

BBA 45 847

ETUDE DE LA PHOTOOXYDATION DE L'HYDROXYLAMINE
PAR LES CHLOROPLASTES D'EPINARDS*

PIERRE BENNOUN ET ANNE JOLIOT

Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris 5e (France)

(Reçu le 10 avril, 1969)

SUMMARY

Studies on hydroxylamine photooxidation by spinach chloroplasts

By the use of a modulated electrode, an amperometric signal different from the oxygen one has been detected in the presence of hydroxylamine.

1. This signal has been ascribed to an oxidized form of hydroxylamine produced in the light.
2. This photooxidation is sensitized by pigments of Photosystem II.
3. The same photochemical centers are involved in this photooxidation and photolysis of water.
4. Both reactions are associated to the same photosynthetic electron transfer reactions.
5. Both reactions are 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea sensitive.
6. Contrary to oxygen evolving reaction, the formation of photooxidized hydroxylamine implies no activation phase and occurs in a one-quantum process.

INTRODUCTION

Différents auteurs¹⁻³ ont montré que des composés tels que l'hydroxylamine, le phénylène-diamine ou l'acide 2,3-dicétogulonique étaient oxydés à la lumière par des préparations de chloroplastes; ces photooxydations ont été reliées à l'activité du Système photochimique II.

L'étude de l'effet de l'hydroxylamine sur les cinétiques d'émission d'oxygène et de fluorescence chez *Chlorella* avait conduit l'un de nous à supposer que cet inhibiteur agissait sur le donneur primaire d'électrons du Système II (réf. 4).

On a repris ici, l'étude cinétique de l'action de cet inhibiteur sur des chloroplastes isolés d'épinards.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les chloroplastes sont extraits des feuilles d'épinards selon la méthode décrite par YAMASHITA ET BUTLER². Ils sont remis en suspension dans du tampon Tris-HCl

Abréviation: DCMU, 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée.

* Equipe de Recherche No. 16 du Centre National de la Recherche Scientifique.

0.05 M (pH 7.8), saccharose 0.4 M, KCl 0.1 M et sérumbumine 9 g/l. La ferredoxine utilisée dans certaines expériences a été purifiée à partir de souches sauvages de *Chlamydomonas reinhardtii* par Mr. N. H. Chua, selon la méthode décrite par GORMAN ET LEVINE⁵.

L'étude cinétique de la réaction d'émission d'oxygène et du signal ampérométrique obtenu en présence d'hydroxylamine a été faite à l'aide de la méthode polarographique en lumière d'intensité modulée, décrite par JOLIOT *et al.*⁶ et JOLIOT ET JOLIOT⁷. La plupart des expériences ont été réalisées à la fréquence de 25 cycles/sec. Le temps de réponse est alors de 40 msec.

Les cinétiques d'émission de fluorescence ont été suivies à l'aide d'un montage réalisé par DELOSME⁸. Le temps de réponse nécessaire pour ces expériences n'excédant pas la milliseconde, l'ouverture du faisceau lumineux est obtenue par commande électromagnétique d'un obturateur.

RÉSULTATS

Réponse ampérométrique en présence d'hydroxylamine

Lorsqu'à la suite d'une longue période d'obscurité, les chloroplastes sont soumis à une illumination de faible intensité, on observe une phase d'activation⁹ au cours de laquelle la vitesse d'émission d'oxygène croît jusqu'à atteindre un niveau stationnaire (Fig. 1, Courbe 1).

Dans ces conditions, l'addition de l'hydroxylamine se traduit de la façon suivante:

(a) Pour des concentrations inférieures à 0.1 mM, on observe une augmentation de la durée de la phase d'activation et une diminution de la vitesse stationnaire d'émission d'oxygène (Fig. 1, Courbe 2).

