

BBA 45877

INFLUENCE DE L'OXYGENE SUR LES TRANSFERTS D'ELECTRONS DE LA PHOTOSYNTHESE

II. INFLUENCE DE TRES FAIBLES CONCENTRATIONS EN OXYGENE SUR LA REDUCTION DU NADP⁺ PAR LES CHLOROPLASTES ISOLES

Y. MATHIEU

*Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale, associé au C.N.R.S.,**Faculté des Sciences, 91 – Orsay (France)*

(Reçu le 21 juillet, 1969)

SUMMARY

Influence of oxygen on the electron transfers of photosynthesis. II. Influence of very low oxygen concentration on the NADP⁺ reduction by isolated chloroplasts

The influence of very low O₂ concentration on the NADP⁺ reduction by isolated spinach chloroplasts has been studied.

The results show that in the presence of very low O₂ concentration (< 0.3 %) NADP⁺ reduction is partially inhibited. This inhibition may be partially reversed under some conditions, especially when, in spite of the presence of an O₂ trap (glucose plus glucose oxidase (EC 1.1.3.4)) an O₂ evolution is observed.

INTRODUCTION

Le problème posé à propos de l'influence d'une anaérobiose stricte ou de la présence de traces d'O₂ sur la photosynthèse, déjà abordé par un certain nombre d'auteurs, n'a pas encore reçu de réponse satisfaisante.

La photosynthèse des algues (*Chlorelles* et *Scenedesmus*) est sévèrement inhibée par une incubation prolongée en anaérobiose¹. Chez les plantes supérieures, un séjour prolongé des feuilles dans des conditions d'anaérobiose provoque une inhibition de la photosynthèse en même temps que des dommages irréversibles^{2,3}.

Cependant, BURK ET WARBURG⁴ ont montré que la photosynthèse nécessite une forme spéciale d'autooxydation s'effectuant à une vitesse beaucoup plus grande que celle de la respiration normale. C'est pourquoi, la photosynthèse serait complètement inhibée dans des conditions strictes d'anaérobiose.

En ce qui concerne les chloroplastes isolés, des études de fluorescence ont montré que l'anaérobiose à l'obscurité n'avait pas d'action inhibitrice sur les activités photochimiques ultérieures, tandis qu'à la lumière une inhibition se manifeste.

Abréviation: HEPES, acide *N*-2-hydroxyéthylpipérazine-*N'*-2-éthanesulfonique.

L'intensité de fluorescence est la même dans l'air et dans l'azote, mais l'accroissement de fluorescence, au début de l'illumination, est plus important dans l'azote⁵.

Parmi tous les schémas proposés habituellement, aucun ne contient une allusion à la nécessité de l'O₂ dans les réactions de transferts d'électrons. Cependant l'O₂ interviendrait comme régulateur de la photophosphorylation cyclique⁶. Dans la photophosphorylation dite "pseudo cyclique", il intervient comme accepteur d'électrons. Ce mécanisme non cyclique, fonctionnant avec O₂ comme accepteur ne se réaliserait pas dans les conditions normales où le turn over du NADP⁺ est rapide⁷.

D'autre part, TREBST⁸ a constaté que l'illumination des chloroplastes sous atmosphère d'azote entraîne une incapacité ultérieure à réduire le ferricyanure et HEBER ET FRENCH⁹ ont montré la nécessité de la présence de l'O₂ pour que les chloroplastes isolés intacts puissent réduire le phosphoglycérate. Les résultats suivants établissent le rôle inhibiteur de l'absence quasi totale d'O₂ sur la réaction de Hill avec le NADP⁺ comme accepteur d'électrons.

MÉTHODES

Matériel végétal et conditions de culture

Les chloroplastes sont isolés à partir de feuilles d'Epinard (*Spinacia oleracea* L. var. *America*) cultivé en aquiculture sur milieu synthétique¹⁰. Pendant la culture, l'éclairement est de 15000 lux. La photopériode est de 24 h avec une alternance de 12 h de lumière et 12 h d'obscurité. La température est de 23° pendant la phase lumineuse et de 16° pendant la phase d'obscurité.

