

BBA 43196

Étude de l'étape thermique de l'émission photosynthétique d'oxygène par une méthode d'écoulement

Avec les méthodes classiques d'étude des cinétiques d'émission d' O_2 , dont la résolution en temps ne descend pas au dessous de 0.1 sec, on met en évidence des substrats cinétiques situés entre les deux réactions photochimiques¹. De plus on constate, à l'interruption de l'illumination, une variation discontinue de la vitesse d'émission. Donc s'il existe des réactions thermiques séparant l'acte photochimique II de l'apparition d' O_2 , elles sont très rapides, non limitantes. Nous avons mis au point une méthode rapide qui en permet l'étude.

Nous utilisons des algues unicellulaires *Chlorella pyrenoidosa* à la concentration de $2 \cdot 10^8$ cellules par ml dans du tampon phosphate (pH 6.5) avec KCl 0.1 M comme électrolyte. La méthode associe à la mesure ampèrométrique de l' O_2 dissous², la technique d'écoulement³ qui permet de dilater l'échelle des temps puisqu'elle transforme la coordonnée temps en coordonnée espace et qui transforme un état transitoire dans le temps en transitoire le long de l'axe d'écoulement, c'est à dire stationnaire et aisément mesurable en chaque point du tube d'écoulement. La Fig. 1 montre la réalisation pratique de la méthode: Le gaz sous pression propulse la suspension d'algues du réservoir pneumatique au réservoir aval par le capillaire. La suspension est ensuite transférée du second réservoir au premier par une pompe. Ce cycle oblige à contrôler les voies de passage du liquide et du gaz et la marche de la pompe. Ces opérations sont asservies au niveau du liquide dans le réservoir aval au moyen de capteurs électrolytiques; ceux-ci par l'intermédiaire d'un tube à cathode froide, commandent les vannes électromécaniques et la pompe. L'éclat actinique est obtenu par formation sur le capillaire, de l'image de l'arc d'une lampe de 250 W dans le

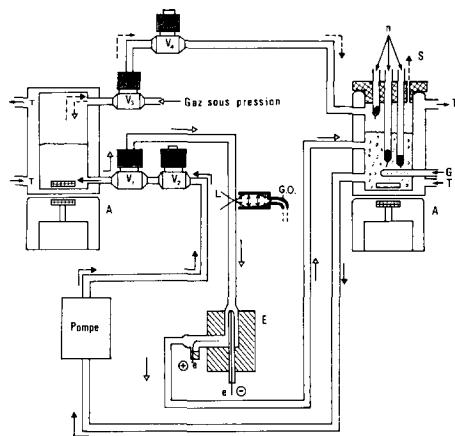


Fig. 1. Schéma du montage: —►, sens du liquide à l'écoulement; —→, sens du liquide au pompage; ---►, sens du gaz sous pression à l'écoulement; ---→, sens du gaz au pompage; A, agitateur magnétique; E, bloc porteur d'électrodes; e, électrode; G, barbotage de gaz; n, capteurs électrolytiques; S, sortie du gaz; T, thermorégularisation; V, vanne électromagnétique; G.O., guide optique souple; L, lumière actinique.

Abréviation: CMU, 3-(*p*-chlorophényl)-1,1-diméthylurée.

xénon. Un guide optique souple et une crémaillère permettent le déplacement et le positionnement précis du spot le long du tube. Le courant polarographique résulte de la réduction de l' O_2 par une électrode de platine nue de 2 mm de diamètre, placée dans l'axe du capillaire et polarisée négativement par rapport à une électrode de référence en argent chloruré. En modifiant la distance entre le spot et l'électrode, on fait varier le temps séparant l'éclat de la mesure, reconstituant ainsi point par point la cinétique d'apparition. L'exigence du régime tourbillonnaire pour une relation linéaire entre une distance sur le capillaire et un temps entraîne une limitation inférieure de la vitesse linéaire d'écoulement. Avec les vitesses et les capillaires utilisés, le temps exploré est compris entre $1 \cdot 10^{-3}$ et $15 \cdot 10^{-3}$ sec, la largeur du spot correspond à des durées d'éclat de $2 \cdot 10^{-4}$ à $5 \cdot 10^{-4}$ sec. L'ensemble est thermorégularisé, la suspension saturée avec un mélange de 95% N_2 -5% CO_2 . La sensibilité est de $10^{-8} M$ d' O_2 , la précision des mesures de 10% .

La préillumination nécessaire pour obtenir de l' O_2 avec de courts éclats⁴ est telle que son effet est saturant: le système est totalement "activé". Pour pouvoir comparer les résultats, on normalise les mesures à $I \cdot t_0 = \text{constante}$ ($I = \text{intensité}$; $t_0 = \text{durée d'éclat}$).

Cinétiques à 26°. La Fig. 2 (a) montre la cinétique obtenue avec des algues de diamètre inférieur à 3.5μ (conservées à 7° pendant 24 h). L'étude de cette cinétique (Fig. 2, b) donne une réaction du premier ordre avec une constante de vitesse entre 400 et 500 sec⁻¹. Avec des algues de 5μ de diamètre moyen (aminotriazol ajouté au milieu de culture) la constante de vitesse est de l'ordre de 300 sec⁻¹.

Effet de la température. En étudiant avec des petites algues la cinétique à 26° et 9°, on détermine une énergie d'activation de 6.6 kcal/mole, soit un Q_{10} de 1.4.