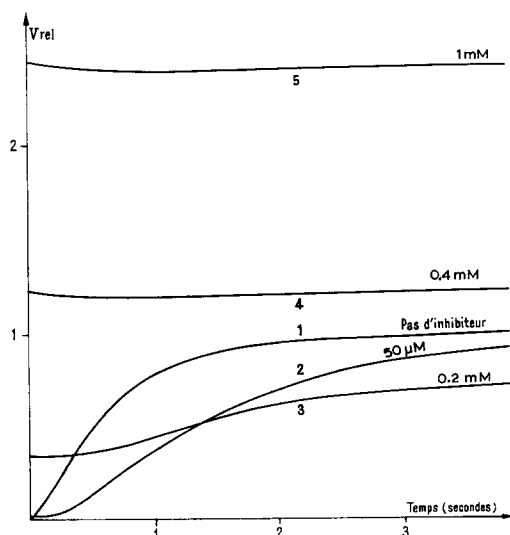


Fig. 1. Effet de l'hydroxylamine sur la réponse ampérométrique en lumière de faible intensité (I , approx. $800 \text{ ergs} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$). Fréquence de modulation, 25 cycles/sec. Polarisation, -0.6 V . Temp., 20° .

(b) Au delà de 0.1 mM, un signal dont l'amplitude est stationnaire dès l'établissement de la lumière, se superpose à la réponse oxygène. L'amplitude de ce signal rapide croît avec la concentration d'hydroxylamine. A 1 mM, l'émission d'oxygène est totalement inhibée et la réponse rapide est environ 3 fois plus importante que la réponse oxygène observée en l'absence d'inhibiteur (Fig. 1, Courbes 3-5).

(c) La réponse rapide atteint une amplitude maximum pour une concentration d'hydroxylamine de 10 mM; cette amplitude peut atteindre 20 fois la valeur stationnaire de la réponse oxygène en l'absence d'inhibiteur.

L'existence d'un tel signal ampérométrique en présence d'hydroxylamine nous a conduit à étudier, d'une part ses caractéristiques polarographiques, et d'autre part, ses éventuelles relations avec la chaîne photosynthétique.

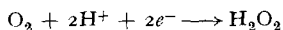
Polarogrammes

On a porté l'amplitude stationnaire des réponses observées en lumière de faible intensité en fonction de la tension appliquée entre les électrodes.

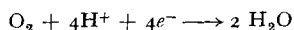
La Fig. 2 montre que le polarogramme de la réponse ampérométrique en présence d'hydroxylamine 10 mM est distinct de celui de l'oxygène: les produits dosés dans les deux cas sont donc différents.

Par contre, les polarogrammes obtenus entre 1 et 10 mM présentent les mêmes caractéristiques et ne diffèrent entre eux que d'un facteur quantitatif: le même produit est donc formé dans ces conditions; détecté à un potentiel négatif, il résulte vraisemblablement d'une oxydation de l'hydroxylamine à la lumière.

L'étude faite par JOLIOT *et al.*⁶ du polarogramme modulé de l'oxygène montre qu'à un potentiel voisin de -0.6 V, la réaction à l'électrode est la suivante:



Pour des potentiels plus négatifs, la réduction de l'oxygène se poursuit jusqu'à la formation d'eau:



Au niveau de la première vague de ce polarogramme, les courants ampérométriques obtenus sont environ 2 fois plus faibles que ceux détectés au niveau de la seconde vague.

Dans ces conditions, la réduction d'une molécule d'oxygène à l'électrode provoque le passage de 2 électrons dans le circuit, alors que sa formation a nécessité le transfert de 4 électrons à travers les centres du Système II (4 réactions photochimiques).

Dans le cas de l'hydroxylamine, le polarogramme ne présente qu'une seule vague et la détection est effectuée au niveau du plateau (-0.6 V).

L'amplitude des réponses observées à 1 mM peut s'interpréter ainsi: l'oxydation d'une molécule d'hydroxylamine par les chloroplastes met en jeu le transfert de n électrons et la réduction à l'électrode du dérivé oxydé se traduit par le passage du même nombre d'électrons dans le circuit. Le rendement de détection électrochimique est alors environ 2 fois plus élevé dans le cas de l'hydroxylamine que dans le cas de l'oxygène. Le composé détecté dans ces conditions devrait de plus avoir un coefficient de diffusion comparable à celui de l'oxygène: en effet, selon JOLIOT *et al.*⁶, à une fréquence de modulation donnée, l'amplitude de la réponse ampérométrique est une fonction croissante du coefficient de diffusion du produit dosé.

