

BBA 41115

Rétablissement du lien entre deux structures chloroplastiques isolées par action du Triton X-100

A la suite des travaux de WESSELS¹ et de BOARDMAN ET ANDERSON², nous avons isolé par action progressive du Triton X-100 sur des chloroplastes de maïs (3 et 12 molécules de Triton/molécule de chlorophylle), deux fractions³; l'une, enrichie en chlorophylle *a*, sédimente à $80000 \times g$, on l'appellera C 80000, l'autre, enrichie en chlorophylle *b*, sédimente à $10000 \times g$, on l'appellera C 10000.

L'étude des spectres d'absorption de ces particules et leur comparaison avec une expression des spectres d'action⁴ des deux réactions photochimiques montre que les holochromes des deux systèmes photochimiques font partie de structures chloroplastiques distinctes (Fig. 1).

Une partie de la chaîne d'oxydoréduction de la photosynthèse reste liée à chacun des groupes d'holochromes chlorophylliens séparés. La Fig. 2 montre, par exemple, la répartition des cytochromes *f* et *b* dans les deux types de particules.

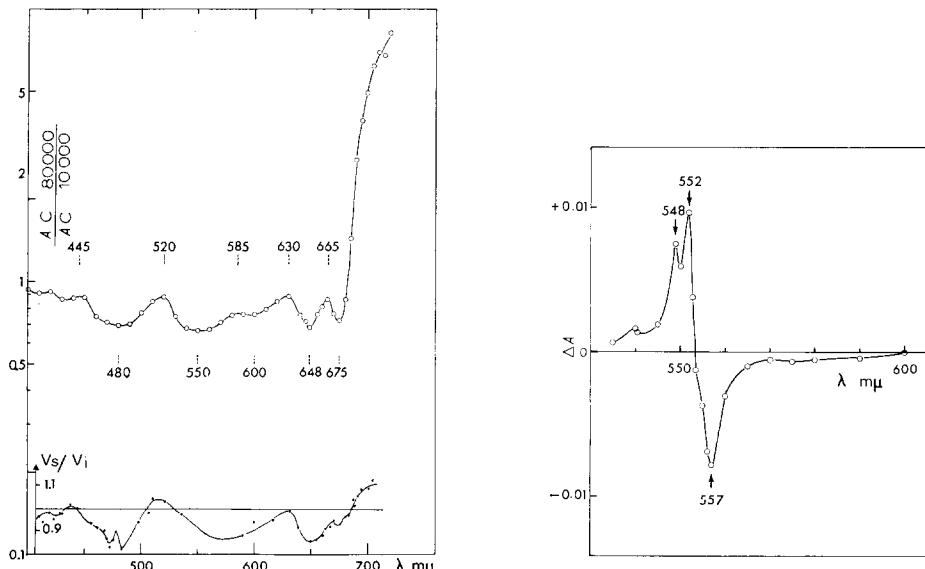


Fig. 1. Comparaison du rapport ($C\ 80000/C\ 10000$) des spectres d'absorption obtenus à -180° et du spectre du rapport des vitesses stationnaire et initiale du dégagement d'oxygène (v_s/v_i) chez Chlorella, obtenu par JOLIOT⁴.

Fig. 2. Spectre de différence à -180° ($C\ 80000 - C\ 10000$) dans la région des bandes α d'absorption des cytochromes (cytochrome *b*₆: 557 mμ; cytochrome *f*: 548 et 552 mμ). Le matériel après extraction par l'acétone à 80% est réduit par l'hydrosulfite. La suspension est déposée sur papier filtre. Épaisseur de l'échantillon: 0.1 mm, concentration de l'échantillon ainsi préparé, exprimée en chlorophylle: 15 mg/cm³.

Le fonctionnement de la Photoréaction II, dans les chloroplastes, détermine un dégagement transitoire d'oxygène⁵, dont l'amplitude est limitée par la quantité des transporteurs d'électrons, sous leur forme oxydée, situés entre les deux réactions

photochimiques⁶. Le fonctionnement de la Photoréaction I, de ces chloroplastes, provoque une photoabsorption transitoire d'oxygène⁷ dont l'amplitude est déterminée par la quantité des transporteurs réduits, donneurs d'électrons du Système I, présents entre les deux réactions photochimiques. Ces deux variations transitoires sont séparées dans les deux structures isolées⁸. Aux particules C 10 000 est associé le jet d'oxygène, aux particules C 80 000 est associée la photoabsorption sensibilisée par le Système I.

