

BBA 46099

## ACTION DE FAIBLES CONCENTRATIONS D'HYDROXYLAMINE SUR L'EMISSION D'OXYGENE DES ALGUES CHLORELLA ET DES CHLOROPLASTES D'EPINARDS

BERNADETTE BOUGES

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

(Réçu le 26 octobre, 1970)

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

**SUMMARY**

*Action of low concentrations of hydroxylamine on oxygen evolved by Chlorella and spinach chloroplasts*

Oxygen evolution was studied on Chlorella and spinach chloroplasts after a dark period in the presence of low concentrations of hydroxylamine (about 50  $\mu\text{M}$ ). The following characteristics revealed themselves:

- (1) The activation phase slowed down.
- (2) During a series of flashes, maximum oxygen yield was delayed from the third flash to the fifth or sixth.

These features were still observed after hydroxylamine had been washed out in the dark. On the other hand, when elimination was followed by either a flash and a dark period (about 30 min), or two flashes, the effects of hydroxylamine were suppressed. An interpretation is proposed, using the model of KOK *et al.*<sup>12</sup>.

**INTRODUCTION**

VAKLINNOVA *et al.*<sup>1</sup> ont montré que l'hydroxylamine était oxydée à la lumière par des préparations de chloroplastes. Sur chlorelles, A. JOLIOT<sup>10</sup> observa par fluorescence la réduction de l'accepteur d'électrons Q du système II, sans qu'il y ait émission d'oxygène. Elle confirma ainsi que l'hydroxylamine agit comme donneur d'électrons du système II. Reprenant l'étude cinétique de l'action de cette substance sur des chloroplastes, BENNOUN ET A. JOLIOT<sup>2</sup> conclurent que :

- (1) sa photooxydation et la réaction d'émission d'oxygène ont les mêmes pigments sensibilisateurs et sont associées à la même chaîne de transfert d'électrons.
- (2) l'absorption d'un seul photon par centre photochimique est suffisante pour produire une molécule du dérivé oxydé de l'hydroxylamine.

Tous ces résultats concernent des concentrations d'hydroxylamine de l'ordre de 10 mM auxquelles l'émission d'oxygène est totalement inhibée.

De plus, BENNOUN<sup>9</sup> remarqua que l'hydroxylamine agit sur le système II à une concentration pour laquelle l'émission d'oxygène en lumière continue n'est pratiquement pas inhibée.

Afin de préciser les relations existant entre l'hydroxylamine, l'eau et le donneur primaire d'électrons de la réaction photochimique II, on a entrepris l'étude de l'effet de faibles concentrations d'hydroxylamine :

(1) sur la phase d'activation de l'émission d'oxygène et les quantités d'oxygène émises au cours d'une série d'éclairs électroniques.

(2) au cours d'expériences de restauration destinées à étudier la réversibilité des phénomènes.

#### MATERIEL ET METHODES

Les expériences décrites dans cet article ont été effectuées :

(1) soit sur des algues unicellulaires *Chlorella pyrenoidosa* cultivées sur milieu Knop en présence d'oligoéléments (solutions A5 et B6 Arnon). Pendant les expériences, les algues étaient mises en suspension dans un tampon phosphate 0.5 M (pH 6.4)-KCl 0.1 M.

(2) soit sur des chloroplastes extraits des feuilles d'épinards selon la méthode décrite par AVRON<sup>3</sup>. Pendant les expériences, les chloroplastes sont mis en suspension dans un tampon Tris-HCl 0.05 M (pH 7.5)-saccharose 0.4 M-KCl 0.1 M-sérumalbumine 9 g/l. Toutes les expériences décrites ont été faites à 20°.

Les mesures de vitesse d'émission d'oxygène par des algues ou par des chloroplastes ont été faites à l'aide de la méthode ampérométrique décrite par JOLIOT *et al.*<sup>4-6</sup>. La lumière du faisceau excitateur est modulée à une fréquence de 25 cycles/sec. Le temps de réponse est alors de 40 msec.