Par contre, le produit dosé à 1 mM ou 10 mM d'hydroxylamine étant le même, la stimulation du signal observée entre ces deux concentrations nécessite une autre interprétation. Pour une fréquence de modulation nulle, la réponse ampérométrique devient indépendante du coefficient de diffusion du produit dosé⁶. Il était donc intéressant de préciser dans quelle mesure cette stimulation pouvait être fonction de la fréquence de modulation (Fig. 3) : l'expérience montre qu'à fréquence nulle, les réponses obtenues aux deux concentrations d'inhibiteur sont les mêmes. On est ainsi conduit à admettre que le paramètre qui varie avec la concentration d'hydroxylamine est le coefficient de diffusion du produit dosé. Le mécanisme d'une telle diffusion stimulée reste inconnu, mais la forme des cinétiques observées étant la même aux deux concentrations d'inhibiteur, les expériences décrites ci-dessous ont été réalisées à 10 mM.

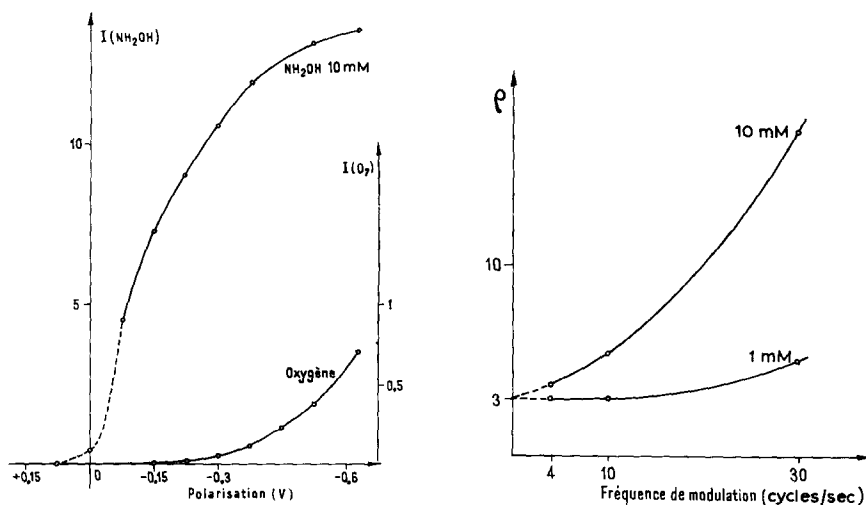


Fig. 2. Polarogrammes. (En ordonnée, courant ampérométrique modulé, unités relatives.) Fréquence de modulation, 30 cycles/sec. NADP 0.5 mM + ferredoxine 0.10 μ M. La partie en pointillé du polarogramme correspond à l'apparition aux basses tensions d'un signal ampérométrique complexe qui n'a pas été étudié. Temp., 20°.

Fig. 3. Fonction $\rho = f(\nu)$. ρ = rapport de la réponse ampérométrique en présence d'hydroxylamine à la réponse oxygène en l'absence d'inhibiteur. ν = fréquence de modulation de la lumière. NADP 0.5 mM + ferredoxine 0.1 μ M. Temp., 20° Polarisation, -0.6 V.

Effet de la longueur d'onde

Afin de déterminer si les pigments sensibilisateurs de la photooxydation de l'hydroxylamine appartenaient à l'un ou à l'autre des systèmes photochimiques impliqués dans la chaîne photosynthétique, on a étudié la dépendance de cette réaction vis-à-vis de la longueur d'onde.

L'intensité de deux faisceaux lumineux de longueur d'onde $\lambda_1 = 700$ nm et $\lambda_2 = 655$ nm a été ajustée afin que d'une part le jet d'oxygène n'apparaisse pas et que d'autre part la vitesse stationnaire d'émission d'oxygène soit comparable aux deux longueurs d'onde. On sait que dans ces conditions le spectre d'action de la vitesse d'émission d'oxygène à la fin de la période d'activation est un spectre type Système II (réf. 9).

