

BBA 45983

RÉOXYDATION DU QUENCHER DE FLUORESCENCE "Q" EN PRÉSENCE DE 3-(3,4-DICHLOROPHÉNYL)-***1,1***-DIMÉTHYLURÉE

PIERRE BENNOUN

Institut de Biologie Physico-Chimique, 13, rue Pierre et Marie Curie, Paris 5e (France)*
(Reçu le mars 9, 1970)

SUMMARY

*Reoxidation of the fluorescence quencher "Q" in the presence of 3-(3,4-dichlorophenyl)-***1,1***-dimethylurea*

Reoxidation of the fluorescence quencher Q in the presence of 3-(3,4-dichlorophenyl)-***1,1***-dimethylurea shows the following properties:

It is sensitive to very low concentrations of hydroxylamine (a few μM).

It corresponds to a back reaction between Q^- and the primary oxidant Z^+ formed in the light. A part of this back reaction gives rise to luminescence emission.

Within the range we studied the kinetic of reoxidation is second order with regards to Q^- .

INTRODUCTION

Selon DUYSENS ET SWEERS¹, une substance Q, accepteur d'électrons du Système II, agit, dans l'état oxydé, comme quencher de la fluorescence émise par la chlorophylle. Q est réduit photochimiquement par le Système II et oxydé indirectement par le Système I. Comme l'ont montré JOLIOT ET JOLIOT² et DELOSME³, le rendement de fluorescence n'est cependant pas une mesure linéaire de la concentration de Q. A la suite d'une illumination, Q^- se réoxyde selon une cinétique complexe (réaction P \rightarrow O de LAVOREL⁴). Cette réaction est ralentie par le 3-(3,4-dichlorophényl)-***1,1***-diméthylurée (DCMU) qui inhibe la réoxydation normale de Q^- par la chaîne de transfert d'électrons. Une réoxydation relativement rapide subsiste néanmoins dans ces conditions. On sait par ailleurs qu'en présence d'hydroxylamine et de DCMU, on peut observer une photooxydation transitoire de l'hydroxylamine correspondant à la réalisation d'une réaction photochimique par centre du Système II⁵. On a recherché ici l'origine de la réoxydation de Q^- en présence de DCMU, en particulier en étudiant sa sensibilité vis à vis de l'hydroxylamine.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les chloroplastes sont extraits des feuilles d'épinards selon la méthode décrite par AVRON⁶. Ils sont remis en suspension dans du tampon Tris-HCl 0.05 M (pH 7.8), saccharose 0.4 M, sérumalbumine 0.5 g/l. Les cinétiques d'émission de fluorescence

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

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

ont été suivies à l'aide d'un montage qui sera décrit ultérieurement. Celui-ci a été réalisé conjointement avec P. JOLIOT ET R. DELOSME.

Les cinétiques de luminescence ont été observées sur un montage décrit par BARBIERI *et al.*⁷.

RÉSULTATS

La réaction photochimique se produisant en présence de DCMU peut être schématisée de la manière suivante:



Le donneur primaire Z^+ peut réagir avec certains réducteurs; c'est le cas notamment de l'hydroxylamine et de son dérivé N-méthylé:



Par ailleurs, Q^- se réoxyde relativement rapidement même en présence du DCMU. La cinétique de cette réoxydation est présentée sur la Fig. 1. La concentration de Q est mesurée par l'aire comprise entre la courbe de montée de fluorescence et son asymptote. En effet, la fluorescence variable est une fonction linéaire de la vitesse de la réaction photochimique, bien que ces deux quantités ne soient pas proportionnelles à la concentration des centres photochimiques^{2,8}. L'aire en question représente donc le produit de la vitesse de la réaction photochimique par le temps. Cette méthode consiste à déterminer la relation existant entre la concentration des centres photochimiques et le rendement de fluorescence. Les mesures présentées ici se distinguent donc de celles faites par LAVOREL⁴ qui avait supposé que le rendement de fluorescence donnait une mesure directe de la concentration de Q . Chaque mesure

