

BBA 46118

RELATIONS ENTRE L'ASSIMILATION PHOTOSYNTHÉTIQUE DE CO_2 ET LA PHOTOPHOSPHORYLATION DES CHLOROPLASTES ISOLÉSI. STIMULATION DE LA FIXATION DE CO_2 PAR L'ANTIMYCINE A, ANTAGONISTE DE SON INHIBITION PAR LE PHOSPHATE

M. L. CHAMPIGNY ET M. MIGINIAC-MASLOW

Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale, Associé au C.N.R.S., Faculté des Sciences d'Orsay, 91-Orsay (France)

(Reçu le 23 decembre, 1970)

SUMMARY

Relations between photosynthetic assimilation of CO_2 and photophosphorylation of isolated chloroplasts. I. Stimulation of CO_2 fixation by antimycin A, antagonist of its inhibition by phosphate.

CO_2 fixation by whole spinach chloroplasts has been studied in the presence of the substrates of photophosphorylation and the effect of antimycin A on the rate of carboxylation has been investigated.

1. In the presence of bicarbonate, the rate of P_i fixation depends upon the rate of carboxylation.

2. CO_2 fixation seems to be antagonistic to photophosphorylation. Indeed, it is impaired in the presence of ADP and P_i at concentrations which are suitable to a high rate of ATP synthesis.

3. Of the two substrates, P_i bears the responsibility for the inhibitory effect. The inhibition is overcome by antimycin A.

4. It is shown that P_i inhibits the ribulose 1,5-diphosphate carboxylase activity and that the inhibition is competitive with respect to bicarbonate. It seems likely that P_i may depress CO_2 fixation by inhibiting the carboxylation reaction. It is suggested that antimycin A could overcome the inhibitory effect of P_i by enhancing the efficiency of chloroplasts for using bicarbonate.

5. It is suggested that the mechanism of enhancing the level of CO_2 or HCO_3^- into the chloroplasts may be related to the utilization of a high energy intermediate.

INTRODUCTION

On sait que l'activité de fixation de CO_2 , réalisée en présence de bicarbonate, par les chloroplastes d'épinard, isolés entiers, est très stimulée par l'antimycine A $1 \mu\text{M}^1,2$. Cette stimulation apparaît aussi bien, que les mesures soient faites par

Abréviations: Ribul-1,5- P_2 , ribulose 1,5-diphosphate; Rib-5- P , ribose 5-phosphate.

l'incorporation directe de $^{14}\text{CO}_2$, ou bien par l'incorporation de $^{32}\text{P}_i$ et par le dégagement d' O_2 en présence de bicarbonate³.

Cependant, la photophosphorylation mesurée en présence d'ADP et NADP exogènes, sans addition de bicarbonate, n'est pas modifiée ou est inhibée par cette faible concentration d'antimycine qui n'a par ailleurs aucun effet sur la réaction de Hill. L'inhibition par l'antimycine n'est peut-être pas spécifique de la photophosphorylation cyclique⁴. Pour ce qui est de l'incorporation de ^{32}P , il apparaît donc que la réponse à l'antimycine est différente selon qu'elle est liée à la synthèse des glucides phosphorylés résultant de la fixation de CO_2 ou à une synthèse et une accumulation d'ATP à partir de ses substrats exogènes.

Cette dualité d'action de l'antimycine sur la fixation de ^{32}P , fait se demander dans quelle mesure l'ATP synthétisé à partir de ses substrats exogènes peut participer à l'activité de fixation de CO_2 .

Quelle peut être l'action de l'antimycine en présence à la fois de HCO_3^- , d'ADP et de P_i ? De quels mécanismes est-elle la résultante? Comme l'addition d'ascorbate et de pyrophosphate^{5,6} masque partiellement l'effet stimulateur de l'antimycine, ces corps ne sont pas ajoutés. Il en résulte que les fixations de CO_2 sont plus faibles qu'en leur présence, mais les conditions d'étude de l'action de l'antimycine sont beaucoup plus favorables.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Des feuilles d'épinard sont prélevées sur des plantes cultivées en aquiculture dans une chambre de culture (photopériode: 12 h de lumière (23°) et 12 h d'obscurité (18°), éclairage: 15 000 lux). La composition du milieu de culture a été décrite par CHAMPIGNY⁷.