Un lien structural doit exister *in vivo*, qui permet dans les chloroplastes l'interaction des deux réactions photochimiques sur le degré d'oxydoréduction des transporteurs. La caractérisation physiologique de ce lien est donnée dans la Fig. 3, ou: (a) une prééclairage à 722 m μ des chloroplastes détermine une stimulation du jet d'oxygène et, (b) une prééclairage à 654 m μ provoque une exaltation de la photoabsorption, sensibilisée par le Système I. A la séparation des deux groupes d'hologrames chlorophylliens dans les deux particules, correspond la disparition, ou la très forte diminution, de ces effets d'exaltation dans les structures isolées.

Si les deux fractions chloroplastiques sont mélangées en l'absence de Triton X-100, on constate qu'après une incubation de quelques heures à 3° et à l'obscurité (ces 2 dernières conditions afin d'éviter une inactivation du matériel), le mélange présente les 2 phénomènes d'exaltation étudiés; stimulation du jet et de la photoabsorption (Fig. 3). Il semble donc que la liaison entre les deux structures ait été rétablie et ceci d'une façon très semblable à celle existant *in vivo* pour que, comme dans les chloroplastes, il y ait transfert d'électrons du Système II au Système I. Ce mélange, centrifugé et remis en suspension dans du tampon neuf, conserve les phénomènes d'exaltation. Le pont entre les deux systèmes n'est donc pas assuré par l'un des transporteurs, passé en solution. Remarquons que la cinétique de l'exaltation est différente dans le mélange et les chloroplastes; les prééclairages à 654 m μ de longue durée suppriment, dans le mélange, la stimulation de la photoabsorption.

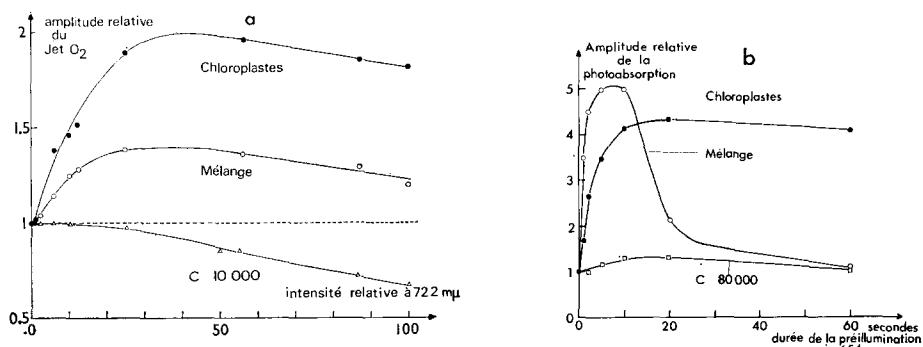


Fig. 3. Effets de stimulation. (a) du jet d'oxygène révélé en lumière 654 m μ appliquée pendant 5 sec, après une prééclairage à 722 m μ de 55 sec et d'intensité variable. Amplitude du jet: hauteur du pic initial correspondant au jet. (b) de la photoabsorption sensibilisée par 722 m μ après une prééclairage à 654 m μ de durée variable et d'intensité constante. La photoabsorption après prééclairage est comparée à celle obtenue en remplaçant la prééclairage par une durée égale d'obscurité. Durée de l'éclairage à 722 m μ : 15 sec. Entre la fin de la prééclairage à 654 m μ et le début de l'éclairage à 722 m μ s'intercale une période d'obscurité de 30 sec. L'amplitude du pic négatif obtenu au début de l'éclairage à 722 m μ mesure la photoabsorption. Les mesures sont faites avec une électrode de type Haxo et Blinks, à 20°. Les suspensions contiennent 2 mg de chlorophylle par ml d'un tampon Tris-maléate 0.1 M + saccharose 0.4 M + KCl 0.1 M (pH 6.6) saturé en air. Le mélange (1 C 80 000 + 3 C 10 000) exprimé en quantité de chlorophylle est incubé une nuit à 3° et à l'obscurité.

