

BBA 46120

ETUDE DE LA PHOTOPHOSPHORYLATION ENDOGENE DES CHLOROPLASTES ISOLES D'EPINARD

M. MIGINIAC-MASLOW

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

(Reçu le 23 décembre, 1970)

SUMMARY

Study on endogenous photophosphorylation of isolated spinach chloroplasts

Whole spinach chloroplasts were able to perform photophosphorylation under nitrogen without the addition of any redox cofactor. This "endogenous" phosphorylation was totally insensitive to 3-(*p*-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea. After osmotic shock endogenous ATP formation decreased but the addition of 3-(*p*-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea stimulated it.

Under a stream of nitrogen, whole chloroplasts reduced NADP⁺ after an osmotic shock, in the absence of added ferredoxin. The resulting ATP/NADPH ratios were high (approx. 2 or 3). They decreased to 1 in the presence of either exogenous ferredoxin, 3-(*p*-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea or limiting light: *i.e.* high ATP/NADPH ratios were observed only when the terminal step of NADP⁺ reduction was limiting.

The endogenous anaerobic phosphorylation was inhibited by antimycin A to the same extent as the O₂-dependent endogenous non-cyclic phosphorylation.

A direct inhibition of electron transport by antimycin A has never been observed.

INTRODUCTION

La nécessité d'un apport d'ATP par la voie cyclique pour l'assimilation photosynthétique du CO₂ a été avancée par ARNON *et al.*¹ et DEL CAMPO *et al.*², à la suite d'études sur la stoechiométrie de la phosphorylation non cyclique faisant apparaître qu'il y a 1 ATP formé pour 1 NADP⁺ réduit (ou par paire d'électrons transportés)¹⁻⁴. Or le fonctionnement du cycle de Calvin exige 3 ATP pour 2 NADPH⁵.

Cependant, la stoechiométrie de la phosphorylation non cyclique a été remise en question par IZAWA et GOOD⁶ qui prennent en considération, pour le calcul du rapport P/e₂, uniquement la valeur du transfert d'électrons induit par l'addition d'ADP + P_i. Ils trouvent dans ces conditions un rapport P/e₂ = 2. La possibilité théorique⁷, ou pratique⁸⁻¹⁰ d'obtenir des rapports P/e₂ supérieurs à 1 sans artifice de calcul a été signalée par d'autres auteurs.

Abréviation: CMU, 3-(*p*-chlorophényl)-1,1-diméthylurée.

Dans une précédente étude¹¹, des variations importantes des rapports ATP/NADPH ont été observées avec des chloroplastes isolés d'épinard en fonction des activités respectives de deux transferts non cycliques, à O₂ et à NADP⁺.

Le présent travail concerne essentiellement l'existence d'une phosphorylation endogène dans ces chloroplastes, et les variations des rapports ATP/NADPH observées sous azote.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Les chloroplastes sont extraits de feuilles d'épinard (*Spinacia oleracea* L., var. America) cultivé en conditions contrôlées¹¹. La technique d'extraction est dérivée de celle de JENSEN ET BASSHAM¹², avec les modifications suivantes: la solution de broyage est constituée de tampon pyrophosphate 10 mM, pH 7.6, sorbitol 330 mM, NaNO₃ 2 mM, MnCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, K₂HPO₄ 0.15 mM, EDTA 2 mM, NaCl 20 mM. La filtration sur gaze est suivie d'une filtration sur double épaisseur de toile de nylon (vide de maille: 48 μ). Le culot chloroplastique, obtenu après centrifugation rapide, est remis en suspension dans un mélange où le tampon pyrophosphate est remplacé par un tampon *N*-tris(hydroxyméthyl)méthylglycine 50 mM, pH 8.1, et où le NaCl est supprimé.

Dans les études en présence de NADP⁺, le culot de chloroplastes entiers est repris par du tampon de suspension dilué au 1/10.

Le dosage de chlorophylle est fait selon ARNON¹³. La ferrédoxine est extraite de feuilles d'épinard par la méthode de HILL ET BENDALL¹⁴. Son activité est de 64 unités San Pietro/mg de protéine.