Isolement des chloroplastes

Après séparation de la nervure centrale, les feuilles sont broyées dans un mixeur contenant 100 ml de solution tamponnée maintenue au voisinage de 0° et dont la composition est la suivante: sorbitol 0.33 M, K₂HPO₄ 0.15 mM, MgCl₂ 1 mM, MnCl₂ 1 mM, NaCl 20 mM, Na₂ EDTA 2 mM, Na₄P₂O₇ 10 mM, pH 7.6.

Après filtration, le filtrat est centrifugé à 2000 × g. Cette accélération atteinte aussi rapidement que possible, maintenue pendant 20 sec, est suivie d'un freinage manuel de la centrifugeuse.

Les culots de chloroplastes en majorité intacts (50–80 % appartiennent à la Classe I selon SPENCER ET UNT¹¹) sont alors remis en suspension dans une solution ayant la même composition que celle utilisée pour le broyage, mais diluée 10 fois, le NaCl étant supprimé et le Na₄P₂O₇ remplacé par l'acide *N*-2-hydroxyéthyl-pipérazine-*N'*-2-éthanesulfonique (HEPES) 5 mM.

Le choc osmotique ainsi réalisé fait éclater les plastes et permet une meilleure pénétration du NADP⁺ au niveau des sites réactionnels.

Les essais sont effectués en ajoutant 50–150 µl de cette suspension chloroplastique à un milieu réactionnel de 5.5 ml dont la composition est la même que celle du milieu utilisé pour l'homogénéisation, le NaCl étant supprimé et le Na₄P₂O₇ remplacé par de l'HEPES 50 mM.

Dosage de l'O₂

Voir réf. 12.

Dosage du NADPH

Après enregistrement des cinétiques de dégagement d'O₂, 2 ml de la suspension sont placés dans un tube contenant 1 ml d'une solution saturée de bicarbonate. Après centrifugation à 35 000 × g · 15 min, la détermination de la quantité de NADP⁺ réduit est effectuée par mesure de l'absorbance du surnageant à 340 nm.

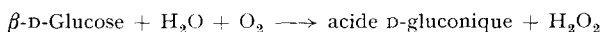
Les résultats sont exprimés en μmoles de NADP⁺ réduit · h⁻¹ · mg chloroplastes⁻¹.

Obtention des conditions d'anaérobiose

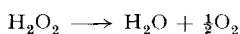
Les conditions d'anaérobiose mentionnées dans les expériences ont été obtenues par deux méthodes.

(1) *Par autoconsommation de l'O₂ présent dans le milieu réactionnel par l'électrode.* Il s'agit là d'une méthode assez longue ne permettant pas de faire plusieurs mesures avec la même préparation chloroplastique.

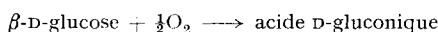
(2) *Par l'utilisation du système glucose-glucose aërodéshydrogénase plus catalase selon BENESCH ET BENESCH¹³.* En présence d'un excès de glucose, la glucose oxydase (E.C. 1.1.3.4) catalyse la réaction :



et en présence de catalase



Le bilan des réactions est le suivant :



En milieu étanche, l'équilibre des réactions se réalise pour une tension en O₂ inférieure à 3⁰/₁₀₀.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

(1) Anaérobiose obtenue par autoconsommation de l'O₂ par l'électrode

Les résultats du Tableau I montrent qu'en présence de faibles concentrations en O₂ la réduction du NADP⁺ est très légèrement inhibée. L'inhibition observée par rapport à 21 % O₂ est cependant toujours obtenue.

TABLEAU I

INFLUENCE DE L'ANAÉROBIOSE SUR LES VITESSES DE RÉDUCTION DU NADP⁺: ANAÉROBIOSE OBTENUE PAR AUTOCONSUMMATION DE L'O₂ PAR L'ÉLECTRODE

NADP⁺: 0.3 mM.

