les molécules de chlorophylle ordinaire) et l'efficacité moyenne p des transferts entre centres (et non plus l'efficacité moyenne a des transferts entre molécules Chla₂), montre que la variation de fluorescence pendant la phase photochimique est proportionnelle à

$$\frac{(1-p)q'/Q}{1-pq'/Q}$$

(q'/Q , proportion de centres photochimiques déjà transformés). On retrouve exactement le calcul fait antérieurement par JOLIOT ET JOLIOT¹².

Finalement l'intensité totale de fluorescence à l'instant t est donnée par:

$$\varphi = f/F = \varphi_0 + (1-\varphi_0) \frac{(1-p)q'/Q}{1-pq'/Q} \quad (8)$$

avec à l'instant zéro:

$$\varphi_0 = f_0/F = 1 - \frac{Q}{1-a(1-Q)}$$

Quant à la vitesse de la réaction photochimique, elle est proportionnelle à

$$1 - \varphi = (1 - \varphi_0) \frac{q/Q}{1 - pq'/Q}$$

(q/Q , proportion de centres photochimiques non transformés). On en déduit, par intégration de l'équation $-dq/dt = KI(1 - \varphi)$:

$$\frac{KI t}{1 - a(1 - Q)} = pq'/Q - (1 - p) \ln q/Q \quad (9)$$

Pour certaines valeurs de β , la courbe de variation de la fluorescence en fonction du temps, définie par les Éqns. 8 et 9 (Fig. 12), présente un point d'infexion auquel correspond un niveau de fluorescence

$$\varphi_1 = \varphi_0 + (1 - \varphi_0) (1 - 1/3\beta)$$

Pour la moyenne des courbes expérimentales $\varphi_0 = 0.32$ et $\varphi_1 = 0.50$. On en déduit:

$$\beta = 0.45$$

Pour cette valeur, la courbe théorique coïncide effectivement de façon satisfaisante avec les courbes expérimentales (Fig. 14, courbes supérieures). Cette évaluation de β est conforme à celle de JOLIOT ET JOLIOT. Quant aux paramètres a et Q , ils sont liés par la relation:

$$\varphi_0 = 1 - \frac{Q}{1 - a(1 - Q)} = 0.32$$

Ainsi, à une concentration $Q = 1/100$ correspond une efficacité de transfert $a = 0.995$; à une concentration $Q = 1/50$ correspond une efficacité de transfert $a = 0.990$.

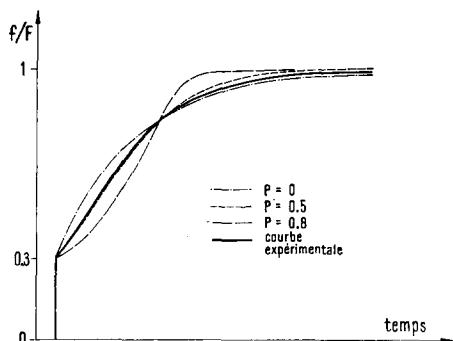


Fig. 12. Courbes théoriques de fluorescence, en présence d'inhibiteur, dans l'hypothèse où tout centre désactivé qui reçoit une nouvelle excitation peut la transférer à un autre centre avec une efficacité moyenne β . Les diverses courbes correspondent à différentes valeurs de β . On se donne $Q = 1/100$ et $f_0/F = 0.3$. La courbe expérimentale est représentée en trait fort.

(c) *Conclusions.* On vient de donner une représentation formelle satisfaisante des courbes de fluorescence en présence d'inhibiteur. Il convient de s'interroger sur la signification réelle de l'efficacité moyenne β des transferts entre les centres photochimiques (efficacité proche de 0.5):

(1) β peut représenter l'efficacité réelle de transferts par résonance entre centres voisins: de tels transferts ne sont possibles que si les centres sont juxtaposés, et non pas dispersés dans un environnement de chlorophylle. Une telle disposition semble *a priori* plus propice au fonctionnement de la réaction photochimique: celle-ci serait localisée dans un assemblage de molécules Chla₂ particulières associées à un enzyme photochimique;