Le milieu réactionnel de base est identique au tampon de suspension. Les autres additions sont précisées dans les légendes des expériences.

L'incubation est faite dans un appareil de Warburg, à 16°, sous circulation d'azote ou d'air. L'éclairement maximum en lumière blanche est de $3 \cdot 10^5$ ergs·cm⁻²·sec⁻¹. Il peut être diminué à l'aide de filtres neutres (Schott und Gen) appliqués contre le fond des fioles. Le NADPH est dosé par spectrophotométrie à 340 nm, après élimination des chloroplastes par centrifugation au froid à 10000 × g. Le ferricyanure non réduit est dosé de même, à 420 nm.

Pour la phosphorylation, le mélange réactionnel est déprotéinisé par précipitation à l'acide trichloroacétique (concentration finale: 2 %) et centrifugation. L'ATP radioactif formé est déterminé par la technique d'AVRON¹⁵.

Les témoins de carboxylation sont faits en présence de NaH¹⁴CO₃ 10 mM. Le ¹⁴CO₂ fixé est déterminé par comptage, après élimination du ¹⁴CO₂ non fixé par l'acide formique.

RÉSULTATS

Les chloroplastes entiers d'épinard utilisés au cours de cette étude ont une activité de carboxylation variant entre 2 et 20 μmoles de CO₂ fixé par mg chlorophylle par h. Cette activité est inférieure à celles rapportées par JENSEN ET BASSHAM¹². Cependant ces chloroplastes apparaissent en majorité intacts au microscope électronique et leur activité de carboxylation est presque totalement abolie à la suite d'un choc osmotique.

Sous azote, en présence uniquement d'ADP + P_i, ces chloroplastes forment 5 à 10 µmoles d'ATP par mg chlorophylle par h, à la lumière. Cette photophosphorylation endogène est totalement insensible au 3-(*p*-chlorophényl)-1,1-diméthylurée (CMU) (Fig. 1).

Sous air, l'activité de la phosphorylation endogène est multipliée par 3 et devient inhibée par le CMU.

Des études antérieures^{11,16} ont déjà suggéré qu'il s'agit essentiellement d'une phosphorylation non cyclique à O₂.

La phosphorylation endogène sous azote est très nettement diminuée à la suite d'un choc osmotique ou d'une mise en suspension des chloroplastes dans du NaCl 0.35 M qui agit défavorablement sur les structures¹⁷; curieusement, elle est alors stimulée 2 à 3 fois par le CMU 5 µM. L'activité endogène sous N₂, de même que la carboxylation, semble donc étroitement liée à l'intégrité chloroplastique, ce qui n'est pas le cas pour la phosphorylation non cyclique à O₂^{18,17}.

L'étude de la phosphorylation non cyclique à NADP⁺ exige de soumettre les chloroplastes intacts à un choc osmotique, pour permettre la pénétration du nucléotide. Ce traitement dilue la ferrédoxine dont la concentration devient limitante. Mais dans ces conditions, on obtient, sous azote, des rapports ATP/NADPH supérieurs à 1, souvent compris entre 2 et 3.

De telles valeurs auraient pu être dues à la superposition de la phosphorylation endogène effectuée par les chloroplastes ayant résisté au choc osmotique, à la phosphorylation non cyclique à NADP⁺ effectuée par les chloroplastes brisés. Cependant, si l'on soustrait la quantité d'ATP formée en absence de NADP⁺, le rapport ATP/NADPH corrigé reste supérieur à 1 (Tableau I, Exp. 1).

TABLEAU I

VARIATIONS DU RAPPORT ATP/NADPH DANS LES CHLOROPLASTES D'ÉPINARD SOUS AZOTE

Conditions expérimentales: Milieu réactionnel: tampon de suspension contenant, en supplément, ADP 2 mM + P_i 2 mM marqué au ³²P, des chloroplastes correspondant à 100 µg de chlorophylle, et, s'il y a lieu, NADP⁺ 2 mM et ferrédoxine 220 µg. Volume total: 2 ml. Eclairage saturant. 20 min d'incubation à la lumière. Atmosphère: circulation d'azote.