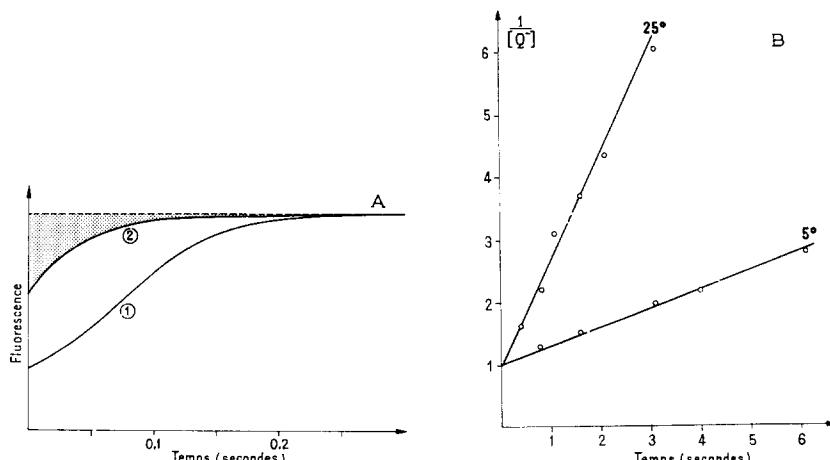


Fig. 1. A. Induction de fluorescence en présence de DCMU 20 μM chez Chlorella. Courbe 1, cinétique obtenue sans préillumination; Courbe 2, cinétique obtenue après une préillumination de 300 msec par le faisceau de mesure puis 1 sec d'obscurité. Temp. 2°. B. Cinétique de réoxydation de Q^- en présence de DCMU 20 μM chez Chlorella. La réduction complète de Q à la lumière est obtenue en 80 msec.

est effectuée après préillumination d'une durée standard, suffisante pour obtenir une réduction complète de Q. La Fig. 1 montre que la réoxydation de Q^- peut être assimilée, au moins dans le domaine étudié, à une réaction d'ordre 2 par rapport à Q; le temps de demi-réaction à 20° étant de 0.75 sec pour les Chlorelles et de 2.5 sec pour les chloroplastes d'épinards. L'énergie d'activation de la réaction est de 14 kcal·mole⁻¹·°K, soit l'équivalent de 0.6 eV. Cette valeur est la même pour les algues et les chloroplastes.

Afin de déterminer l'origine de cette réoxydation, on a étudié sa sensibilité à l'hydroxylamine. Chez Chlorella, en présence de $50 \mu\text{M}$ d'hydroxylamine et de $20 \mu\text{M}$ de DCMU, la réoxydation de Q^- est complètement bloquée. Le système se comporte comme un compteur de photons: 1 h après la préillumination, moins de 20 % de Q^- sont réoxydés. Il s'ensuit que des précautions importantes doivent être prises vis à vis de préilluminations accidentelles pour observer la montée de fluorescence en présence des deux inhibiteurs. Le même phénomène s'observe pour les chloroplastes d'épinards bien que dans ce cas, selon la qualité des préparations, on puisse observer un blocage plus ou moins efficace de la réoxydation.

L'action de très faibles concentrations d'hydroxylamine apparaît dans les expériences suivantes. La Fig. 2 montre les cinétiques de fluorescence en présence de DCMU pour des intensités lumineuses différentes d'un facteur 100: pour l'intensité la plus faible, la représentation en $i \times t$ indique que la cinétique n'est plus purement photochimique. La vitesse de réoxydation de Q^- est alors du même ordre de grandeur que la vitesse de réduction à la lumière. En présence de $20 \mu\text{M}$ d'hydroxylamine, la montée de fluorescence redevient purement photochimique.