(2) cependant, le calcul précédent ne postule pas l'existence de tels transferts directs par résonance d'une centre photochimique à un centre voisin. On peut aussi supposer que la transmission d'énergie d'un centre à un autre se fait de proche en proche, par l'intermédiaire des molécules de chlorophylle a₂. L'efficacité moyenne $\beta = 0.5$ peut alors s'expliquer par la présence, dans la chaîne de transferts entre

deux centres, d'un transfert par résonance moins probable que les autres. On peut envisager plusieurs possibilités:

(i) hétérogénéité due à la structure: l'appareil chlorophyllien est cloisonné en unités photosynthétiques; l'énergie d'excitation électronique peut franchir la distance entre deux unités voisines (si par exemple celle-ci est assez faible pour permettre des transferts par résonance), mais le transfert d'une unité à l'autre est moins probable que le transfert entre molécules d'une même unité. Dans cette hypothèse, les molécules qui transfèrent l'énergie sont toutes semblables, mais une raison de structure différencie les probabilités de transfert;

(ii) hétérogénéité due à la nature des molécules: les centres ChlQ' se distinguent des molécules de chlorophylle a_2 environnantes par une modification spectroscopique ou géométrique; celle-ci intervient dans l'efficacité des transferts d'énergie à partir des centres ChlQ'. Ainsi, si un centre ChlQ' excité transfère son énergie d'excitation à une molécule Chla₂ voisine (avec une efficacité moyenne α'), et que cette énergie circule ensuite par transferts successifs entre molécules Chla₂ (efficacité moyenne α), la probabilité p qu'elle atteigne un centre est:

$$p = \frac{\alpha' Q}{1 - \alpha(1 - Q)}$$

p s'interprète alors comme une probabilité composée. Si $p = 0.45$, $Q = 1/100$ et $\alpha = 0.995$, on trouve $\alpha' = 0.66$. En résumé, les efficacités moyennes des différents transferts seraient:

Chla₂ → Chla₂: $\alpha = 0.995$

ChlQ → Chla₂: zéro

ChlQ' → Chla₂: $\alpha' = 0.66$

ChlQ' → ChlQ ou ChlQ': $p = 0.45$ (transfert indirect)

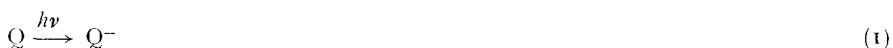
S'il existe une différence entre le spectre de fluorescence des centres photochimiques ChlQ' et celui des molécules de chlorophylle a_2 environnantes, cette différence doit se manifester entre le spectre d'émission de la fluorescence initiale et celui de la fluorescence après illumination, puisque la première est émise exclusivement par la chlorophylle a_2 ordinaire, tandis que la seconde est émise simultanément par les deux sortes de molécules, Chla₂ et ChlQ'. Dans les spectres de fluorescence publiés par LAVOREL¹⁸, il apparaît effectivement un léger décalage de la bande principale, le maximum d'émission de la fluorescence initiale (O) étant situé à plus faible longueur d'onde que le maximum d'émission de la fluorescence "variable" (P—O) chez Chlorella (Fig. 5 de la référence citée). Ce décalage d'environ 2 m μ est particulièrement visible sur le "spectre de rapport" des deux spectres précédents (P—O/O, partie A). Il pourrait constituer un argument en faveur de la dernière hypothèse proposée (hétérogénéité due à la nature des molécules).

Il convient de remarquer que dans cette même hypothèse, il n'est pas certain que la fluorescence constitue une fraction invariable de l'énergie dissipée, comme on l'a supposé plus haut. Si au contraire cette fraction est notablement différente suivant la nature des molécules impliquées dans les transferts, le calcul des différentes efficacités de transfert n'est plus valable.

Interprétation de la montée de fluorescence en l'absence d'inhibiteur

En l'absence d'inhibiteur, la montée de fluorescence se présente différemment suivant l'intensité de l'illumination⁶⁻⁹. La succession d'une phase photochimique et d'une phase thermique y est en général reconnaissable, la séparation de ces deux phases étant plus ou moins nette. En lumière très faible, on observe seulement la première phase, que JOLIOT a identifiée avec la réaction d'activation du complexe photochimique. Une illumination plus forte fait apparaître une seconde phase, thermique, qui correspond au jet d' O_2 (réf. 6). Dans ce domaine d'intensités faibles ou moyennes, la signification de la montée de fluorescence est donc assez bien connue, grâce aux mesures simultanées de fluorescence et d'émission d' O_2 (réfs. 4, 6). Plus l'illumination est intense, plus l'amplitude de la phase photochimique devient grande devant celle de la phase thermique^{6,7,9}. Enfin, aux très fortes intensités, les deux phases atteignent une amplitude pratiquement invariable (*cf.* Fig. 5).