Les deux particules isolées sont caractérisées par des densités différentes; mesurées avec un gradient de saccharose (20 % à 50 % dans du tampon Tris-maléate 0.1 M, pH 6.6), après centrifugation à 65 000 × g pendant 40 min, nous obtenons: 1.13 pour C 80 000 et 1.20 pour C 10 000. Un mélange des deux particules dans les proportions 1 C 10 000 pour 2 C 80 000 (exprimé en chlorophylle totale), centrifugé dans le gradient de saccharose après incubation une nuit dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment, donne deux bandes. La bande inférieure, la plus dense, a approximativement la même densité que C 10 000, mais son rapport chlorophylle *a*/chlorophylle *b* est plus élevé; il est voisin de celui des chloroplastes dont ont été extraits les particules (Tableau I). La zone la moins dense correspond aux particules C 80 000 qui ne se sont pas combinées à C 10 000. D'après les résultats du tableau, 33 % de C 80 000 mis dans le mélange, se sont fixés dans la zone inférieure. Si le mélange est effectué dans les proportions (3 C 10 000 pour 1 C 80 000) on constate que, après une incubation identique à la précédente, 63 % des particules C 80 000 ont été incluses dans la bande inférieure.

TABLEAU I

VARIATIONS DU RAPPORT CHLOROPHYLLE *a*/CHLOROPHYLLE *b* DANS LES DIVERS LOTS

La bande inférieure est la bande la plus dense obtenue après centrifugation du mélange C 10 000 + C 80 000 sur le gradient de saccharose. Mélange effectué dans les proportions: (a) 1 C 80 000 + 3 C 10 000 exprimés en chlorophylle totale; (b) 2 C 80 000 + 1 C 10 000.

Rapport	Chloroplastes	C 10 000	C 80 000	Bande inférieure	
				(a)	(b)
Chlorophylle <i>a</i>					
Chlorophylle <i>b</i>	3.01	2.37	7.10	2.75	3.30

Cette recombinaison semble donc présenter une saturation qui s'établit, pour une valeur du rapport chlorophylle *a*/chlorophylle *b*, dans la bande inférieure voisine de celle des chloroplastes.

La valeur du rapport chlorophylle *a*/chlorophylle *b* dans la zone inférieure obtenue à partir d'un mélange riche en C 80 000, ainsi que l'existence d'un échange d'électrons entre les deux structures en mélange, conduisent à penser que la liaison obtenue entre les particules met en jeu les mêmes sites de fixation que ceux qui lient les deux systèmes photochimiques *in vivo*.

Les résultats qualitatifs rapportés ici sont à rapprocher de la recombinaison obtenue avec des morceaux de membranes mitochondrielles par TZAGOLOFF et coll.⁹.

Laboratoire de Photosynthèse du C.N.R.S.,
Gif sur Yvette 91 (France)

J. M. BRIANTAIS

1 J. S. C. WESSELS, *Biochim. Biophys. Acta*, 65 (1962) 561.
 2 N. K. BOARDMAN ET J. M. ANDERSON, *Nature*, 203 (1964) 166.
 3 J. M. BRIANTAIS, *Photochem. Photobiol.*, 6 (1967) 155.
 4 P. JOLIOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 102 (1965) 116.

- 5 Y. DE KOUCHKOVSKY, *Physiol. Végétale*, 1 (1963) 15.
- 6 D. C. FORK, *Plant Physiol.*, 38 (1963) 15.
- 7 W. VIDAVER ET C. S. FRENCH, *Carnegie Inst. Wash. Publ.*, (1963-1964) 453.
- 8 J. M. BRIANT AIS, *Compt. Rend.*, 263 (1966) 1899.
- 9 A. TZAGOLOFF, D. H. MACLENNAN, D. G. MACCONNELL ET D. E. GREEN, *J. Biol. Chem.*, 242 (1967) 2051.

Reçu le 14 juillet, 1967

Biochim. Biophys. Acta, 143 (1967) 650-653