Le principe des mesures de la quantité d'oxygène émise par un éclair électronique a été exposé antérieurement<sup>5,6</sup>. Les éclairs électroniques sont émis par une lampe Verre et Quarts VQX OD 22 d'énergie 1,3 Joule. 90 % de l'énergie est émise en 5  $\mu$ sec.

BENNOUN ET A. JOLIOT<sup>2</sup> ont détecté par ampérométrie le dérivé oxydé de l'hydroxylamine. Pour des concentrations d'hydroxylamine allant de 0.1 mM à 1 mM sur chloroplastes, ils ont obtenu une superposition des signaux ampérométriques de l'oxygène et du dérivé oxydé de l'hydroxylamine.

Mais en présence d'une faible concentration d'hydroxylamine (50  $\mu$ M), la fraction du signal due au dérivé oxydé de l'hydroxylamine est négligeable, soit parce que la quantité d'hydroxylamine oxydée est trop faible devant la quantité d'oxygène formée, soit parce que la vitesse de diffusion du produit oxydé de l'hydroxylamine vers l'électrode de platine est trop lente (c'est le cas quand il doit traverser la membrane cellulaire des algues, ou quand il met plus de 0.10 sec à quitter le site où il a été formé.)

On a vérifié que le polarogramme du signal détecté dans ces conditions est bien celui de l'oxygène.

#### RÉSULTATS

##### *Vitesse d'émission d'Oxygène en lumière modulée*

Si après une période d'obscurité (de l'ordre de 3 min sur chlorelles, de 5 min sur chloroplastes), on éclaire les algues ou les chloroplastes avec une lumière de faible intensité, on observe une phase d'activation<sup>7</sup> au cours de laquelle la vitesse d'émission d'oxygène croît jusqu'à atteindre un niveau stationnaire.

*Etude des courbes d'activation en fonction de la concentration en NH<sub>2</sub>OH.* L'effet de l'hydroxylamine sur cette phase d'activation sur chloroplastes a été décrit par BENNOUN ET A. JOLIOT<sup>2</sup>.

Sur les algues Chlorella, on observe une légère stimulation de la vitesse stationnaire pour une concentration de l'ordre de 5  $\mu\text{M}$ , puis une inhibition qui devient totale pour une concentration de 1 mM (Fig. 1, courbe a).

Le demi-temps de la phase d'activation commence à croître fortement pour des concentrations de quelques  $\mu\text{M}$  et tend vers une valeur limite égale à peu près à quatre fois sa valeur en l'absence d'hydroxylamine. (Fig. 1, courbe b). Le ralentissement de la phase d'activation s'observe donc alors que la vitesse stationnaire n'est que peu modifiée.

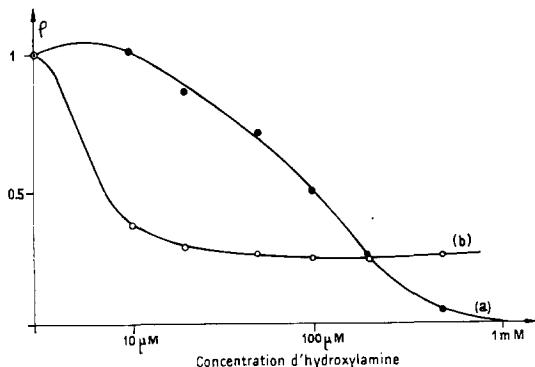


Fig. 1. A partir des courbes d'activation de la vitesse d'émission d'oxygène en lumière modulée, rapport des niveaux stationnaires (courbe a), et des inverses des  $t_{1/2}$  des phases d'activation (courbe b) avec et sans hydroxylamine, en fonction de la concentration d'hydroxylamine.

*Expériences de restauration (algues Chlorella).* Après avoir examiné l'effet de concentrations croissantes d'hydroxylamine, on peut faire décroître la concentration d'hydroxylamine pour étudier la réversibilité des phénomènes observés. L'hydroxylamine peut être éliminée par dialyse, la cuve contenant les algues étant séparée par une membrane semi-premable d'un compartiment où s'écoule le tampon.