(1) *La phase photochimique* existe à la fois en présence et en l'absence d'inhibiteur. Elle correspond à la réduction d'un accepteur primaire Q (réf. 1):



(2) *La phase thermique*, qui est visible seulement en l'absence d'inhibiteur, semble liée à la réoxydation de Q^- par une réserve d'oxydant A:



En effet:

(a) La phase thermique révèle certainement une réaction qui se produit au voisinage de la chlorophylle a_2 . Des expériences faites en lumière excitant de façon préférentielle soit le système photochimique I (520 m μ), soit le système photochimique II (480 m μ), n'ont révélé aucune différence qui puisse faire supposer une intervention du système I dans la phase thermique. D'autre part, en collaboration avec BRIANTAIS, nous avons observé une phase thermique remarquablement développée sur des préparations de chloroplastes de maïs dont il avait éliminé la majorité du système I (le système II restant parfaitement fonctionnel)²⁰.

(b) La phase thermique n'est plus visible en présence de substances telles que l'orthophénanthroline ou le CMU, dont on pense qu'elles suppriment le transfert d'électrons entre le complexe photochimique Q et son accepteur normal A (réf. 9).

(c) En très forte lumière, la cinétique de la phase thermique est analogue à la cinétique de destruction de A, étudiée par JOLIOT¹⁷ au moyen d'un dosage de l' O_2 libéré (Fig. 5 de la référence citée).

(d) Si, quelques secondes avant l'expérience, on a soumis l'échantillon à une pré-illumination intense de quelques secondes, la phase thermique n'est plus visible (Fig. 10). Or les travaux de JOLIOT ont montré que, dans ces conditions, l'oxydant A se trouve entièrement réduit; après la pré-illumination intense, une courte obscurité suffit à réoxyder Q^- en Q (réaction inverse de l'activation), mais non à réoxyder A. Aussi observe-t-on uniquement la phase photochimique.

(e) Si la phase thermique de montée de la fluorescence que l'on observe en faible lumière correspond effectivement à la Réaction 10 (réf. 6), il est normal de supposer que la phase thermique observée en forte lumière a la même signification.

On est donc tenté d'interpréter la montée de fluorescence en forte lumière par l'effet combiné sur Q des deux Réactions 1 et 10. Il est difficile de calculer la loi de

variation de la concentration de Q (ou de Q^-) sous l'effet de ces deux réactions. On peut cependant prévoir que, lorsqu'on augmente l'intensité d'illumination, l'amplitude de la phase photochimique doit nécessairement augmenter par rapport à l'amplitude de la phase thermique. C'est bien ce qui a été observé en faible lumière^{6,9}, mais ce n'est plus vrai en très forte lumière, où les amplitudes des deux phases sont au contraire remarquablement indépendantes de l'intensité d'illumination (Fig. 5).

Il faut alors admettre qu'à la fin de la phase photochimique (niveau I), tout l'enzyme photochimique est déjà sous la forme Q^- . Puisque la fluorescence n'a pas encore atteint son intensité maximale, il doit intervenir un phénomène supplémentaire d'extinction de fluorescence. La substance responsable de cette extinction de fluorescence disparaît ensuite progressivement au cours de la phase thermique IP. En présence d'inhibiteur, cette substance n'a plus aucun effet sur la fluorescence. On voit sur la Fig. 7 que la fluorescence des algues ou chloroplastes normaux est constamment inférieure à celle des algues ou chloroplastes inhibés: l'extinction de fluorescence se manifeste dès le début de l'illumination, et pendant toute la phase photochimique. On peut expliquer ce phénomène par la présence, chez les algues ou chloroplastes normaux, d'une substance piège R qui n'est pas détruite par la réaction photochimique, mais par une réaction thermique consécutive à la réaction photochimique.