Exp. No.	Additions	ATP	NADPH	ATP	ΔATP
		(µmoles/mg chlorophylle par h)		NADPH	NADPH
1	—	3.6	0	—	—
	NADP ⁺	12.4	3.9	2.6	2.2
2	NADP ⁺	9.8	4.1	2.3	—
	NADP ⁺ + ferrédoxine	56.8	44	1.3	—

Cette observation pourrait s'interpréter par une stoechiométrie de 2 pour la phosphorylation non cyclique. Pour vérifier cette possibilité, les variations du rapport P/e₂ de ces chloroplastes ont été étudiées en fonction de l'éclairage (Fig. 2) et de la concentration en CMU (Fig. 3). On peut voir ainsi que la valeur de ce rapport diminue lorsque l'éclairage décroît ou lorsque la concentration en CMU augmente, pour se stabiliser à une valeur voisine de 1. Cette variation est surtout due à l'inhibition de la phosphorylation. La réduction du NADP⁺ est peu ou pas affectée, ce qui confirme

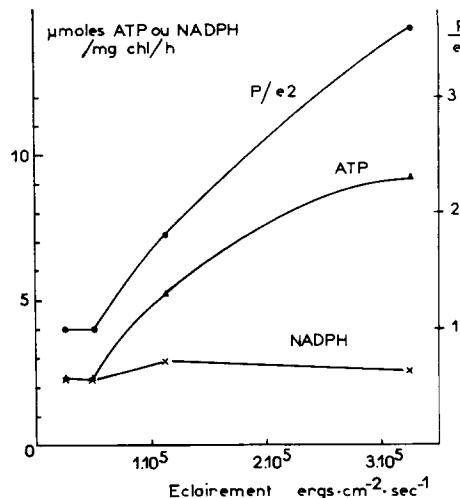
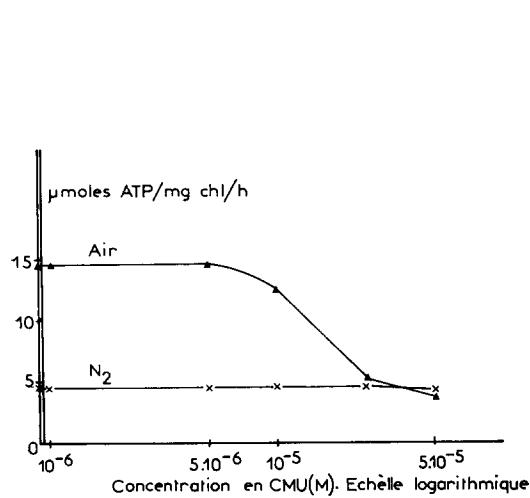


Fig. 1. Phosphorylation endogène des chloroplastes d'épinard. Effet du CMU. Conditions expérimentales: Milieu réactionnel: tampon de suspension (*cf. TECHNIQUES*) contenant en supplément, ADP 2 mM + P_i 2 mM marqué au ³²P et des chloroplastes à raison de 50 μg de chlorophylle par ml. Volume total 2 ml. Eclairage saturant. 20 min d'incubation à la lumière.

Fig. 2. Effet de l'éclairage sur la variation des rapports P/e₂ dans les chloroplastes d'épinard, sous azote, en présence de NADP⁺. Conditions expérimentales: Le milieu réactionnel comprend dans un volume total de 2 ml: 1.5 ml de tampon de suspension additionné de 4 μmoles de phosphate marqué au ³²P, 4 μmoles d'ADP et 4 μmoles de NADP⁺, et 0.5 ml de chloroplastes en suspension dans un tampon dilué au 1/10, correspondant à 100 μg de chlorophylle. Atmosphère: circulation d'azote. 10 min d'incubation à la lumière.