Si la réaction photochimique d'oxydation de l'hydroxylamine était sensibilisée indifféremment par les pigments associés aux deux systèmes photochimiques, on devrait s'attendre à des réponses beaucoup plus importantes en présence du faisceau 700 nm. L'expérience présentée Fig. 4 montre qu'aux deux longueurs d'onde, le rapport des amplitudes de la réponse en présence d'hydroxylamine est égal au rapport des vitesses d'émission d'oxygène observées à la fin de la période d'activation.

On doit donc admettre que la photooxydation de l'hydroxylamine est sensibilisée par les seuls pigments associés au Système photochimique II.

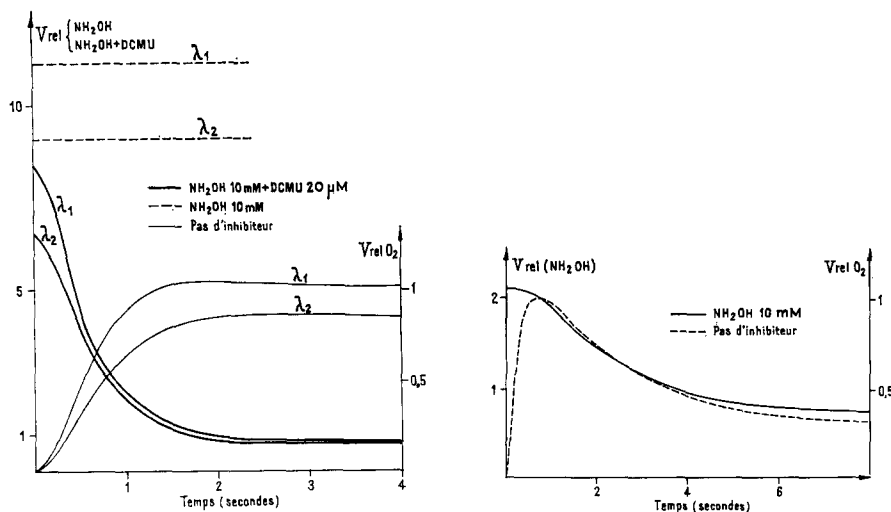


Fig. 4. Effet de la longueur d'onde d'illumination sur la réponse ampérométrique. $\lambda_1 = 700 \text{ nm}$; $\lambda_2 = 655 \text{ nm}$. L'intensité du faisceau λ_1 est environ 8 fois plus élevée que celle du faisceau λ_2 . Fréquence de modulation, 25 cycles/sec. Polarisation, -0.6 V . Temp., 20° . NADP 0.5 mM + ferredoxine 0.1 μM . L'addition de DCMU est réalisée après 5 min d'obscurité. Dans ces conditions, l'émission d'oxygène est inhibée à plus de 95 %.

Fig. 5. Réponse ampérométrique en lumière de forte intensité. Fréquence de modulation, 25 cycles per sec. Polarisation, -0.6 V . Temp., 20° .

Effet des fortes intensités lumineuses

On sait qu'à la suite d'une longue période d'obscurité, une illumination de forte intensité provoque l'émission d'un jet d'oxygène par les chloroplastes¹⁰; la vitesse stationnaire observée après le jet est alors limitée par la vitesse de réoxydation de l'accepteur primaire d'électrons de la Réaction photochimique I.

Comme le montre la Fig. 5, un jet semblable s'observe en présence d'hydroxylamine. De plus, l'addition d'un accepteur d'électrons de bas potentiel (NADP + ferredoxine) a un effet comparable sur les deux réactions. On remarque en effet sur la Fig. 6 que le jet disparaît presque totalement en présence de ces composés.

On peut voir également que l'addition d'hydroxylamine n'entraîne pas de modifications essentielles des cinétiques caractéristiques de l'induction de fluorescence (Fig. 7).

Il faut donc admettre que la photooxydation de l'hydroxylamine et la photolyse de l'eau sont associées à la même chaîne de transfert d'électrons.

Effet du 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée (DCMU)

Il est généralement admis que cet inhibiteur bloque spécifiquement le transfert d'électrons au niveau de l'accepteur primaire d'électrons Q de la Réaction photochimique II.