Sur la Fig. 3, on voit comment est affectée la réoxydation de Q^- en présence

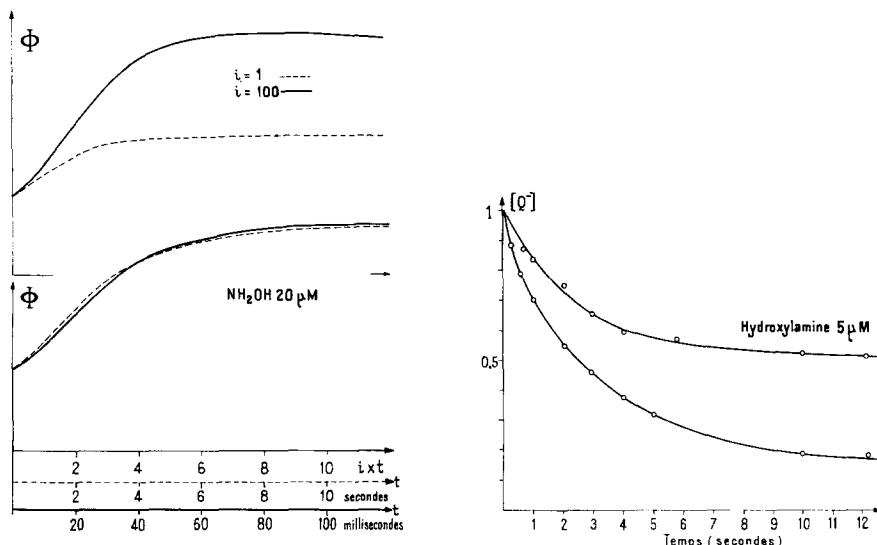
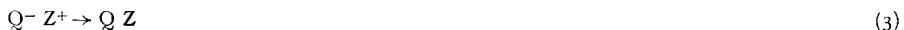


Fig. 2. Induction de fluorescence à deux intensités lumineuses ($i = 1$ et $i = 100$) chez Chlorella en présence de DCMU $20 \mu\text{M}$. Temp. 20° .

Fig. 3. Effet d'une concentration non saturante d'hydroxylamine sur la réoxydation de Q^- en présence de DCMU $20 \mu\text{M}$. Chloroplastes d'épinards, temp. 20° . La réduction complète de Q à la lumière est obtenue en 80 msec.

de DCMU par une concentration non saturante d'hydroxylamine ($5 \mu\text{M}$). On remarque les cinétiques obtenues en l'absence et en présence d'inhibiteur sont sensiblement homothétiques: l'hydroxylamine agit en bloquant la réoxydation d'une fraction des Q, la réoxydation de l'autre fration s'effectuant avec une vitesse inchangée.

La très grande sensibilité de cette réaction à l'hydroxylamine indique qu'en présence de DCMU la réoxydation de Q est de nature essentiellement interne et correspond à une recombinaison de charges:



L'hydroxylamine en réduisant l'oxydant primaire Z^+ empêche le retour de l'électron de Q^- vers Z^+ et interrompt ainsi la voie principale de réoxydation de Q^- subsistante en présence de DCMU. Il est remarquable que l'hydroxylamine à des concentrations inférieures à $50 \mu\text{M}$ réagisse avec la totalité des centres photochimiques: en effet, ces concentrations n'affectent pratiquement pas l'émission d'oxygène en régime stationnaire^{5,9}. Ceci n'est pas lié à la présence de DCMU. Une étude réalisée par B. Bouges sur l'émission d'oxygène consécutive à une série d'éclairs électroniques de très courte durée intervenant à la suite d'une longue période d'obscurité conduit aux résultats suivants: alors qu'en l'absence d'inhibiteur, on constate que l'oxygène n'apparaît en quantité importante qu'au troisième éclair, en présence d'hydroxylamine l'oxygène n'apparaît qu'au quatrième ou au cinquième éclair pour des concentrations d'inhibiteur d'environ $50 \mu\text{M}$ qui n'affectent pas la production d'oxygène par éclair en régime stationnaire (B. BOUGES, communication personnelle).

Il s'ensuit que l'affinité de l'hydroxylamine pour les centres photochimiques est très importante par rapport à celle de l'eau. A l'obscurité, quelques molécules d'hydroxylamine parviennent à proximité ou se fixent sur les centres photochimiques et réagissent avec ceux-ci au début de l'illumination. La photosynthèse stationnaire n'étant pas affectée, on doit penser qu'une fois ces molécules d'hydroxylamine consommées, la réapparition d'hydroxylamine au niveau des centres est très lente de sorte que l'eau réagit à nouveau avec ceux-ci. L'hydroxylamine agit ici de manière transitoire et réversible alors qu'aux très fortes concentrations ($>1 \text{ mM}$), l'hydroxylamine supprime la capacité d'émission d'oxygène de manière irréversible et remplace l'eau comme donneur d'électrons du Système II¹⁸.

La recombinaison de charges assurant la réoxydation de Q^- en présence de DCMU (Réaction 3) peut s'envisager de deux manières.