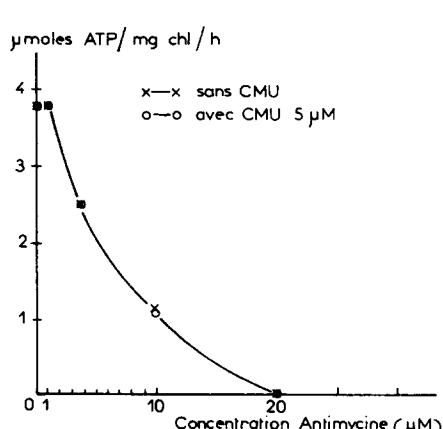
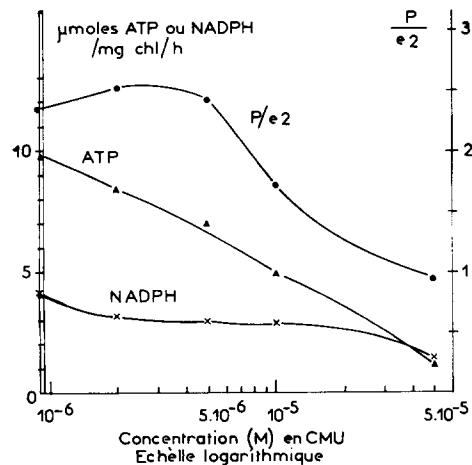


Fig. 3. Effet du CMU sur la variation des rapports P/e₂ dans les chloroplastes d'épinard, sous azote, en présence de NADP⁺. Conditions expérimentales: *cf. Fig. 2*. Eclairage saturant.

Fig. 4. Effet de l'antimycine A sur la phosphorylation endogène sous azote de chloroplastes d'épinard en présence et en absence de CMU. Conditions expérimentales: *cf. Fig. 1*. Atmosphère: circulation d'azote.

son caractère limitant. Une partie importante de l'ATP formé n'est donc pas liée à la réduction du NADP⁺.

L'addition de ferrédoxine (Tableau I, Exp. 2), stimulant nettement la réduction du NADP⁺, abaisse le rapport ATP/NADPH: les rapports P/e₂ élevés sont observés dans des conditions où la réduction du NADP⁺ est limitante.

Un point important dans l'étude de la phosphorylation endogène est sa sensibilité à l'antimycine A, du fait de l'action différentielle de cet inhibiteur sur la photo-phosphorylation et sur la fixation photosynthétique du CO₂¹⁹.

La phosphorylation endogène sous N₂ des chloroplastes intacts d'épinard est sensible à l'effet inhibiteur de l'antimycine (Fig. 4). Cet effet est identique en présence ou en absence de CMU— contrairement à plusieurs observations où l'effet de l'antimycine était plus prononcé en présence de CMU^{16, 20, 21}.

TABLEAU II

EFFETS DE L'ANTIMYCINE SUR DIFFÉRENTS TYPES DE PHOSPHORYLATION DANS LES CHLOROPLASTES D'ÉPINARD

Conditions expérimentales: Milieu réactionnel: tampon de suspension additionné d'ADP 2 mM + P_i 2 mM marqué au ³²P et de chloroplastes à raison de 50 µg de chlorophylle par ml. Autres additions, s'il y a lieu: NADP⁺ 2 mM. Inhibiteurs aux concentrations indiquées dans le tableau. Eclairage saturant. 20 min d'incubation à la lumière.

Exp.	Conditions	Inhibiteur	ATP (µmoles/mg chlorophylle par h)	Inhibition (%)	NADPH (µmoles/mg chlorophylle par h)	ATP NADPH
No.						
1	N ₂ , sans NADP ⁺ , chloroplastes entiers	—	3.1	—		
		Antimycine 5 µM	2.2	30		
		Antimycine 20 µM	0.7	78		
1	N ₂ , avec NADP ⁺ , chloroplastes après choc osmotique	—	7.65	—	2.4	3.2
		Antimycine 5 µM	7	9	2.5	2.8
	Air, sans NADP ⁺ , chloroplastes entiers	—	9.1	—		
1		Antimycine 5 µM	6.5	29		
		Antimycine 20 µM	1.7	82		
2	N ₂ , avec NADP ⁺ , chloroplastes après choc osmotique	—	12.2	—	6.8	1.8
		Antimycine 20 µM	7.3	40	7.6	1.0
		CMU 5 µM	7.3	—	6.0	1.2
		Antimycine 20 µM + CMU 5 µM	4.3	38	5.2	0.9