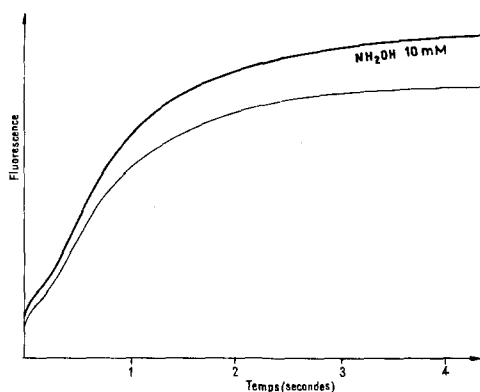
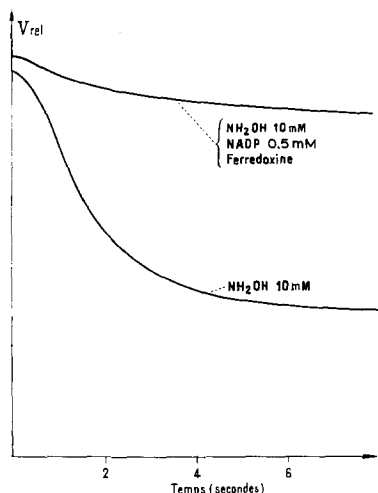


Fig. 6. Effet d'un accepteur de bas potentiel (NADP 0.5 mM + ferredoxine 0.1 μ M) sur la réponse ampérométrique obtenue en présence d'hydroxylamine 10 mM pour une forte intensité lumineuse. Fréquence de modulation, 25 cycles/sec. Polarisation, -0.6 V. Temp., 20° .

Fig. 7. Induction de fluorescence observée en l'absence et en présence d'hydroxylamine 10 mM. Temp., 20° .

La photooxydation de l'hydroxylamine observée en présence de DCMU présente les caractéristiques suivantes :

(1) On voit sur la Fig. 4 que la photooxydation de l'hydroxylamine, comme la réaction d'émission d'oxygène, est sensible au DCMU. Le DCMU étant ajouté à l'obscurité, on observe de plus, à la lumière, une cinétique transitoire dont la vitesse initiale est voisine de la vitesse mesurée en l'absence de DCMU. Aux faibles intensités lumineuses utilisées ici, cette cinétique décroissante conduit à un niveau stationnaire faible mais différent de zéro.

On remarque que cette cinétique présente une constante de temps comparable à celle de la phase d'activation observée en l'absence de tout inhibiteur.

(2) L'effet d'un éclair de très courte durée et d'intensité saturante, précédant de 20 msec l'illumination par le faisceau modulé, se traduit par la disparition de cette cinétique. L'amplitude de la réponse est alors égale, dès l'établissement de la lumière au niveau stationnaire précédemment atteint (Fig. 8).

(3) Le caractère photochimique de cette cinétique ressort également de l'expérience réalisée à deux intensités lumineuses $I = 1$ et $I = 6$ (Fig. 9).

(4) L'effet de la longueur d'onde d'illumination étudié dans les conditions expérimentales décrites précédemment révèle que cette réaction a la même dépendance spectrale que la réaction d'émission d'oxygène (Fig. 4, courbes en trait fort).

(5) On sait qu'en présence de DCMU, l'induction de fluorescence présente une

cinétique caractéristique^{11,8}. Comme le montre la Fig. 10, celle-ci s'observe également après addition d'hydroxylamine. Cette cinétique apparaît comme sensiblement complémentaire de la réponse modulée observée en présence des deux inhibiteurs. De même qu'en présence d'hydroxylamine seule (Fig. 7), on peut noter une légère augmentation des niveaux O et P (selon la terminologie de LAVOREL¹²).

Enfin, aussi bien en l'absence qu'en présence d'hydroxylamine, une illumination de très faible intensité ne permet pas d'atteindre le niveau maximum de fluorescence.