*Effet du 3-(*p*-chlorophényl)-1,1-diméthylurée (CMU).* Aux concentrations crois-

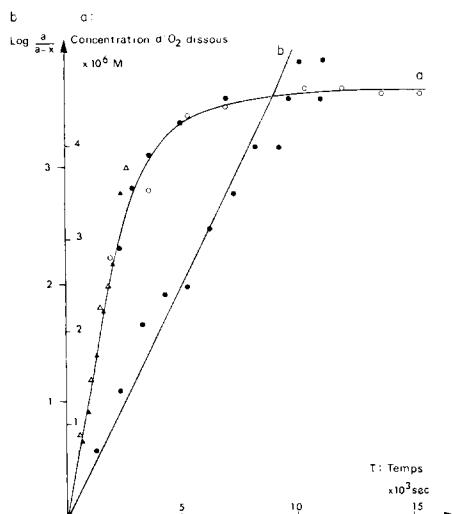


Fig. 2. (a) Cinétique d'émission d' O_2 photosynthétique à la suite d'un bref éclair. Concentration des algues: $2 \cdot 10^8$ cellules par ml, diamètre des algues < 3.5μ , température: 26°, pH: 6.5. Vitesse linéaire d'écoulement en cm/sec: ○, $0.6 \cdot 10^8$; ●, $0.75 \cdot 10^8$; △, $1.2 \cdot 10^8$; ▲, $1.5 \cdot 10^8$. Durée d'éclat constante: 10^{-4} sec, intensité non saturante. (b) Etude de la cinétique comme réaction du premier ordre. a = concentration maximale d'oxygène dégagée par éclat; x = concentration atteinte au bout d'un temps d'obscurité T.

santes de CMU ($5 \cdot 10^{-7}$, 10^{-6} M), la quantité totale d' O_2 produite par éclat diminue mais la constante de vitesse reste la même. Le CMU semble bloquer et rendre inactive une partie du complexe chlorophyllien.

Energie d'activation de la diffusion de l' O_2 dans l'eau⁶. En étudiant les variations du rapport courant sur concentration, pour une solution d'électrolyte saturée d'air, en fonction de la température, on détermine une énergie d'activation de l'ordre de 2.2 kcal/mole, soit un Q_{10} de 1.1.

L' O_2 produit au sein du chloroplaste doit diffuser jusqu'à l'extérieur avant d'être détecté par l'électrode. Il est particulièrement important de prouver que la cinétique n'est pas uniquement due à la diffusion matérielle hors des cellules. De récentes mesures⁷ tendent à prouver que certains groupements pourraient favoriser la diffusion dans les tissus mais on ne connaît pas la valeur de la constante de diffusion à l'intérieur de la chlorelle. En employant le modèle très simplifié d'une sphère homogène de $4\ \mu$ de diamètre avec une concentration constante imposée à sa surface par l'agitation du milieu extérieur, la même constante de diffusion à l'intérieur et à l'extérieur et une production instantanée de l' O_2 au temps zéro, on calcule un temps de vidange inférieur à $2 \cdot 10^{-3}$ sec. Ceci associé au fait que l'énergie d'activation trouvée est supérieure à celle de la diffusion de l' O_2 dans l'eau, tend à prouver que la cinétique d'apparition n'est pas seulement limitée par la diffusion. Si les différents traitements, utilisés pour obtenir des algues de taille différente, ne changent pas leur contenu chimique, la variation de la constante de vitesse avec la taille des algues et le temps de vidange du modèle mathématique semblent montrer que la diffusion doit partiellement intervenir.

Nous arrivons donc à des conclusions identiques à celles que JOLIOT⁸ a tirées de l'étude de l'émission d' O_2 par des algues soumises à un éclairage dont l'intensité est modulée sinusoïdalement. L'ordre de grandeur des caractéristiques de la réaction thermique séparant l'acte photochimique de l'oxygène est le même quoique les valeurs trouvées ici soient légèrement inférieures.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur J. LAVOREL, qui a été l'inspirateur de cette manipulation, pour l'aide et les conseils qu'il m'a constamment prodigués.

*Laboratoire de Photosynthèse,
91 Gif-sur-Yvette (France)*

A. L. ETIENNE*

1 P. JOLIOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 102 (1965) 116.

2 J. M. KOLTHOFF ET J. J. LINGANE, *Polarography*, Interscience, New York, 1952.

3 H. HARTRIDGE ET F. J. W. ROUGHTON, *Proc. Roy. Soc. London, Ser. A*, 194 (1923) 336.

4 C. P. WITTINGHAM ET A. H. BROWN, *J. Exptl. Botany*, 9 (1958) 311.

5 E. GUERIN DUMARTRAIT, Thèse de Doctorat ès Sciences, Paris, 1966.

6 Y. DE KOUCHKOVSKY, Thèse de Doctorat ès Sciences, Paris, 1963.

7 J. D. B. MACDOUGALL ET M. MACCABE, *Nature*, 215 (1967) 1173.

8 P. JOLIOT, *J. Chim. Phys.*, 63 (1966) 1423.

Reçu le 5 janvier, 1968

Manuscrit revisé reçu le 26 février, 1968

* Actuellement: Lawrence Radiation Laboratory, University of California, Berkeley, Calif. 94720, U.S.A.