Les algues ont été mises en présence d'hydroxylamine 0.1 mM pendant 20 min. Ensuite, celle-ci a été éliminée par lavage avec tampon phosphate KCl pur.

Les caractéristiques des cinétiques d'activation obtenues au cours de ce lavage sont indiquées sur le Tableau I. La vitesse stationnaire reste inhibée; par contre, le demi-temps décroît et revient à la valeur qu'il avait en l'absence d'hydroxylamine.

TABLEAU I

CARACTÉRISTIQUES DES CINÉTIQUES D'ACTIVATION

Temps de lavage (min)	$v/v_{max}$ (Unités relatives)	$t_{1/2}$ (sec)
Témoin sans hydroxylamine	5.5	0.60
0	2.8	1.50
120	2.5	0.64

### Quantités d'Oxygène émises par une série d'éclairs

Après une période d'obscurité (de l'ordre de 5 min), on illumine des algues ou des chloroplastes par une série d'éclairs électroniques de courte durée, séparés par un intervalle de temps inférieur à la seconde. En l'absence d'hydroxylamine, la quantité d'oxygène émise sous l'effet des deux premiers éclairs est nulle. Elle est maximale après le 3<sup>e</sup> éclair<sup>6,8</sup> (Fig. 2, courbe 1 et Fig. 3, courbe 1).

Dans la suite de l'exposé, on appellera  $y_n$  la quantité d'oxygène émise après le  $n^{\text{ème}}$  éclair électronique de la série.

*Etude en fonction de la concentration de  $\text{NH}_2\text{OH}$ .* Pour des concentrations supérieures à  $50 \mu\text{M}$ ,  $y_1$ ,  $y_2$ ,  $y_3$  et  $y_4$  tendent vers zéro. Le maximum est retardé (Figs. 2 et 3).

*Expériences de restauration (algues Chlorella ou chloroplastes).* On laisse agir de l'hydroxylamine  $50 \mu\text{M}$  pendant 10 min. La première série d'éclairs électroniques, déclenchée après 50 min de lavage à l'obscurité, produit une suite  $y_n$  identique à celle que l'on observait avant d'éliminer l'hydroxylamine. On n'a supprimé aucun effet de l'hydroxylamine par un simple lavage. Par contre, la deuxième série, déclenchée 5 min après la première, conduit à une suite identique en forme à celle obtenue en l'absence