Isolement des chloroplastes. Les chloroplastes sont préparés par une méthode adaptée de celle de JENSEN et BASSHAM⁵, avec quelques modifications des solutions. La solution de base contient: sorbitol 330 mM, NaNO_3 2 mM, EDTA (sel disodique) 2 mM, MnCl_2 1 mM, MgCl_2 1 mM, K_2HPO_4 0.15 mM. Additionnée de NaCl 20 mM et pyrophosphate de sodium 10 mM, pH 7.6, elle constitue la solution tamponnée pour le broyage. Additionnée de tricine 50 mM, pH 8.1, elle constitue la solution tamponnée dans laquelle est mis en suspension le culot de chloroplastes obtenu après centrifugation du broyat et dans lequel sont étudiées les réactions. Les chlorophylles sont dosées selon BRUINSMA⁸.

Isolement de la Fraction I. La Fraction I, constituée par la ribulose-diphosphate carboxylase⁹ (EC 4.1.1.39) est préparée à partir des feuilles d'épinard par la méthode de WILSON et MACCALLA¹⁰, qui comprend une purification sur Sépharose 4B, puis sur Séphadex G-200. La protéine, conservée sous forme de précipité dans le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ est mise en suspension dans le tampon de BJÖRKMAN¹¹ (Tris-HCl 0.04 M, pH 7.9; MgCl_2 0.01 M, EDTA (sel disodique) 0.25 mM, glutathion réduit 5 mM), juste avant l'étude enzymatique. Les protéines sont dosées par la méthode de LOWRY *et al.*¹².

Mesure de la fixation de CO_2 par les chloroplastes isolés. Les chloroplastes sont mis en présence de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ 10 mM (radioactivité spécifique: 2 mC/mmmole). De l'azote barbotant dans la suspension maintient des conditions anaérobies. L'éclairement de 10^5 ergs·cm⁻²·sec⁻¹, en lumière blanche, est saturant. La fixation de ^{14}C par les chloroplastes est suivie en cinétique pendant 20 min selon la méthode décrite précédemment³.

Mesure de la vitesse de carboxylation du Ribul-1,5-P₂ par la Fraction I. Elle est mesurée par addition du Ribul-1,5-P₂ et du NaH¹⁴CO₃ (radioactivité spécifique: 4 mC/mmole) à la solution enzymatique. La quantité de ¹⁴C fixé pendant 10 min est déterminée. Il est vérifié que la cinétique de carboxylation est linéaire pendant cette durée.

Détermination des constantes cinétiques. La vitesse maximum v_{\max} , la constante K_m sont déterminées graphiquement. La droite de régression de la représentation d'Eadie correspondant à l'équation de vitesse:

$$v = v_{\max} - v/[S] K_m$$

est tracée par la méthode des moindres carrés.

RÉSULTATS

La photophosphorylation, antagoniste de la fixation de CO₂

Le Tableau I précise que les fixations simultanées de ¹⁴CO₂ et de ³²P par les chloroplastes subissent les mêmes stimulations par l'antimycine.

TABLEAU I

INFLUENCE DE L'ANTIMYCINE A 1 μ M SUR LA FIXATION DE ¹⁴CO₂ ET L'INCORPORATION DE ³²P QUI L'ACCOMPAGNE, DANS LES CHLOROPLASTES ISOLÉS

NaHCO₃ = 10 mM; chlorophylle = 48 μ g/ml.

Exp.	¹⁴ CO ₂ fixé		³² P incorporé	
	Témoin (μ moles/mg chl par h)	+ Antimycine A (% du témoin)	Témoin (μ moles/mg chl par h)	+ Antimycine A (% du témoin)
1	1.7	182	0.46	159
2	8.0	238	1.05	200
3	4.4	225	0.74	200
4	3.9	234	0.89	236

La fixation de CO₂ est inhibée en présence d'ADP 2 mM + P_i 2 mM, substrats de la photophosphorylation (dans la suite du texte, le terme "photophosphorylation" est utilisé pour désigner l'incorporation de P_i en présence d'ADP exogène). La photophosphorylation et la fixation de CO₂ sont nettement antagonistes (Fig. 1).

L'antimycine lève l'inhibition de la fixation de CO₂

Fait surprenant, l'antimycine lève l'inhibition de la fixation de CO₂ par ADP + P_i (Fig. 2).