Chlorophylle (μg · ml ⁻¹)	Phase gazeuse initiale	Vitesse de réduction du NADP ⁺ (μmoles · h ⁻¹ · mg chlorophylle ⁻¹)	Stimulation par 21 % O ₂ (%)
229	Air	9.4	11
	Anaérobiose	8.3	
177	Air	10	17
	Anaérobiose	8.3	
206	Air	2.7	33
	Anaérobiose	1.8	

(2) Anaérobiose obtenue à l'aide du couple glucose-glucose oxydase

Les résultats du Tableau II confirment l'inhibition de la réduction du NADP⁺ par les très faibles concentrations en O₂. Il semble que cette inhibition soit fonction de l'activité des chloroplastes. L'amplitude de l'inhibition est plus grande dans le cas de préparations chloroplastiques faiblement actives (Tableaux I et II).

La Fig. 1 montre les tracés polarographiques obtenus en présence de diverses concentrations en glucose et glucose oxydase. En présence de concentrations suffisamment faibles pour permettre une libération d'O₂, on constate que l'inhibition est levée. Le réduction du NADP⁺ est alors identique à celle obtenue en présence de 1.5 % d'O₂ et supérieure à celle obtenue dans l'air (21 % O₂).

La Fig. 2 montre les tracés polarographiques des variations de concentrations

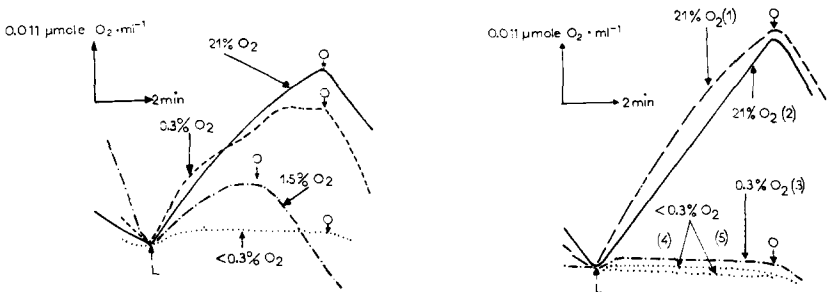


Fig. 1. Tracés polarographiques des variations de concentrations en O₂ lors de l'illumination d'une suspension de chloroplastes en présence de NADP⁺ 0.3 mM. Chlorophylle 169 μg · ml⁻¹; catalase 0.35 mg · ml⁻¹. L, lumière; O, obscurité.

Courbe	NADP ⁺ réduit (μmoles · h ⁻¹ · mg chlorophylle ⁻¹)	Glucose (mg · ml ⁻¹)	Glucose oxydase (unités · ml ⁻¹)
21 % O ₂	4.3	0	0.88
0.3 % O ₂	6.5	0.48	0.88
1.5 % O ₂	6.3	0.48	0.88
< 0.3 % O ₂	4.3	1.60	1.76

Fig. 2. Tracés polarographiques des variations de concentration en O₂ lors de l'illumination d'une suspension de chloroplastes en présence de NADP⁺ 0.3 mM. Chlorophylle 183 μg · ml⁻¹; catalase 0.35 mg · ml⁻¹.

Courbe	NADP ⁺ réduit (μmoles · h ⁻¹ · mg chlorophylle ⁻¹)	Glucose (mg · ml ⁻¹)	Glucose oxydase (unités · ml ⁻¹)
1	6.4	0	3.5
2	6.5	0	8.8
3	6.7	0.48	3.5
4	5.2	0.48	8.8
5	0	0.48	8.8

N.B.: La Courbe 5 est obtenue lorsque le NADP⁺ est ajouté après un prééclairement de 2.5 min.

en O_2 et l'amplitude de l'inhibition de la réduction du $NADP^+$ en présence de très faibles concentrations d' O_2 , en fonction de la quantité de glucose oxydase.