Pour vérifier si la phosphorylation endogène sous N₂, présumée cyclique, est plus sensible à l'antimycine que la phosphorylation non cyclique, l'effet de cet inhibiteur a été étudié sur des chloroplastes intacts sous air et sous N₂ et sur des chloroplastes soumis à un choc osmotique et mis en présence de NADP⁺ (Tableau II). L'inhibition est identique sous air et sous N₂ avec des chloroplastes intacts, ce qui tend à prouver que l'antimycine n'a pas d'effet spécifique sur la phosphorylation endogène sous N₂. La phosphorylation non cyclique à NADP⁺ n'est inhibée que pour des concentrations plus élevées. Ce fait pourrait être une conséquence du choc osmotique: en effet, les chloroplastes brisés, de façon générale, sont moins sensibles à l'action

inhibitrice de l'antimycine. La réduction du NADP⁺ n'est pratiquement pas modifiée par l'antimycine, ce qui fait penser à un effet découpleur léger.

DISCUSSION

L'observation qu'une phosphorylation endogène, totalement insensible au CMU, peut avoir lieu sous azote, dans des chloroplastes intacts, jointe à l'observation qu'elle est très sensible au choc osmotique alors que la phosphorylation sous air ne l'est pas, est en faveur de l'existence d'une phosphorylation cyclique, mais n'en constitue pas une preuve absolue.

Les rapports P/e₂, élevés observés sous N₂, en présence de NADP⁺, lorsque la réduction de ce dernier est limitante, suggèrent à première vue la superposition d'une phosphorylation cyclique importante à la phosphorylation non cyclique, dès que cette dernière n'est plus en mesure d'utiliser toute l'énergie disponible. Cependant, l'action inhibitrice du CMU sur cette phosphorylation est difficile à expliquer, à moins de considérer que l'addition de CMU modifie l'état d'oxydo-réduction de la chaîne de transfert d'électrons auquel la phosphorylation cyclique semble très sensible²². Il est donc très possible que cette phosphorylation additionnelle soit une phosphorylation non cyclique à O₂ fonctionnant avec l'O₂ libéré en relation avec la réduction du NADP⁺ et utilisé immédiatement, avant son évacuation par le courant d'azote.

Les expériences présentes faites sous azote, de même que les expériences précédentes faites sous air¹¹ montrent que le rapport ATP/NADPH peut varier dans une très large mesure en fonction de l'activité de reduction du NADP⁺ et de l'énergie lumineuse disponible. Il y a donc là un système de régulation très souple de ce rapport qui pourrait être gouverné *in vivo* par la concentration en NADP⁺ disponible.

En ce qui concerne l'action de l'antimycine, nous ne pouvons conclure à sa non-spécificité²³ vis-à-vis d'un type de phosphorylation particulier que dans la mesure où la phosphorylation endogène observée sous N₂ est réellement cyclique, ce qui n'est pas absolument certain.

Contrairement aux résultats de DRECHSLER *et al.*²¹, un effet inhibiteur de l'antimycine sur le transfert d'électrons n'a jamais été observé. Par contre, on observe un effet découpleur léger en présence de NADP⁺. Cependant, nous n'en tirons pas de conclusion quant à l'action de l'antimycine, en raison du caractère limitant de la réduction du NADP⁺ dans le système étudié.

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier Mme A. Hoarau pour sa collaboration technique dévouée.