(x) *Phase photochimique (OI).* Examinons en effet ce que deviennent les Éqns. 8 et 9 si l'on fait intervenir une nouvelle espèce de pièges R dont la concentration est constante pendant toute la phase photochimique. On obtient:

$$\varphi = \varphi_0 + (1 - \varphi_0) \frac{(1 - p)q'/Q + R}{1 - pq'/Q + R} \quad (11)$$

(R = rapport de la concentration initiale des pièges R à la concentration de chlorophylle a_2) avec, à l'instant zéro:

$$\varphi_0 = 1 - \frac{Q + R}{1 - a(1 - Q - R)}$$

et d'autre part:

$$\frac{KIt}{1 - a(1 - Q - R)} = p \frac{q'}{Q + R} - \left(1 - p \frac{Q}{Q + R}\right) \ln \frac{q}{Q} \quad (12)$$

La courbe de variation de la fluorescence en fonction du temps, définie par les Éqns. 11 et 12, a été tracée sur la Fig. 13 pour différentes valeurs de la concentration des pièges R. La courbe correspondant à $R = 0.004$ (c'est-à-dire 1/250ème de la concentration de chlorophylle a_2) est une bonne approximation de la courbe expérimentale de la Fig. 14, qui représente la phase photochimique d'algues normales (courbe inférieure). Sur la même Fig. 14 ont été représentées la courbe expérimentale et la courbe théorique pour les mêmes algues traitées par l'orthophénanthroline (courbes supérieures). On voit sur cette figure qu'une substance piège dont la concentration ne varie pas provoque une extinction croissante à mesure que la fluorescence augmente: l'effet des pièges R augmente lorsque la concentration des pièges Q diminue.

La famille de courbes théoriques de la Fig. 13 est à comparer avec la famille de courbes expérimentales de la Fig. 8. La similitude de ces deux familles est en faveur de l'hypothèse proposée: il existe dans le chloroplaste normal un piège R qui

n'est pas détruit par la réaction photochimique; l'introduction d'un inhibiteur tel que le CMU ou l'orthophénanthroline diminue l'effet de ce piège, et le supprime totalement pour une concentration d'inhibiteur voisine de 0.5 mM.

On peut obtenir un effet inverse de celui des inhibiteurs, en augmentant artificiellement la concentration de pièges photochimiquement inactifs: par exemple, la Fig. 15 représente l'effet d'une addition d'anthraquinone sur la phase photochimique chez Chlorella.

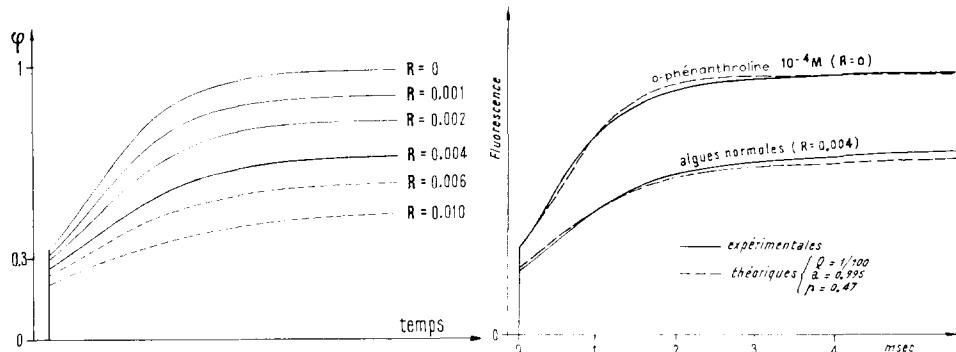


Fig. 13. Courbes théoriques de fluorescence (phase photochimique) en présence d'un extincteur de fluorescence R. On se donne $Q = 1/100$, $a = 0.995$ et $p = 0.47$. Les différentes courbes correspondent à diverses concentrations de R.

Fig. 14. Courbes expérimentales (en trait continu) et courbes théoriques (en trait interrompu), en présence d'inhibiteur (courbes supérieures) et en l'absence d'inhibiteur (courbes inférieures). Seule la phase photochimique est représentée. $Q = 1/100$, $a = 0.995$, $p = 0.47$, et $R = 0.004$.