Les propriétés particulières de la photoxydation de l'hydroxylamine en présence

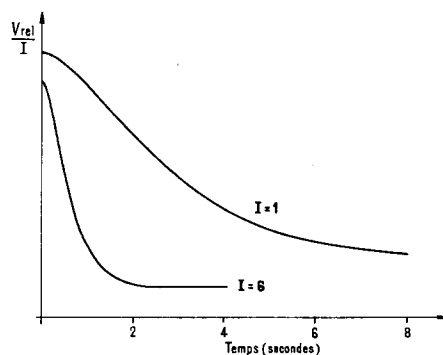
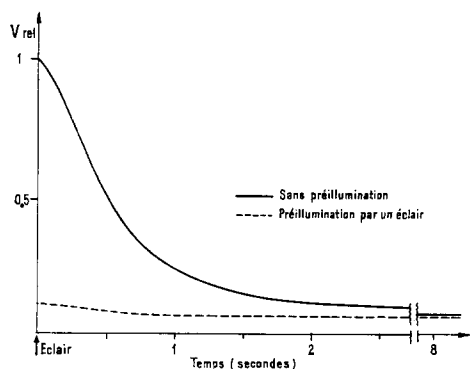


Fig. 8. Effet d'une préillumination par un éclair de courte durée (< 0.1 msec) et d'intensité saturante sur la réponse ampérométrique obtenue en présence d'hydroxylamine 10 mM et de DCMU 20 μM . L'éclair se produit 20 msec avant le début de l'illumination modulée. Fréquence de modulation, 25 cycles/sec. Polarisation, -0.6 V. Temp., 20° . L'addition de DCMU est réalisée après 5 min d'obscurité.

Fig. 9. Effet de l'intensité lumineuse sur la réponse ampérométrique en présence d'hydroxylamine 10 mM et de DCMU 20 μM . Fréquence de modulation, 25 cycles/sec. Polarisation, -0.6 V. Temp., 20° . L'addition de DCMU est réalisée après 5 min d'obscurité.

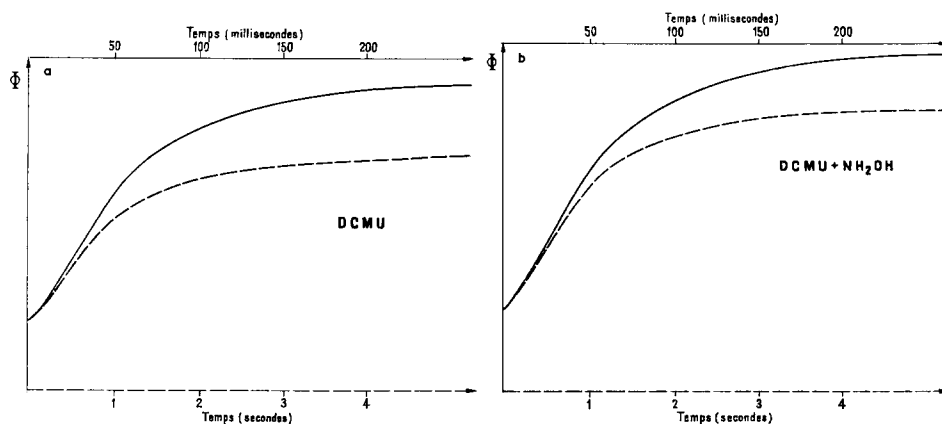


Fig. 10. Effet de l'intensité lumineuse sur les cinétiques d'émission de fluorescence. Φ = rendement de fluorescence. Abscisses et courbes en trait plein: forte lumière ($I = 16$). Abscisses et courbes en traits tiretés: faible lumière ($I = 1$). (a) DCMU 20 μM . (b) Hydroxylamine 10 μM + DCMU 20 μM . L'addition de DCMU est réalisée après 5 min d'obscurité.

de DCMU distinguent de manière fondamentale celle-ci de la réaction normale d'émission d'oxygène. Ces résultats seront discutés en relation avec l'ensemble des propriétés précédemment établies.

DISCUSSION

Le signal ampérométrique modulé apparaissant en présence d'hydroxylamine a été attribué à la formation à la lumière d'un dérivé oxydé de l'hydroxylamine. Cette photooxydation et la réaction d'émission d'oxygène présentent plusieurs caractéristiques communes: leurs pigments sensibilisateurs sont les mêmes; elles sont associées à la même chaîne de transfert d'électrons.