RÉSUMÉ

Les chloroplastes entiers d'épinard effectuent une photophosphorylation sous azote sans addition d'aucun transporteur d'électrons exogène. Cette photophosphorylation "endogène" est totalement insensible au 3-(*p*-chlorophényl)-1,1-diméthylurée. Son activité est nettement diminuée à la suite d'un choc osmotique, mais l'addition de 3-(*p*-chlorophényl)-1,1-diméthylurée exerce alors un effet stimulant.

Sous azote, les chloroplastes isolés entiers réduisent le NADP⁺ après avoir subi

un choc osmotique, en absence de ferrédoxine ajoutée. Les rapports ATP/NADPH sont alors élevés (compris entre 2 et 3). Ils diminuent jusqu'à 1 en présence de ferrédoxine exogène, ou de 3-(*p*-chlorophényl)-1,1-diméthylurée, ou d'une lumière limitante: les rapports ATP/NADPH élevés ne sont donc observés que lorsque l'étape terminale de réduction du NADP⁺ est limitante.

La sensibilité de la phosphorylation endogène anaérobie à l'effet inhibiteur de l'antimycine A est identique à celle de la phosphorylation non cyclique à O₂.

Une inhibition directe du transfert d'électrons par l'antimycine n'a jamais été observée.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 D. I. ARNON, F. R. WHATLEY ET M. B. ALLEN, *Science*, 127 (1958) 1026.
- 2 F. F. DEL CAMPO, J. M. RAMIREZ ET D. I. ARNON, *J. Biol. Chem.*, 243 (1968) 2805.
- 3 M. AVRON ET A. T. JAGENDORF, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 1315.
- 4 M. STILLER ET B. VENNESLAND, *Biochim. Biophys. Acta*, 60 (1962) 562.
- 5 M. CALVIN, in C. LIEBECQ, *Proc. 3rd Intern. Congr. Biochem.*, Academic Press, New-York, 1956, p. 211.
- 6 S. IZAWA ET N. E. GOOD, *Biochim. Biophys. Acta*, 162 (1968) 380.
- 7 P. MITCHELL, *Biol. Rev.*, 41 (1966) 445.
- 8 W. S. LYNN ET R. H. BROWN, *J. Biol. Chem.*, 242 (1967) 412.
- 9 W. S. LYNN ET R. H. BROWN, *J. Biol. Chem.*, 242 (1967) 418.
- 10 A. A. HORTON ET D. O. HALL, *Nature*, 218 (1968) 386.
- 11 Y. MATHIEU, M. MIGINIAC-MASLOW ET R. REMY, *Biochim. Biophys. Acta*, 205 (1970) 95.
- 12 R. G. JENSEN ET J. A. BASHAM, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 56 (1966) 1095.
- 13 D. I. ARNON, *Plant Physiol.*, 24 (1949) 1.
- 14 R. HILL ET F. BENDALL, *Nature*, 187 (1960) 417.
- 15 M. AVRON, *Biochim. Biophys. Acta*, 40 (1960) 257.
- 16 M. MIGINIAC-MASLOW ET A. MOYSE, in H. METZNER, *Progress in Photosynthesis Research*, Vol. 3, IUBS, Tübingen, 1969, p. 1203.
- 17 M. MIGINIAC-MASLOW ET A. MOYSE, *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 163 (1969) 2491.
- 18 R. BOURDU, Y. MATHIEU, M. MIGINIAC-MASLOW, R. REMY ET A. MOYSE, *Planta*, 80 (1968) 191.
- 19 M. L. CHAMPIGNY ET M. GIBBS, in H. METZNER, *Progress in Photosynthesis Research*, Vol. 3, IUBS, Tübingen, 1969, p. 1534.
- 20 K. TAGAWA, H. Y. TSUJIMOTO ET D. I. ARNON, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 49 (1963) 567.
- 21 Z. DRECHSLER, N. NELSON ET J. NEUMANN, *Biochim. Biophys. Acta*, 189 (1969) 65.
- 22 Z. GROMET-ELHANAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 131 (1967) 526.
- 23 S. IZAWA, T. N. CONNOLLY, G. D. WINGET ET N. E. GOOD, *Brookhaven Symp. Biol.*, 19 (1969) 169.