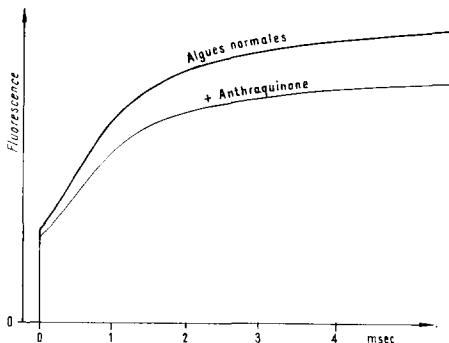
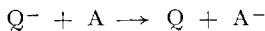


Fig. 15. Effet d'une addition d'anthraquinone (environ 10 μ M) sur la phase photochimique chez Chlorella. Courbe supérieure: algues non traitées; courbe inférieure: algues traitées.

(2) *Phase thermique (IP). Signification des pièges R.* Les pièges R sont détruits au cours de la phase thermique, par une réaction certainement associée à la réoxydation du complexe photochimique:



On pourrait supposer que R et A sont une seule et même substance. Il existe cependant un argument contre cette identification: les inhibiteurs qui suppriment l'extinction de fluorescence par R ne semblent pas détruire l'oxydant A (réf. 19).

Ils opèrent plutôt une coupure du transfert d'électrons entre Q et A. Cet argument n'est pas absolument décisif contre l'identification de R avec A: on peut en effet supposer que les molécules de A ne sont en contact avec la chlorophylle a_2 , donc ne peuvent éteindre la fluorescence, que si elles sont fixées à des centres photochimiques. Ainsi,

(a) ces molécules n'ont plus d'effet sur la fluorescence si le contact entre A et Q est supprimé par un inhibiteur (CMU);

(b) les molécules de A capables d'éteindre la fluorescence sont au maximum à la concentration de Q. Il n'est alors pas surprenant qu'on trouve une concentration de R voisine de 1/200ème de la concentration de chlorophylle a_2 , soit une petite fraction seulement de la concentration totale de A.

CONCLUSIONS

L'étude de l'induction initiale de fluorescence en lumière excitatrice de forte intensité apporte d'utiles renseignements sur l'appareil photochimique du chloroplaste, dans la mesure où elle complète les résultats d'autres méthodes (fluorescence en faible lumière, émission d' O_2 , spectroscopie *in vivo*). Dans l'évolution de fluorescence représentée par la Fig. 4 on distingue successivement:

(i) une émission instantanée par rapport au temps de réponse de la mesure: ωO ;

(ii) une phase de croissance photochimique OI;

(iii) une phase de croissance thermique IP;

(iv) une phase de décroissance, qui dépend de l'intensité lumineuse et de la température. Elle n'existe pas dans le chloroplaste isolé (et disparaît en présence de CMU chez Chlorella).

La phase photochimique OI est très analogue à celle que l'on observe en faible lumière et en présence de CMU; or dans ces dernières conditions, il est possible d'étudier simultanément la fluorescence et l'émission d' O_2 . On peut ainsi relier la phase photochimique OI à l'évolution des centres photochimiques du système II. L'analyse de cette phase photochimique est relativement simple, d'une part parce que la fluorescence est un indicateur direct de la réaction photochimique, et d'autre part parce que l'on peut isoler cette phase en agissant sur les vitesses de réaction (soit en rendant la réaction photochimique extrêmement rapide par une illumination très intense, soit en freinant par des inhibiteurs les réactions associées). On a proposé une représentation mathématique de la partie ωOI de la courbe de fluorescence. On peut admettre que l'émission "instantanée" ωO et l'émission qui se développe pendant la phase photochimique OI proviennent en majorité du même pigment (chlorophylle a_2), mais qu'en outre apparaît progressivement, au cours de la phase OI, la fluorescence des centres photochimiques désactivés.

La signification du petit accident qui apparaît entre la phase photochimique et la phase thermique (Fig. 6) n'est pas encore parfaitement claire. Cet accident disparaît si les algues ou chloroplastes ont été pré-illuminés, ce qui laisse supposer qu'il est lié à la réaction d'activation¹⁷.