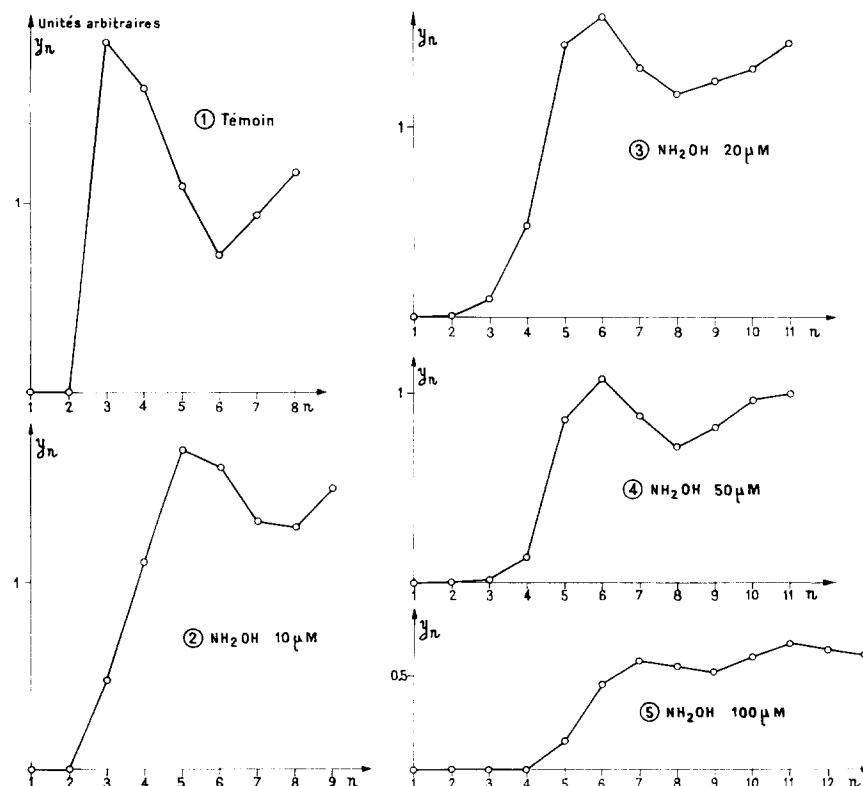


Fig. 2. Quantités d'oxygène émises par des algues Chlorella illuminées par une série d'éclairs électroniques d'intensité saturante. Intervalle d'obscurité entre deux éclairs: 300 msec.  $n$  est le rang de l'éclair,  $y_n$  la quantité d'oxygène émise sous l'effet de cet éclair. Les échantillons sont placés sur l'électrode pendant 20 min d'obscurité à la concentration de  $\text{NH}_2\text{OH}$  indiquée avant le début de la série.

d'hydroxylamine. L'action de la lumière a été nécessaire pour supprimer le retard provoqué par l'hydroxylamine (Fig. 4, courbes 3 et 4).

Si après 50 min de lavage à l'obscurité, on déclenche un éclair électronique et qu'on attend encore 30 min à l'obscurité, la série d'éclairs électroniques produit une suite  $y_n$  voisine de celle que l'on observait en l'absence d'hydroxylamine. Un seul éclair suivi d'une période d'obscurité ont donc suffi pour supprimer le retard de 2 éclairs introduits par l'hydroxylamine (Fig. 4, courbe 5).

*Etude après une préillumination par 1 ou 2 éclairs électroniques (Chlorelles).* Les algues sont d'abord prééclairées par 1 ou 2 éclairs saturants, puis après un intervalle de temps variable, soumises à une illumination par une série d'éclairs produisant une suite  $y_n$ .