Il semble exister une zone de faibles concentrations en O_2 où la réduction du

TABLEAU II

INFLUENCE DE L'ANAÉROBIOSE SUR LES VITESSES DE RÉDUCTION DU $NADP^+$:
ANAÉROBIOSE OBTENUE A L'AIDE DE LA GLUCOSE OXYDASE

$NADP^+$: 0.3 mM.

<i>Chlorophylle</i> ($\mu g \cdot ml^{-1}$)	<i>Milieu réactionnel</i>	<i>Phase gazeuse</i> <i>initiale</i>	<i>Vitesse de réduction du $NADP^+$</i> ($\mu moles \cdot h^{-1} \cdot mg \text{ chlorophylle}^{-1}$)
158	Catalase 0.35 $mg \cdot ml^{-1}$, glucose oxydase 3.5 unités $\cdot ml^{-1}$	21 % O_2	2.1
	Catalase 0.35 $mg \cdot ml^{-1}$, glucose oxydase 3.5 unités $\cdot ml^{-1}$, β -D-glucose 480 $\mu g \cdot ml^{-1}$	2.1 % O_2 Anaérobiose	2.4 1.4
229	—	21 % O_2	10
	Catalase 0.35 $mg \cdot ml^{-1}$, glucose oxydase 8.8 unités $\cdot ml^{-1}$, β -D-glucose 480 $\mu g \cdot ml^{-1}$	Anaérobiose	8.3

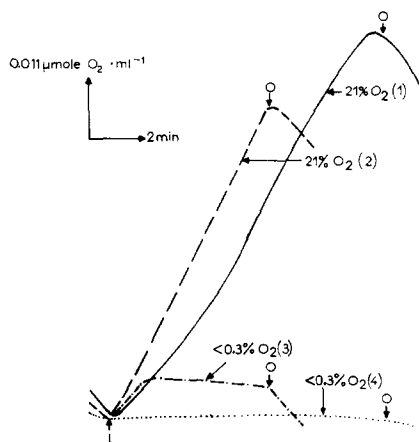


Fig. 3. Tracés polarographiques des variations de concentration en O_2 lors de l'illumination d'une suspension de chloroplastes en présence de $NADP^+$ 0.3 mM. Catalase 0.35 $mg \cdot ml^{-1}$; glucose oxydase 0.88 unité $\cdot ml^{-1}$.

<i>Courbe</i>	<i>$NADP^+$ réduit</i> ($\mu moles \cdot h^{-1} \cdot mg$ <i>chlorophylle</i> $^{-1}$)	<i>Glucose</i> ($mg \cdot ml^{-1}$)	<i>Chlorophylle</i> ($\mu g \cdot ml^{-1}$)
1	6.2	0	90
2	9.1	0	180
3	11.8	1.6	180
4	0	1.6	90

NADP⁺ est identique à celle obtenue dans l'air. On retrouve alors les résultats d'ELLYARD¹⁴ à propos de l'absence d'influence de l'O₂ sur la réduction du NADP⁺.

La Fig. 3 montre l'influence de l'activité des chloroplastes sur la levée de l'inhibition de la réduction du NADP⁺.

Lorsque, par suite d'une plus grande concentration en chlorophylle, le dégagement d'O₂ malgré la présence de glucose et de glucose oxydase, est lui-même plus important, la réduction du NADP⁺ n'est plus inhibée mais au contraire stimulée.

L'inhibition de la réduction du NADP⁺ peut donc être réversée lorsque les conditions de milieu (concentration en glucose et en glucose oxydase), ou d'activité des chloroplastes, permettent une libération d'O₂ même très faible.