Deux propriétés spécifiques de la photooxydation de l'hydroxylamine ont cependant été reconnues: (1) l'absence de phase d'activation dans la formation du produit oxydé; (2) l'apparition d'une cinétique caractéristique en présence de concentrations saturantes de DCMU.

Selon JOLIOT¹³, la phase d'activation de la réaction d'émission d'oxygène traduit la nécessité d'accumuler l'effet de deux réactions photochimiques par centre du Système II pour produire un atome d'oxygène. L'inhibition de l'émission d'oxygène en présence de DCMU, qui se manifeste dès le début de l'illumination, résulte en l'impossibilité de réaliser plus d'une réaction photochimique par centre dans ces conditions.

Par contre, la formation instantanée à la lumière d'un dérivé oxydé de l'hydroxylamine montre que l'absorption d'un seul photon par centre photochimique est suffisante pour produire une molécule de ce composé. La cinétique transitoire observée en présence de DCMU confirme ce mécanisme, et conduit à le préciser:

La constante de temps de cette cinétique décroissante est comparable à celle de la phase d'activation observée sans inhibiteur. Ces deux réactions ayant les mêmes pigments sensibilisateurs, la correspondance de leurs constantes de temps implique que les centres photochimiques associés à chacune d'elles soient présents à la même concentration.

Ces centres sont de plus liés à la même chaîne de transfert d'électrons. On peut donc en conclure que les mêmes centres photochimiques participent aux deux réactions.

La similitude existant entre la cinétique de photooxydation de l'hydroxylamine en présence de DCMU et la cinétique d'émission de fluorescence observée dans les mêmes conditions vient confirmer cette hypothèse.

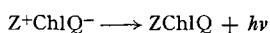
Ces deux cinétiques traduisent le même transfert d'électrons à travers les centres photochimiques du Système II. Ce transfert peut être suivi tant au niveau de la réduction de l'accepteur primaire Q (par la variation du rendement de fluorescence) qu'au niveau du donneur primaire Z réagissant avec l'hydroxylamine à mesure de son oxydation. La photooxydation de l'hydroxylamine s'observe jusqu'à réduction complète de l'accepteur Q. Celle-ci peut être obtenue par l'effet d'un seul éclair de très courte durée.

A des lumières de très faible intensité, on a vu qu'en présence de DCMU, il n'était pas possible d'atteindre le rendement maximum de fluorescence aussi bien en l'absence qu'en présence d'hydroxylamine (Fig. 10).

De plus, dans ces conditions, la vitesse stationnaire de photooxydation de l'hydroxylamine n'est pas nulle.

Ceci traduit l'intervention d'une réaction thermique de réoxydation de l'accepteur Q par un oxydant présent dans le milieu (par exemple l'oxygène) plutôt qu'une réaction inverse de recombinaison des charges.

L'interprétation précédente du mode d'action de l'hydroxylamine peut être rapprochée des données relatives à l'action de ce composé sur l'émission de luminescence. Différents auteurs¹⁴⁻¹⁶ ont montré que la composante intermédiaire de l'émission de luminescence était inhibée par l'hydroxylamine. Selon LAVOREL^{16,17}, la luminescence est produite au cours d'une réaction inverse de la Réaction photochimique II :



La luminescence manifeste ainsi une double dépendance vis-à-vis du donneur et de l'accepteur primaire de la Réaction photochimique II.

En l'absence d'inhibiteurs, le mécanisme à deux quanta impliqué dans la formation de l'oxygène requiert une longue durée de vie de l'état Z^+ . Cette caractéristique s'accorde bien avec la durée de vie de la luminescence observée dans ces conditions.

En présence d'hydroxylamine, la durée de vie de l'état Z^+ est au contraire beaucoup plus courte : l'inhibition de la luminescence qu'on observe alors permet de confirmer que cette réaction dépend effectivement de l'état du donneur primaire Z.