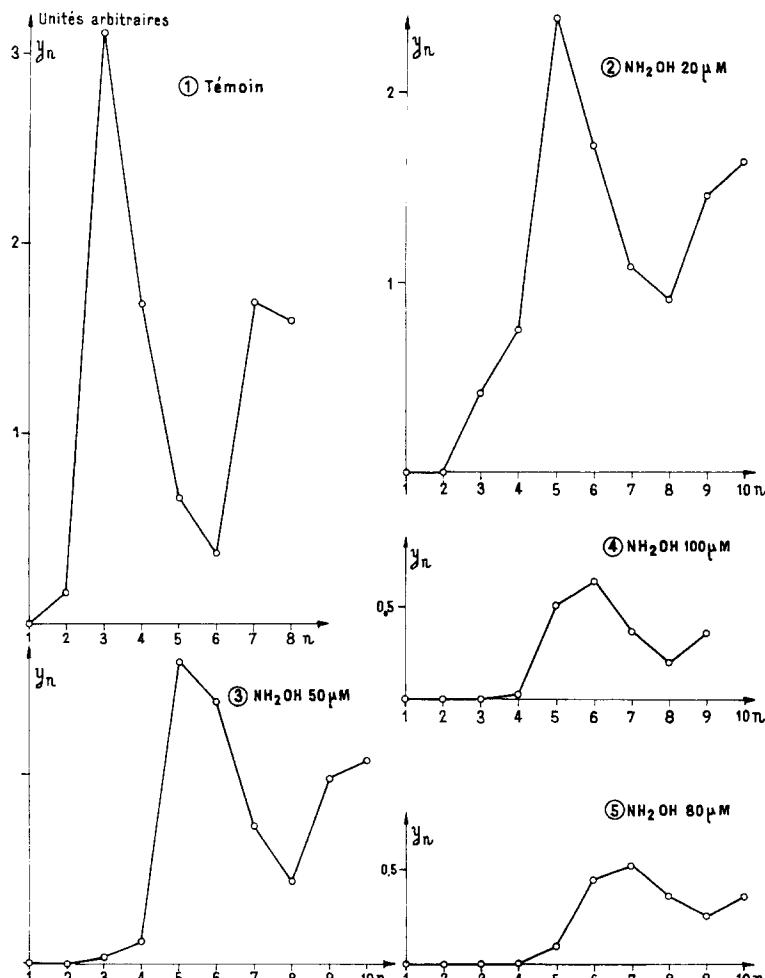


Fig. 3. Quantités d'oxygène émises par des chloroplastes d'épinards illuminés par une série d'éclairs électriques d'intensité saturante. Intervalle d'obscurité entre deux éclairs: 300 msec. Les échantillons sont placés sur l'électrode pendant 10 min d'obscurité à la concentration de  $\text{NH}_2\text{OH}$ , indiquée sauf pour la courbe 5 où l'échantillon avait été laissé 1 h.

Pour des temps courts séparant la prééclairage du début de la série d'éclairs,  $y_4$  après une prééclairage par 1 éclair et  $y_3$  après deux éclairs sont égales à la quantité  $y_5$  que l'on aurait obtenue sans prééclairage. En présence d'hydroxylamine de  $50 \mu\text{M}$ ,  $y_4$  après 1 éclair et  $y_3$  après 2 éclairs représentent donc respectivement les premiers termes non nuls de la suite  $y_n$ . On a alors étudié leur évolution en fonction du temps séparant la prééclairage du début de la série.

En présence d'hydroxylamine  $50 \mu\text{M}$ ,  $y_4$  après un éclair de prééclairage et  $y_3$  après deux éclairs décroissent exponentiellement avec des constantes de temps de l'ordre de 100 sec (Fig. 5, courbes a et b).