(1) Le retour de l'électron vers Z^+ s'accompagne de la formation d'un état excité de la chlorophylle et correspond à l'inverse de la réaction photochimique¹. Cette réaction est associée à une émission de luminescence.

(2) La réaction s'effectue par une voie différente, à priori sans émission de photons.

Ces deux voies ne sont pas mutuellement exclusives. Il était donc important de voir si le blocage de la réoxydation de Q est associé à une inhibition de la luminescence. C'est ce que montre la Fig. 4: la luminescence a été observée en présence de DCMU après un éclair électronique court ($<20 \mu\text{sec}$) d'intensité saturante. En présence de $50 \mu\text{M}$ d'hydroxylamine, l'intégrale de luminescence entre 20 msec et 6 sec est réduite à 2 % de sa valeur en présence de DCMU seul. L'inhibition de la composante intermédiaire de luminescence par l'hydroxylamine avait été démontrée par divers auteurs¹⁰⁻¹² pour des concentrations d'inhibiteur beaucoup plus importantes (1-10

mM). Dans le cas présent, la prééclairage est réalisée par un éclair court en présence de DCMU: une seule réaction photochimique peut alors être effectuée par centre du Système II. Dans les autres cas, les prééclairages sont réalisés par une lumière continue d'intensité relativement forte et en l'absence de DCMU: plusieurs réactions photochimiques par centre sont effectuées durant la prééclairage. La divergence observée quant aux concentrations efficaces tient donc au fait qu'aux faibles concentrations d'inhibiteur, l'hydroxylamine est consommée photochimiquement durant la prééclairage. L'inhibition simultanée de la réoxydation de Q^- et de l'émission de luminescence implique qu'en présence de DCMU, une partie au moins de la réoxydation de Q^- est associée à la formation d'un état excité de la chlorophylle et correspond à l'inverse de la réaction photochimique:

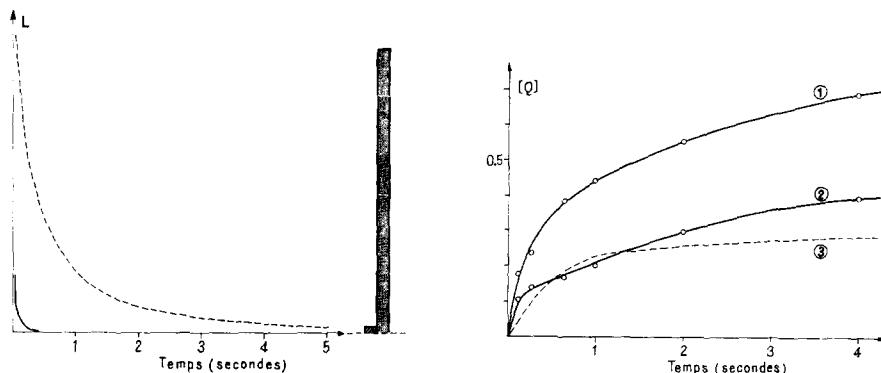
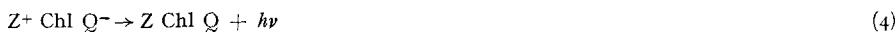


Fig. 4. Intensité de luminescence après un éclair électronique saturant en présence de DCMU $20 \mu\text{M}$. Sur la partie droite de la figure, on a représenté les valeurs des intégrales de luminescence entre 20 msec et 6 sec . Chlorella, temp. 20° .

Fig. 5. Réoxydation de Q^- après une prééclairage de 4.5 sec par le faisceau de mesure suivie d'un intervalle d'obscurité de durée variable. La prééclairage suffit à réduire la totalité du pool d'accepteur d'électrons A, c'est-à-dire à atteindre le rendement maximum de fluorescence. Courbe 1, pas d'inhibiteur; Courbe 2, hydroxylamine 4 mM ; Courbe 3, différence entre les ordonnées des Courbes 1 et 2. Chloroplastes d'épinards, temp. 20° .

On admet en effet que la luminescence et la fluorescence ont des spectres d'émission identiques correspondant au premier singulet excité de la chlorophylle¹²⁻¹⁴. L'importance relative de cette voie de réoxydation reste à déterminer. En présence de DCMU, la composante intermédiaire de l'émission de luminescence résulte de la désactivation du complexe $Z^+ \text{ Chl } Q^-$ formé à la lumière.