Quant à la seconde phase de montée de la fluorescence (IP), on a pu voir qu'elle est sous la dépendance du système photochimique II, et qu'elle reflète l'évolution d'un oxydant A, substrat du complexe photochimique Q. On a montré qu'il existe un phénomène d'extinction de fluorescence lié à la présence de l'oxydant A au contact

du complexe photochimique. Le mécanisme de cette extinction reste à préciser. Il serait nécessaire d'analyser de manière approfondie la structure et le fonctionnement de l'ensemble formé par la chlorophylle a_2 , les centres photochimiques Q et l'accepteur A dans l'appareil photosynthétique.

RÉSUMÉ

1. Après une longue période d'obscurité, la fluorescence d'algues vertes ou de chloroplastes isolés soumis à une illumination intense augmente d'un niveau minimum (O) à un niveau maximum (P). Une méthode d'enregistrement très rapide de l'intensité de fluorescence a permis d'observer deux phases dans cette évolution; la première phase est photochimique, la seconde thermique.

2. La phase photochimique correspond à la destruction d'un piège Q, qui est le réactif primaire de la réaction photochimique II de la photosynthèse (réaction associée à l'émission d' O_2). Cette réaction fait intervenir des transferts d'énergie entre molécules de chlorophylle et centres photochimiques. Une analyse mathématique des courbes de fluorescence conduit à discuter la nature et l'efficacité de ces transferts.

3. La phase thermique représente la destruction d'un extincteur de fluorescence R. L'effet produit sur la fluorescence par certains inhibiteurs de l'émission d' O_2 conduit à associer l'extincteur de fluorescence R à une réserve d'oxydant située entre les deux systèmes photochimiques.

REMERCIEMENTS

J'exprime ici ma gratitude à Monsieur le Professeur et Madame WURMSER, qui m'ont accueilli dans leur laboratoire, et à Monsieur P. JOLIOT, qui a inspiré et dirigé ce travail. Ce travail a été effectué grâce aux subventions du Centre National de la Recherche Scientifique et du Commissariat à l'Énergie atomique.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 L. N. M. DUYSENS ET H. E. SWEERS, dans Jap. Soc. Plant Physiol., *Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria*, University of Tokyo Press, Tokyo, 1963, p. 353.
- 2 L. N. M. DUYSENS, *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, 14 (1964) 44.
- 3 H. KAUTSKY ET A. HIRSCH, *Naturwissenschaften*, 19 (1931) 964.
- 4 J. LAVOREL, P. JOLIOT ET R. DELOSME, *Compt. Rend.*, 249 (1959) 1409.
- 5 J. LAVOREL, *Plant Physiol.*, 34 (1959) 204.
- 6 P. JOLIOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 102 (1965) 135.
- 7 P. MORIN, *J. Chim. Phys.*, 61 (1964) 674.
- 8 P. JOLIOT, R. DELOSME ET A. JOLIOT, dans J. B. THOMAS ET J. C. GOEDHEER, *Currents in Photosynthesis*, Donker, Rotterdam, 1966, p. 359.
- 9 P. JOLIOT ET J. LAVOREL, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 46 (1964) 1607.
- 10 H. KAUTSKY, W. APPEL ET H. AMANN, *Biochem. Z.*, 332 (1960) 277.
- 11 P. JOLIOT, *J. Chim. Phys.*, 58 (1961) 584.
- 12 A. JOLIOT ET P. JOLIOT, *Compt. Rend.*, 258 (1964) 4622.
- 13 L. N. M. DUYSENS, dans J. B. THOMAS ET J. C. GOEDHEER, *Currents in Photosynthesis*, Donker, Rotterdam, 1966, p. 263.
- 14 L. N. M. DUYSENS, *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, 14 (1964) 54.
- 15 L. N. M. DUYSENS, *Transfer of Excitation Energy in Photosynthesis*, Thesis, Utrecht, 1952, p. 88.
- 16 F. W. J. TEALE, *Biochim. Biophys. Acta*, 42 (1960) 69.
- 17 P. JOLIOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 102 (1965) 116.
- 18 J. LAVOREL, *Biochim. Biophys. Acta*, 60 (1962) 510.
- 19 A. JOLIOT, communication personnelle.
- 20 J. M. BRIANTAIS, *Photochem. Photobiol.*, 5 (1966) 135.
- 21 N. MURATA, M. NISHIMURA ET A. TAKAMIYA, *Biochim. Biophys. Acta*, 120 (1966) 23.