A partir de cette observation, il apparaît qu'une étude précise des modalités de l'inhibition de la fixation de CO₂ par ADP + P_i soit une voie d'approche intéressante pour la compréhension du mécanisme d'action de l'antimycine sur la fixation de CO₂.

L'inhibition est-elle un effet spécifique dû à l'un de ces deux substrats ou à l'ATP, produit de la photophosphorylation. S'agit-il d'une compétition entre la fixation de CO₂ et la photophosphorylation de l'ADP.

P_i, inhibiteur de la fixation de CO₂ par les chloroplastes

L'addition séparée des deux substrats permet de mettre en évidence que l'inhibition est due seulement à P_i (Fig. 3). L'ADP seul ne modifie pas la quantité de ¹⁴CO₂

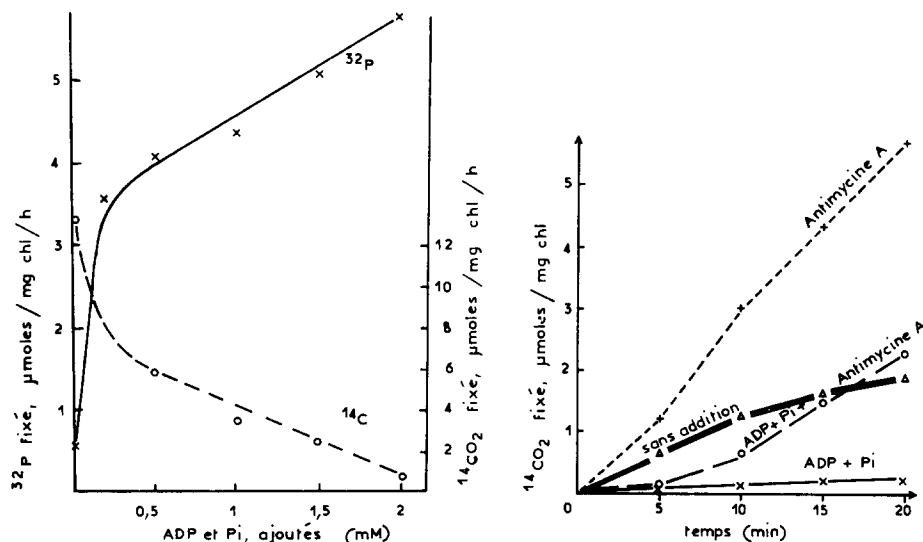


Fig. 1. Influence des concentrations d'ADP et de P_i sur les vitesses de fixation de ¹⁴CO₂ et d'incorporation de ³²P, par les chloroplastes isolés. NaHCO₃ = 10 mM; chlorophylle = 57 μg/ml.

Fig. 2. Effet de l'antimycine A et de l'addition d'ADP 2 mM + P_i 2 mM sur la cinétique de fixation de ¹⁴CO₂ par les chloroplastes isolés. NaHCO₃ = 10 mM; chlorophylle = 45 μg/ml; antimycine A = 1 μM.

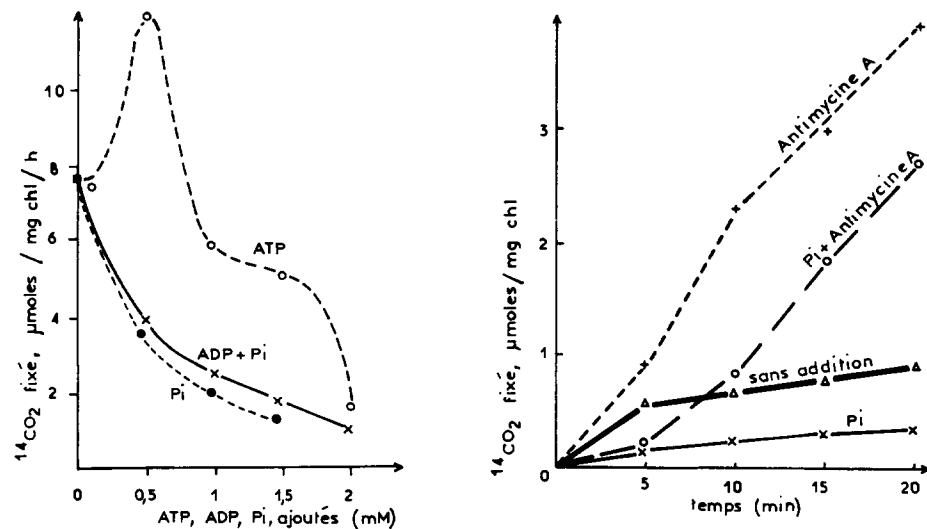


Fig. 3. Influence de la concentration de P_i ou d'ADP et P_i ou d'ATP sur la vitesse de fixation de ¹⁴CO₂ par les chloroplastes isolés. NaHCO₃ = 10 mM; chlorophylle = 38 μg/ml.