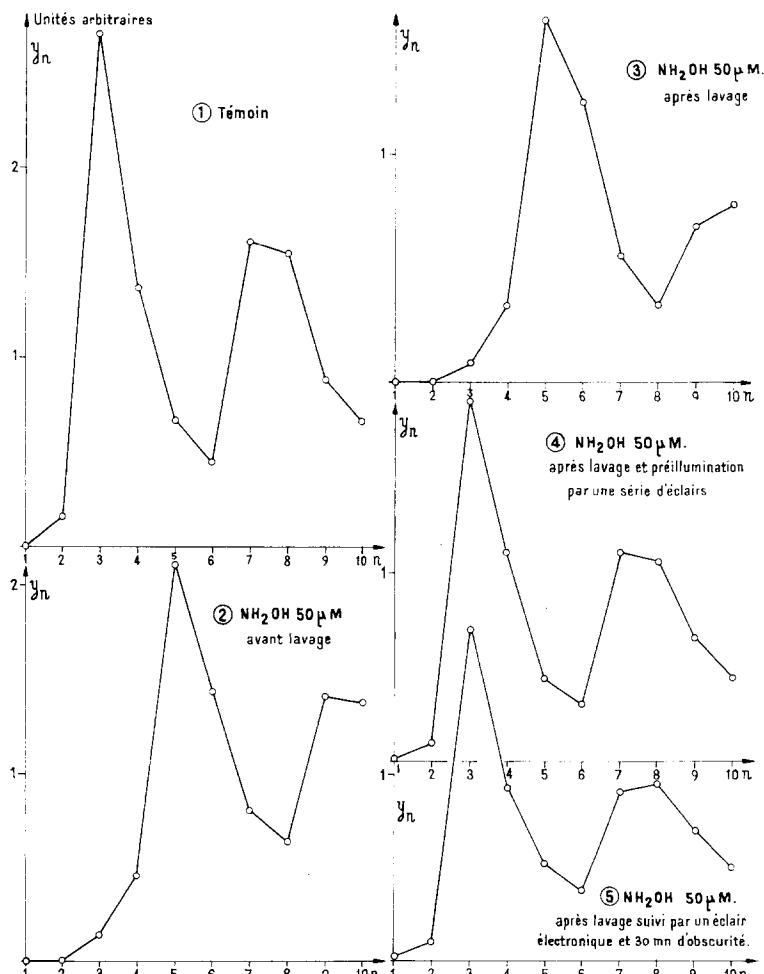


Fig. 4. Quantités d'oxygène émises par des chloroplastes d'épinards illuminés par une série d'éclairs électriques d'intensité saturante. Intervalle d'obscurité entre deux éclairs: 300 msec. 1, Témoin; 2,  $\text{NH}_2\text{OH } 50 \mu\text{M}$  pendant 10 min; 3,  $\text{NH}_2\text{OH } 50 \mu\text{M}$  pendant 10 min, tampon sans  $\text{NH}_2\text{OH}$  pendant 40 min; 4, 5 min d'obscurité après 3; 5,  $\text{NH}_2\text{OH } 50 \mu\text{M}$  pendant 10 min, tampon sans  $\text{NH}_2\text{OH}$  pendant 40 min, 1 éclair, 30 min d'obscurité.

## DISCUSSION

L'hydroxylamine a pour effet d'une part d'augmenter la durée de la phase d'activation, d'autre part d'inhiber la vitesse stationnaire d'émission d'oxygène.

La durée de la phase d'activation atteint sa valeur maximale pour une concentration de  $50 \mu\text{M}$ . Comme l'ont montré les expériences de lavage, cette inhibition est réversible à la lumière.

L'inhibition de la vitesse stationnaire est totale pour une concentration de 1 mM. Elle est irréversible.

L'inhibition de la vitesse stationnaire peut être provoquée par beaucoup d'autres substances, (en particulier d'autres amines)<sup>13</sup>; d'autre part, plusieurs réducteurs sont photooxydés par le système II, (phénylenediamine, ascorbate etc.). Au contraire, l'allongement de la phase d'activation apparaît comme un effet spécifique des faibles concentrations d'hydroxylamine: nous n'avons pu l'observer avec aucune autre substance et en particulier avec aucun des dérivés de l'hydroxylamine ( $\text{CH}_3\text{-NH-OH}$  par exemple).

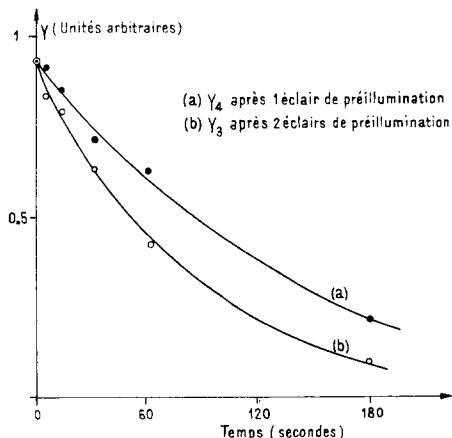
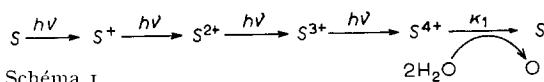


Fig. 5. Quantités  $y_4$  et  $y_3$  d'oxygène émises par des algues Chlorella au cours d'une série d'éclairs électriques d'intensité saturante, après une prééclairage respectivement par 1 et 2 éclairs électriques en fonction du temps d'obscurité séparant la prééclairage du début de la série d'éclairs;  $\text{NH}_2\text{OH}$  50  $\mu\text{M}$ . Les algues ont été illuminées par une série d'éclairs électriques, puis maintenues 6 min à l'obscurité avant la prééclairage.

En première approximation, les suites  $y_n$  émises par une série d'éclairs électriques en présence d'hydroxylamine ressemblent par leur périodicité et leur forme aux suites obtenues en l'absence d'hydroxylamine, mais avec un retard de deux éclairs. Ce retard de 2 éclairs traduit le même phénomène que l'allongement de la phase d'activation.