Plusieurs problèmes soulevés au cours de ce travail restent encore à étudier : ainsi, la nature du photoproduit électroactif dosé nous est inconnue. De même, l'origine des phénomènes de stimulation mis en évidence aux fortes concentrations d'hydroxylamine n'a pas été éclaircie. L'interprétation proposée impliquerait un mécanisme de stimulation par l'hydroxylamine de la diffusion du produit dosé. Les coefficients de diffusion anormalement élevés des protons ou des radicaux hydroxyle dans l'eau ont été interprétés par des mécanismes de "saut" par l'intermédiaire de microcristaux de glace présents en solution¹⁸. Un tel mécanisme pourrait être envisagé entre le dérivé oxydé de l'hydroxylamine et des associations moléculaires impliquant l'hydroxylamine en solution.

D'autre part, l'étude de l'effet de faibles concentrations d'hydroxylamine sur la phase d'activation de l'émission d'oxygène pourrait conduire à une meilleure compréhension des relations existant entre cet inhibiteur, l'eau et le donneur primaire d'électrons Z de la Réaction photochimique II.

RÉSUMÉ

A l'aide de la méthode polarographique en lumière modulée décrite par JOLIOT, on a mis en évidence en présence d'hydroxylamine, un signal ampérométrique différent de celui dû à l'oxygène.

1. Ce signal a été attribué à la formation à la lumière d'un dérivé oxydé de l'hydroxylamine.

2. Cette photooxydation est sensibilisée par les pigments du Système II et implique les mêmes centres photochimiques que la photolyse de l'eau.

3. Ces deux réactions sont associées au même transfert d'électrons à travers la chaîne photosynthétique.

4. Cette photooxydation est sensible au 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée.

5. Contrairement à la réaction d'émission d'oxygène, la formation du dérivé oxydé de l'hydroxylamine ne présente pas de phase d'activation et ne requiert qu'un acte photochimique par centre du Système II.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 S. VAKLINOVA, E. NIKOLOVA-TSENOVA ET S. ANCHELOVA, *Compt. Rend. Acad. Bulgare Sci.*, 19 (1966) 1191.
- 2 T. YAMASHITA ET W. L. BUTLER, dans K. SHIBATA, A. TAKAMIYA, A. T. JAGENDORF ET R. C. FULLER, *Comparative Biochemistry and Biophysics of Photosynthesis*, University of Tokyo Press, Tokyo, 1968, p. 179.
- 3 H. M. HABERMANN, M. A. HANDEL ET P. MCKELLAR, *Photochem. Photobiol.*, 7 (1968) 211.
- 4 A. JOLIOT, *Physiol. Végétale*, 6 (1968) 235.
- 5 D. S. GORMAN ET R. P. LEVINE, *Plant Physiol.*, 41 (1966) 1643.
- 6 P. JOLIOT, M. HOFNUNG ET R. CHABAUD, *J. Chim. Phys.*, 10 (1966) 1423.
- 7 P. JOLIOT ET A. JOLIOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 153 (1968) 625.
- 8 R. DELOSME, *Biochim. Biophys. Acta*, 143 (1967) 108.
- 9 P. JOLIOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 102 (1965) 116.
- 10 Y. DE KOUCHKOVSKY, *Physiol. Végétale*, 1 (1963) 15.
- 11 P. JOLIOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 102 (1965) 135.
- 12 J. LAVOREL, *Plant Physiol.*, 34 (1959) 204.
- 13 P. JOLIOT, *Photochem. Photobiol.*, 8 (1968) 451.
- 14 W. E. ARTHUR ET B. L. STREHLER, *Arch. Biochem. Biophys.*, 70 (1957) 507.
- 15 W. F. BERTSCH, J. B. DAVIDSON ET J. R. AZZI, *Photosynthetic Mechanisms in Green Plants*, Natl. Acad. Sci. — Natl. Res. Council, Washington, 1963, p. 701.
- 16 J. LAVOREL, *Proc. 3rd Western-Europe Conf. Photosynthesis, Freudenstadt 1968*, sous presse.
- 17 J. LAVOREL, *Biochim. Biophys. Acta*, 153 (1968) 727.
- 18 G. NEMETHY ET N. A. SCHERAGA, *J. Chem. Phys.*, 36 (1962) 3382.

Biochim. Biophys. Acta, 189 (1969) 85-94