Fig. 4. Effet de l'antimycine A sur l'inhibition par P_i de la vitesse de fixation de ¹⁴CO₂ par les chloroplastes isolés. NaHCO₃ = 10 mM; chlorophylle = 55 μg/ml.

fixé par les chloroplastes pendant les vingt minutes de mesure. Il n'est pas non plus inhibiteur.

L'inhibition par P_i est levée par l'antimycine A 1 μ M (Fig. 4), comme l'est l'inhibition par ADP + P_i.

L'inhibition par P_i est proportionnelle à sa concentration, que l'ADP soit présent ou non. Par contre, la courbe d'action des différentes concentrations d'ATP sur la vitesse de fixation de CO₂ par les chloroplastes est extrêmement différente (Fig. 3). En faible concentration, l'ATP stimule la fixation de CO₂ comme VOSE ET SPENCER¹³ l'ont déjà signalé. Ce n'est qu'aux concentrations supérieures à 1 mM qu'il l'inhibe, peut-être par une action spécifique sur la Ribul-1,5-P₂ carboxylase, telle qu'elle a été décrite par CHAMPIGNY ET BISMUTH¹⁴.

Les mesures simultanées de la fixation de ¹⁴C et de ³²P par les chloroplastes montrent que l'inhibition de la fixation de CO₂ par P_i est la même, que l'incorporation de P_i soit limitée aux substrats endogènes ou stimulée par l'addition d'ADP (Tableau II). P_i a donc un rôle très spécifique.

TABLEAU II

INFLUENCE DE L'ADDITION D'ADP 2 mM ET P_i 2 mM SUR LES VITESSES DE FIXATION DE ¹⁴CO₂ ET D'INCORPORATION DE ³²P

NaHCO₃ = 10 mM; chlorophylle = 52 μ g/ml.

Addition	¹⁴ CO ₂ fixé (% du témoin)	³² P incorporé (% du témoin)
—	100	100
P _i 2 mM	23.5	31.4
P _i 2 mM + ADP 2 mM	32.3	226

P_i, inhibiteur de la Ribul-1,5-P₂ carboxylase

Une inhibition par P_i de la Ribul-1,5-P₂ carboxylase d'épinard a été signalée par TROWN⁹ et par PAULSEN ET LANE¹⁵. L'analyse du mode d'action de P_i a donc été orientée vers l'étude de la réaction de carboxylation elle-même.

L'étude de cinétique enzymatique de l'activité de la Fraction I isolée de feuilles d'épinard, en fonction des concentrations des substrats Ribul-1,5-P₂ et HCO₃⁻, montre que P_i est un inhibiteur de la Ribul-1,5-P₂ carboxylase, compétitif du bicarbonate (Fig. 5a) et non compétitif du Ribul-1,5-P₂ (Fig. 5b). Ces observations sont en accord avec celle de TROWN⁹.

Il a été vérifié que P_i n'affecte pas l'activité Rib-5-P isomérase et kinase dont peut dépendre l'approvisionnement en Ribul-1,5-P₂ des chloroplastes carboxylant.

L'antimycine est sans effet sur l'activité Ribul-1,5-P₂ carboxylase de la Fraction I et ne lève pas son inhibition par P_i. Elle n'affecte pas non plus l'activité Rib-5-P isomérase et kinase.

L'antimycine augmente l'affinité des chloroplastes pour HCO₃⁻

On peut considérer les chloroplastes comme un système enzymatique global et déterminer des constantes cinétiques et les caractères des inhibitions par des méthodes de cinétique enzymatique.

Une telle étude montre que l'inhibition par P_i de la vitesse de fixation de CO_2 par les chloroplastes est du type mixte, donc partiellement compétitive de HCO_3^- (Fig. 6).

En présence d'antimycine, la constante de Michaelis apparente pour le bicarbonate de la réaction de carboxylation diminue, donc l'affinité apparente des chloroplastes pour HCO_3^- augmente (Fig. 7).