Pour expliquer la périodicité des suites en l'absence d'hydroxylamine, KOK *et al.*<sup>12</sup> supposent que l'accumulation sur un même centre de l'énergie fournie par 4 photons est nécessaire pour produire une molécule d'oxygène à partir de deux molécules d'eau. Ils ont proposé le cycle de réactions du Schéma 1 :



### Schéma I.

Une réaction thermique que JOLIOT *et al.*<sup>8</sup> supposent être la réoxydation de  $Q^-$ , empêche que plus d'une réaction photochimique par centre puisse avoir lieu pendant un éclair de 5  $\mu$ sec KOK *et al.*<sup>12</sup> admettent que S et  $S^+$  sont deux états stables à l'obscurité. Après une période d'obscurité, les centres sont en majeure partie à l'état  $S^+$  (bibl. 11). Ceci explique que  $y_1$  et  $y_2$  soient nulles et  $y_3$  maximum.

En présence d'hydroxylamine, le retard supplémentaire de deux éclairs semble indiquer que les deux premières réactions photochimiques après une période d'obscurité, ne contribuent pas à la production d'oxygène, et qu'ensuite le cycle de réactions décrit par KOK *et al.*<sup>12</sup> se déroule normalement. Ce retard ne pouvant être supprimé par un lavage prolongé (50 min ou plus). Il faut admettre qu'à l'obscurité, l'hydroxylamine se fixe de façon irréversible sur le centre photochimique.

#### *Nombre de molécules d'hydroxylamine fixées par centre*

Sachant qu'après une période d'obscurité, la majorité des centres sont dans l'état  $S^+$ , et que l'hydroxylamine est un réducteur, deux enchainements de réactions permettent d'interpréter le retard de 2 éclairs.

(1) L'hydroxylamine ne peut pas réduire  $S^+$ . Dans ce cas, il faut admettre que sur chaque centre photochimique deux molécules d'hydroxylamine sont fixées et que les deux premières réactions photochimiques conduisent à l'oxydation de ces deux molécules. Les réactions suivantes se déroulent comme s'il n'y avait pas d'hydroxylamine dans le milieu (Schéma 1) car le temps de fixation de l'hydroxylamine est grand devant le temps séparant l'arrivée de deux photons sur un centre.

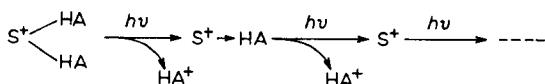


Schéma 2. HA, hydroxylamine.

(2) L'hydroxylamine peut réduire  $S^+$  en S. Dans cette hypothèse, il n'y a qu'une molécule d'hydroxylamine fixée et la première réaction photochimique conduit à son oxydation. La seconde réaction photochimique permet l'oxydation de S en  $S^+$ . Les réactions suivantes mènent normalement au dégagement d'oxygène.

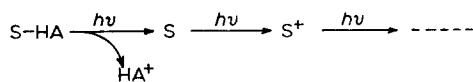


Schéma 3. HA, hydroxylamine.

Après un lavage, un seul éclair électronique et une période d'obscurité suffisent à supprimer le retard introduit par l'hydroxylamine. Ceci est inexplicable si on suppose qu'il y a deux molécules d'hydroxylamine fixées par centre.

On doit supposer :

- (a) la réduction de  $S^+$  en S par l'hydroxylamine.
- (b) la fixation d'une molécule d'hydroxylamine par centre à l'obscurité.
- (c) l'existence en l'absence d'hydroxylamine d'un équilibre lent entre S et  $S^+$  déplacé en faveur de  $S^+$ .

L'éclair conduit à l'oxydation de la molécule d'hydroxylamine fixée. L'équilibre entre S et S<sup>+</sup> permet le passage lent à l'obscurité de l'état S à l'état S<sup>+</sup> donc la suppression du retard.

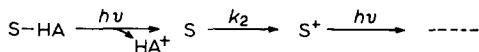


Schéma 4. Voir Schéma 1. HA, hydroxylamine.