L'effet de blocage de la réoxydation de Q^- par l'hydroxylamine apparaît également en l'absence de DCMU. L'expérience présentée sur la Fig. 5 reproduit sur chloroplastes et en lumière d'intensité moyenne, une expérience décrite par DE LOSME³ sur Chlorella, en lumière de très forte intensité. Une prééclairage suffisante pour réduire la totalité du pool d'accepteur d'électrons A (terminologie de JOLIOT) est suivie de quelques secondes d'obscurité. On constate alors une réoxydation presque complète de Q alors que A reste essentiellement réduit. Ce résultat va à l'encontre de l'idée généralement admise d'un équilibre entre Q et A avec une constante d'équilibre de faible valeur^{8, 15}. Cette réoxydation rapide de Q^- est en partie sensible à l'hydroxyl-

amine: dans l'exemple présenté ici, la réoxydation de la moitié des Q^- est inhibée par l'hydroxylamine et doit donc s'effectuer par la voie interne. Les concentrations de Q ont été calculées à partir du rendement de fluorescence en admettant un paramètre " p " égal à 0.55 (réf. 2). On remarque d'une part que la réoxydation subsistant en présence d'hydroxylamine présente un caractère biphasique (réoxydation externe, Courbe 2), d'autre part que la réoxydation inhibée par l'hydroxylamine est sensiblement plus rapide qu'en présence de DCMU (réoxydation interne, Courbe 3 comparée à la Fig. 3).

Cette expérience est nécessairement réalisée en présence d'une forte concentration d'hydroxylamine (>1 mM). En effet, aux très faibles concentrations d'inhibiteur l'hydroxylamine serait consommée photochimiquement durant la prééclairage. Pour des concentrations intermédiaires, l'hydroxylamine agissant comme inhibiteur de la réaction de Hill¹⁹, la réduction complète du pool A serait impossible.

DISCUSSION

L'hydroxylamine peut réagir avec l'oxydant primaire Z^+ du Système II à des concentrations très faibles (quelques μM). Cette réaction est très rapide lorsque l'hydroxylamine est parvenue au voisinage des centres photochimiques. Ceci n'est réalisé qu'après un temps d'incubation de 10 min. De ce point de vue, l'hydroxylamine se distingue nettement du DCMU dont l'action est quasi instantanée. Ceci peut traduire le fait que ces deux composés ont des sites d'action distincts, l'un agissant sur le donneur primaire, l'autre sur l'accepteur primaire du Système II. On peut remarquer que l'oxydant primaire Z^+ doit nécessairement être efficacement protégé vis à vis des réducteurs présents dans le milieu: en effet, la formation d'oxygène met en jeu plusieurs états d'oxydation du donneur primaire Z^+ ayant une durée de vie importante^{16,7}. Par ailleurs, dans le cadre de l'hypothèse de Mitchell reprise par WITT *et al.*¹⁷, le donneur primaire Z serait situé à la surface interne de la membrane du thylakoïde alors que l'accepteur primaire Q serait situé à la surface externe de cette même membrane.

La réoxydation de Q^- en présence de DCMU est à l'origine de la luminescence observée dans ces conditions et traduit une recombinaison de charges entre Q^- et l'oxydant primaire Z^+ : l'espèce qui se désactive est le complexe Z^+Q^- . En présence d'hydroxylamine celui-ci est réduit à l'état ZQ^- , la vitesse de réaction de l'oxydant primaire Z^+ avec l'hydroxylamine étant très grande par rapport à sa vitesse de réaction avec Q^- . L'inhibition de la réoxydation de Q^- porte donc sur le substrat et non sur la constante de vitesse de la réaction.

On a vu que la cinétique de la réoxydation de Q en présence de DCMU apparaît comme une réaction d'ordre 2 par rapport à Q^- ou plus généralement comme une réaction bimoléculaire avec égalité de concentrations des substrats. Ceci est à première vue étonnant: on sait en effet que la réaction photochimique s'effectue au sein d'un milieu très structuré et dans la mesure où il existe des centres photochimiques isolés du type $Z \text{ Chl } Q$ où Z et Q font partie intégrante d'une même structure, on devrait observer une réaction d'ordre 1 par rapport à la concentration des centres. Le type de relations existant entre les divers centres photochimiques pourrait rendre compte d'un ordre différent de 1.