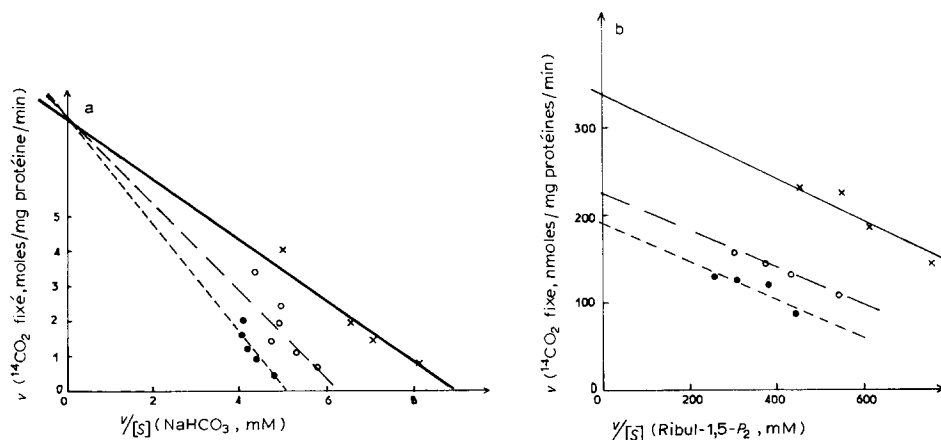


Fig. 5. Etude de cinétique de l'inhibition par P_i de la vitesse de carboxylation de Ribul-1,5- P_2 par la Fraction I. Protéine = 320 $\mu g/ml$. a. Ribul-1,5- P_2 , 2 mM; $NaHCO_3$, 0.1 à 0.8 mM. b. Ribul-1,5- P_2 , 0.2 à 0.5 mM; $NaHCO_3$, 20 mM. —, P_i = 0; ---, P_i = 10 mM; ·····, P_i = 20 mM.

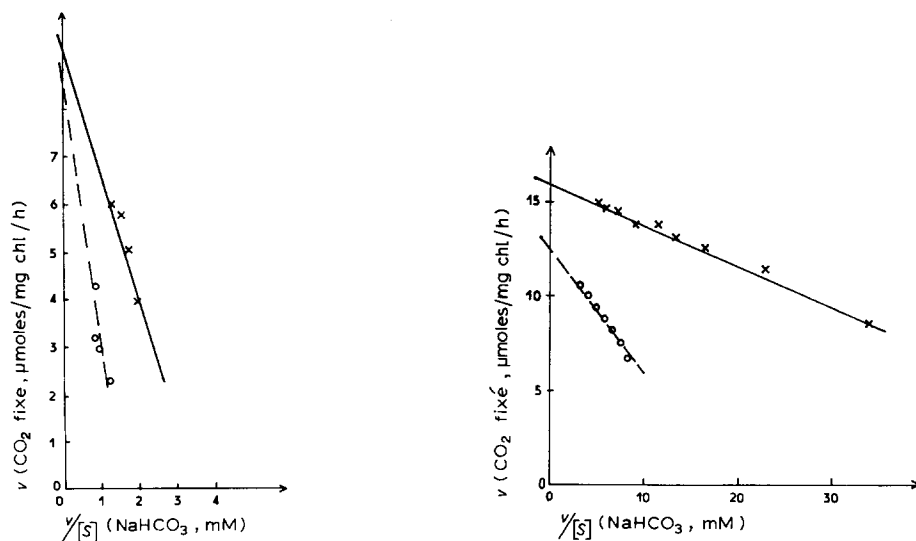


Fig. 6. Etude de cinétique de l'inhibition par P_i de la vitesse de fixation de $^{14}CO_2$ par les chloroplastes isolés. Chlorophylle = 65 $\mu g/ml$; $NaHCO_3$ = 0.5 à 5 mM. \times — \times , P_i = 0.15 mM; \bigcirc — \bigcirc , P_i = 0.65 mM.

Fig. 7. Etude de cinétique de la stimulation par l'antimycine A de la vitesse de fixation de $^{14}CO_2$ par les chloroplastes isolés. Chlorophylle = 43 $\mu g/ml$; $NaHCO_3$ = 0.25 à 10 mM. \times — \times , antimycine A = 1 μM ; \bigcirc — \bigcirc , antimycine A = 0.