L'existence d'un équilibre lent entre S et S<sup>+</sup> a déjà été mise en évidence par une expérience antérieure: au bout d'une demi-heure d'obscurité, le rapport du nombre de centres à l'état S<sup>+</sup> et du nombre de centres à l'état S devient indépendant des concentrations initiales des centres (*cf.* JOLIOT *et al.*<sup>11</sup>). Cet équilibre amène la majorité des centres à l'état S<sup>+</sup>. L'expérience précédente semble bien confirmer l'existence de cet équilibre. La fixation d'une molécule d'hydroxylamine empêcherait l'équilibre de s'établir.

#### Temps de fixation de l'hydroxylamine

Nous savons qu'en première approximation,  $y_4$  est proportionnel au nombre de centres à l'état S au début de la série d'éclairs électroniques (*cf.* Schéma 1).

En présence d'hydroxylamine 50  $\mu\text{M}$ , après un éclair de prééclairage, tous les centres sont à l'état S (*cf.* Schéma 3). La décroissance de  $y_4$  en fonction du temps séparant le début de la série d'éclairs, de la prééclairage, traduit donc la fixation de la molécule d'hydroxylamine: la constante de temps de cette réaction est de l'ordre de 100 sec.

#### CONCLUSION

Se basant sur le modèle proposé par KOK *et al.*<sup>12</sup>, cette étude nous conduit à postuler qu'à une concentration de 50  $\mu\text{M}$ :

(1) un centre photochimique peut fixer une et une seule molécule d'hydroxylamine.

(2) L'hydroxylamine réduit les centres de l'état S<sup>+</sup> à l'état S.

L'existence d'un équilibre lent entre S et S<sup>+</sup> déplacé en faveur de S<sup>+</sup> est confirmé.

La très grande spécificité de cette action de l'hydroxylamine permet de supposer que l'hydroxylamine agit sur le site même de l'eau.

#### RÉSUMÉ

Sur algues Chlorella et sur chloroplastes d'épinards, après une période d'obscurité, l'émission d'oxygène en présence de faibles concentrations d'hydroxylamine (de l'ordre de 50  $\mu\text{M}$ ) présente les caractéristiques suivantes:

(1) la phase d'activation est ralentie,

(2) au cours d'une série d'éclairs électroniques, l'émission maximale d'oxygène est retardée du 3ème éclair au 5ème éclair ou plus.

Ces caractéristiques subsistent après élimination de l'hydroxylamine à l'obscurité. Par contre, si le lavage est suivi, soit d'un éclair électronique et d'une période d'obscurité (de l'ordre de 30 min), soit de 2 éclairs électroniques, le retard est supprimé. Une interprétation est proposée dans le cadre du modèle de KOK *et al.*<sup>12</sup>.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 S. VALKINOVA, E. NIKOLOVA, TSENOVA ET S. ANCHELOVA, *Compt. Rend. Acad. Bulgare Sci.*, (1966) 1191.
- 2 P. BENNOUN ET A. JOLIOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 189 (1969) 85.
- 3 M. AVRON, *Biochim. Biophys. Acta*, 40 (1960) 257.
- 4 P. JOLIOT, M. HOFNUNG ET R. CHABAUD, *J. Chim. Phys.*, 10 (1966) 1423.
- 5 P. JOLIOT ET A. JOLIOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 153 (1968) 625.
- 6 P. JOLIOT, G. BARBIERI ET R. CHABAUD, *Photochem. Photobiol.*, 10 (1969) 309.
- 7 P. JOLIOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 102 (1965) 116.
- 8 P. JOLIOT, *Photochem. Photobiol.*, 8 (1968) 451.
- 9 P. BENNOUN, *Biochim. Biophys. Acta*, 216 (1970) 357.
- 10 A. JOLIOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 126 (1966) 587.
- 11 P. JOLIOT, A. JOLIOT, B. BOUGES ET G. BARBIERI, *Photochem. Photobiol.* (1970), sous presse.
- 12 B. KOK, B. FORBUSH ET N. MCGLOIN, *Photochem. Photobiol.*, 11 (1970) 457.
- 13 S. IZAWA, R. L. HEATH ET G. HIND, *Biochim. Biophys. Acta*, 180 (1969) 388.

*Biochim. Biophys. Acta*, 234 (1971) 103-112