CONCLUSION

En accord avec les résultats de TREBST⁸ et de HEBER ET FRENCH⁹, les expériences ci-dessus confirment la nécessité de l'O₂ dans les réactions de transfert d'électrons. Elles précisent que l'action d'O₂ intervient au moins en partie au niveau des réactions concernant la réduction du NADP⁺. A la différence des résultats obtenus par TREBST⁸ avec le ferricyanure, l'inhibition de la réduction du NADP⁺ en présence de très faibles concentrations en O₂ obtenues à l'aide de la glucose oxydase est réversible. Les résultats relatifs à l'inhibition des transferts d'électrons, en l'absence quasi totale d'O₂ sont encore trop fragmentaires pour permettre de proposer un mécanisme pour cette inhibition. L'hypothèse d'un transporteur d'électrons se trouvant en anaérobiose dans un état d'oxydo-réduction ne lui permettant pas d'accepter les électrons peut être avancée. La réversibilité de l'inhibition est en faveur de cette hypothèse.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par URBACH ET FORK¹⁵ avec des Chlorelles, pour lesquelles l'inhibition en anaérobiose serait due à l'arrêt de la réduction du cytochrome *f* par le Système II ou à l'interruption du transfert d'électrons entre la plastocyanine et les cytochromes. De même chez *Ulva*, le Système I serait incapable de fonctionner en l'absence d'O₂, d'après VIDAVER¹⁶.

REMERCIEMENT

Je remercie Mr. le Professeur A. Moysse pour ses précieux conseils et critiques.

RÉSUMÉ

L'influence de très faibles concentrations d'O₂ sur la réduction du NADP⁺ par les chloroplastes isolés de feuilles d'Epinard a été étudiée.

Les résultats montrent qu'en présence de très faibles concentrations d'O₂ (< 0.3 %) la réduction du NADP⁺ est partiellement inhibée. Cette inhibition peut être réversée dans certaines conditions et notamment, lorsque malgré la présence d'un piège à O₂ (glucose *plus* glucose oxydase (EC 1.1.3.4)) une émission d'O₂ a lieu.

REFERENCES

- 1 J. FRANK, P. PRINGSHEIM ET D. T. LAD, *Arch. Biochem.*, 7 (1945) 103.
- 2 E. I. RABINOWITCH, *Photosynthesis and Related Processes*, Vol. 1, Interscience, New York, 1945, p. 326.

- 3 A. MOYSE, *Physiol. Plantarum*, 8 (1955) 478.
- 4 D. BURK ET O. WARBURG, *Naturwissenschaften*, 37 (1950) 560.
- 5 E. I. RABINOWITCH, *Photosynthesis and Related Processes*, Vol. 2, Interscience, New York, 1956, p. 1313.
- 6 K. TAGAWA, H. Y. TSUJIMOTO ET D. I. ARNON, *Nature*, 199 (1963) 1247.
- 7 D. I. ARNON, H. Y. TSUJIMOTO ET B. D. MCSWAIN, *Nature*, 214 (1967) 562.
- 8 A. TREBST, *Colloq. Intern. Centre Natl. Rech. Sci. Paris*, 119 (1963) 499.
- 9 U. HEBER ET C. S. FRENCH, *Planta*, 79 (1968) 99.
- 10 D. I. ARNON, *Am. J. Botany*, 25 (1938) 322.
- 11 D. SPENCER ET H. UNT, *Australian J. Biol. Sci.*, 18 (1965) 197.
- 12 Y. MATHIEU, *Biochim. Biophys. Acta*, 189 (1969) 411.
- 13 R. E. BENESCH ET R. BENESCH, *Science*, 118 (1953) 447.
- 14 P. W. ELLYARD, *The Warburg Effect, Investigation Using Isolated Spinach Chloroplasts*, Ph. D. Thesis, Cornell University, USA, 1968.
- 15 W. URBACH ET D. C. FORK, *Carnegie Inst. Year Book*, 64 (1965) 390.
- 16 W. VIDAVER, *Carnegie Inst. Year Book*, 64 (1965) 395.

Biochim. Biophys. Acta, 189 (1969) 422-428