La comparaison des variations en présence de P_i, des valeurs des constantes cinétiques de la Fraction I et des constantes cinétiques apparentes des chloroplastes, montre que les effets de P_i dans les chloroplastes sont en partie les mêmes que ceux qui sont observés sur la Ribul-1,5-P₂ carboxylase (Tableau III). Pour l'antimycine, il apparaît nettement qu'elle est antagoniste de P_i.

TABLEAU III

EFFET DE P_i ET DE L'ANTIMYCINE A SUR LES CONSTANTES CINÉTIQUES DES RÉACTIONS CATALYSÉES PAR LA RIBUL-1,5-P₂ CARBOXYLASE DE LA FRACTION I ET DES CHLOROPLASTES ISOLÉS, EN PRÉSENCE DE DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE BICARBONATE

	Exp.	Effecteur	v_{max} (nmoles/mg protéine par min)	K_m (mM)	Affinité 1/ K_m
Fraction I de feuilles d'épinard	1	—	7.75	0.86	1.15
		P _i 10 mM	7.75	1.25	0.8
		P _i 15 mM	7.75	1.51	0.66
			v_{max} (μmoles/mg chl par h)		
Chloroplastes isolés	2	P _i 0.15 mM*	9.3	2.6	0.4
		P _i 0.65 mM	8.3	5.4	0.2
	3	P _i 0.15 mM*	13	0.7	1.4
		P _i 0.15 mM			
		+ antimycine A 1 μM	15.7	0.2	4.5

* Il s'agit de 2 expériences distinctes réalisées à deux époques différentes. L'écart des résultats est dû à la variabilité du matériel biologique.

DISCUSSION

En accord avec les observations de GIBBS ET CALO¹⁶, LOSADA *et al.*¹⁷, ces résultats montrent que le phosphate, pour des concentrations supérieures à 0.15 mM, est inhibiteur de la fixation de CO₂ par les chloroplastes isolés. Ils précisent de plus que cet effet est dû au moins en partie, à l'inhibition de la Ribul-1,5-P₂ carboxylase dans une réaction compétitive avec le bicarbonate. Ce fait est à rapprocher de l'observation de COCKBURN *et al.*⁶, qui ont signalé une inhibition par P_i du dégagement photosynthétique d'O₂ réalisé par les chloroplastes isolés, en présence de HCO₃⁻.

L'effet inhibiteur de P_i sur la carboxylation est indépendant de l'effet stimulant qu'il peut avoir sur la photophosphorylation, alors que la fixation de CO₂ est stimulée par ATP exogène dans certaines limites de concentration. En présence d'ADP et P_i, les deux effets, inhibition de la fixation de CO₂ et activation de la photophosphorylation évoluent parallèlement. Les molécules d'ATP formées dans ces conditions ne participent pas au fonctionnement du cycle du carbone dans les chloroplastes entiers. De plus, on peut remarquer que l'activité d'incorporation de ³²P_i dans les oses P qui accompagne la fixation de CO₂ est modifiée de la même façon que cette dernière par des facteurs tels que l'antimycine et P_i (Tableaux I et II). Lors de l'assimilation de CO₂ dans les chloroplastes entiers, c'est donc la vitesse de fixation de CO₂ qui gouverne la vitesse d'incorporation de P_i.

L'antimycine lève l'inhibition de la carboxylation par P_i . Elle n'agit pas elle-même sur la Ribul-1,5- P_2 carboxylase. Les observations décrites ci-dessus montrent que son rôle immédiat dans la levée d'inhibition n'est pas seulement dû à l'effet qu'elle peut avoir sur la photophosphorylation et confirment l'hypothèse émise précédemment de l'influence favorable de l'antimycine sur la capacité d'utilisation de HCO_3^- . En cela, elle est antagoniste de P_i . En effet, l'inhibition par P_i est bien levée par une augmentation de la concentration de HCO_3^- . Puisque l'antimycine annule l'effet de P_i sur l'affinité pour HCO_3^- des chloroplastes isolés, on peut penser à titre spéculatif qu'elle agit au moins en partie en provoquant une augmentation de la concentration de HCO_3^- ou de CO_2 , si ce dernier substrat est le plus spécifique de la Ribul-1,5- P_2 carboxylase¹⁸, au niveau des sites de carboxylation des chloroplastes.