On peut supposer qu'il n'existe pas de relations exclusives entre un Q et un Z

donnés. Ceci revient à admettre une délocalisation des charges, soit au niveau des pigments associés aux centres photochimiques soit au niveau de l'accepteur primaire Q.

Une autre hypothèse consiste à admettre que le champ électrique créé par la séparation des charges Z^+Q^- de part et d'autre d'une membrane contrôle la vitesse de leur recombinaison. On représentera ainsi une dépendance d'ordre supérieur de la vitesse de recombinaison par rapport à la concentration de charges.

On peut enfin donner une représentation d'ordre cinétique: dans la mesure où l'essentiel des recombinaisons se réalise par la voie "Chlorophylle excitée", on doit prévoir un ralentissement progressif de la cinétique au cours de la réoxydation. En effet, plus celle-ci progresse, plus la probabilité pour un exciton de luminescence d'être piégé par un centre photochimique actif augmente auquel cas on recrée l'état initial Z^+Q^- . La connaissance du rendement absolu de luminescence permettrait d'affirmer ou d'infirmer cette hypothèse. Une connaissance plus approfondie de la cinétique de réoxydation de Q, en particulier dans un domaine de temps plus étendu, permettrait d'opérer un choix entre les différentes hypothèses proposées.

RÉSUMÉ

La réoxydation du quencher de fluorescence Q en présence de 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée présente les propriétés suivantes:

Elle est sensible à de très faibles concentrations d'hydroxylamine (quelques μM).

Elle résulte d'une recombinaison de charges entre Q^- et l'oxydant primaire Z^+ formé à la lumière. Cette recombinaison s'effectue, au moins en partie, avec émission de luminescence.

Dans le domaine étudié, la cinétique de réoxydation est d'ordre 2 par rapport à la concentration de Q^- .

BIBLIOGRAPHIE

- 1 L. N. M. DUYSENS ET H. E. SWEERS, dans *Microalgae and Photosynthetic Bacteria*, University of Tokyo Press, 1963, p. 353.
- 2 A. JOLIOT ET P. JOLIOT, *Compt. Rend.*, 258 (1964) 4622.
- 3 R. DELOSME, *Biochim. Biophys. Acta*, 143 (1967) 108.
- 4 J. LAVOREL, dans J. B. THOMAS AND J. C. GOEDHEER, *Currents in Photosynthesis*, Rotterdam, 1966, p. 39.
- 5 P. BENNOUN ET A. JOLIOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 189 (1969) 85.
- 6 M. AVRON, *Biochim. Biophys. Acta*, 40 (1960) 257.
- 7 G. BARBIERI, R. DELOSME ET P. JOLIOT, *Photochem. Photobiol.*, (1970), sous presse.
- 8 R. DELOSME, P. JOLIOT ET J. LAVOREL, *Compt. Rend.*, 249 (1959) 2736.
- 9 A. JOLIOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 126 (1966) 507.
- 10 W. E. ARTHUR ET B. L. STREHLER, *Arch. Biochem. Biophys.*, 70 (1957) 507.
- 11 W. F. BERTSCH, J. B. DAVIDSON ET J. R. AZZI, *Photosynthetic Mechanisms in Green Plants*, *Natl. Acad. Sci.-Natl. Res. Council Publ.*, (1963) 701.
- 12 J. LAVOREL, dans H. METZNER, *Progress in Photosynthesis Research*, Tübingen, 1969, p. 883.
- 13 W. A. ARNOLD ET J. B. DAVIDSON, *J. Gen. Physiol.*, 37 (1954) 677.
- 14 W. A. ARNOLD ET J. THOMPSON, *J. Gen. Physiol.*, 39 (1956) 311.
- 15 P. JOLIOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 102 (1965) 135.
- 16 P. JOLIOT, G. BARBIERI ET R. CHABAUD, *Photochem. Photobiol.*, 10 (1969) 309.
- 17 H. T. WITT, B. RUMBERG ET W. JUNGE, *Biochemie des Sauerstoffs*, Springer-Verlag, Berlin, 1968, p. 262.
- 18 G. M. CHENIAE ET J. F. MARTIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 197 (1970) 219.
- 19 S. IZAWA, R. L. HEATH ET G. HIND, *Biochim. Biophys. Acta*, 180 (1969) 388.