Quant au mécanisme de la concentration du CO_2 ou du HCO_3^- au niveau de la Ribul-1,5- P_2 carboxylase, il est tentant de supposer qu'il est lié à l'utilisation d'un intermédiaire riche en énergie¹⁹, hypothèse qui a déjà été avancée par RAVEN²⁰ pour le transfert du bicarbonate dans certaines algues.

RÉSUMÉ

La fixation de CO_2 par les chloroplastes entiers d'épinard a été mesurée en présence des substrats de la photophosphorylation, ADP et P_i . L'effet de l'antimycine A sur la carboxylation a été étudié.

1. Lors de l'assimilation de CO_2 dans les chloroplastes entiers, c'est la vitesse de fixation de CO_2 qui gouverne la vitesse d'incorporation de P_i .

2. La fixation de CO_2 apparaît antagoniste de la photophosphorylation, car elle est inhibée en présence de concentrations d'ADP et de P_i qui permettent une synthèse active d'ATP.

3. Il est montré que des deux substrats de photophosphorylation, c'est P_i qui inhibe la carboxylation. Cette inhibition est levée par l'antimycine.

4. L'effet inhibiteur de P_i est dû au moins en partie à une inhibition de la ribulose-1,5- P_2 carboxylase, compétitive du bicarbonate. L'effet de l'antimycine, antagoniste de celui du phosphate, pourrait être d'augmenter la capacité d'utilisation du bicarbonate par les chloroplastes.

5. Il est supposé que le mécanisme de concentration de CO_2 ou de HCO_3^- au niveau de la ribulose-1,5- P_2 carboxylase est peut-être lié à l'utilisation d'un intermédiaire riche en énergie.

REMERCIEMENTS

Nous sommes très reconnaissantes à Monsieur le Professeur A. Moyse qui a animé les discussions sur ce travail. Nous remercions vivement Madame E. Bismuth pour l'aide technique qu'elle y a apportée.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 P. ELLYARD, Ph. D. Thesis, Cornell University, U.S.A., 1967.
- 2 M. L. CHAMPIGNY ET M. GIBBS, in H. METZNER, *Progress in Photosynthesis Research*, Vol. 3, IUBS, Tübingen, 1969, p. 1534.
- 3 B. SCHACTER, M. L. CHAMPIGNY ET M. GIBBS, *Plant Physiology*, sous presse.

- 4 M. MIGINIAC-MASLOW, *Biochim. Biophys. Acta*, 234 (1971) 344.
- 5 R. G. JENSEN ET J. A. BASSHAM, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 56 (1966) 1095.
- 6 W. COCKBURN, C. W. BALDRY ET D. A. WALKER, *Biochim. Biophys. Acta*, 143 (1967) 614.
- 7 M. L. CHAMPIGNY, *Rev. Gén. Botanique*, 67 (1960) 62.
- 8 J. BRUINSMA, *Photochem. Photobiol.*, 2 (1963) 241.
- 9 P. W. TROWN, *Biochemistry*, 4 (1965) 908.
- 10 J. H. WILSON ET D. R. MACCALLA, *Can. J. Biochem.*, 46 (1967) 441.
- 11 O. BJÖRKMAN, *Physiol. Plantarum*, 21 (1968) 1.
- 12 O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR ET R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- 13 J. R. VOSE ET M. SPENCER, *Can. J. Biochem.*, 47 (1969) 443.
- 14 M. L. CHAMPIGNY ET E. BISMUTH, *Can. J. Botany*, 48 (1970) 1227.
- 15 J. M. PAULSEN ET M. D. LANE, *Biochemistry*, 5 (1966) 2350.
- 16 M. GIBBS ET N. CALO, *Plant Physiol.*, 34 (1959) 318.
- 17 M. LOSADA, A. V. TREBST ET D. I. ARNON, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 832.
- 18 T. G. COOPER, D. FILMER, M. WISHNICK ET M. D. LANE, *J. Biol. Chem.*, 244 (1969) 1081.
- 19 M. MIGINIAC-MASLOW ET M. L. CHAMPIGNY, *Biochim. Biophys. Acta*, 234 (1971) 353.
- 20 J. A. RAVEN, *J. Exptl. Botany*, 19 (1968) 193.

Biochim. Biophys. Acta, 234 (1971) 335-343