

BBA 46174

EFFET DE LA LONGUEUR D'ONDE DE PRÉILLUMINATION SUR LA
DÉSACTIVATION DES FORMES OXYDÉES DU DONNEUR D'ÉLECTRONS
DU PHOTOSYSTÈME II

C. LEMASSON* ET G. BARBIERI

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

(Reçu le 5 avril, 1971)

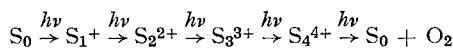
SUMMARY

Effect of preillumination wavelength on the deactivation of oxidized forms of the Photosystem II electron donor

Deactivation was studied using chlorella cells or spinach chloroplasts after an illumination of different wavelengths (light I = 710 nm, light II = 650 or 480 nm). The measurements concerned mainly the third oxidized state S_3 of the System II electron donor, according to the scheme proposed by B. KOK, B. FORBUSH AND M. McGLOIN, (*Photochem. Photobiol.*, 11 (1970) 457). The time course of deactivation was followed during the dark after each preillumination. Different results were obtained with algae in state 1 or state 2 as defined by C. BONAVENTURA AND J. MYERS, (*Biochim. Biophys. Acta*, 189 (1969) 366). In state 1 the deactivation of S_3 is faster after light II than after light I; in state 2, except at the beginning of the decay, the deactivation of S_3 is almost the same after the two kinds of preillumination. With chloroplasts the deactivation is slower, but always faster after light II than after light I, no transition between state 1 and state 2 was observed. The results are discussed with reference to the possible reducing substrates of the reaction.

INTRODUCTION

Les mesures d'émission d'oxygène par les organismes photosynthétiques montrent que le fonctionnement des centres photochimiques directement responsables de cette émission (Photosystème II) est complexe. Plusieurs modèles ont été proposés pour décrire et expliquer, au moins partiellement, ce fonctionnement¹⁻³. Tous reposent sur une notion de base que les mesures d'émission d'oxygène rendent indiscutable: il y a accumulation de charges positives au niveau du donneur primaire Z des centres photochimiques du Système II. L'ensemble des résultats concernant l'émission d'oxygène a conduit au modèle proposé par KOK *et al.*³ qui traduit le mieux le fonctionnement du Photosystème II; ce modèle peut se résumer ainsi:



* Laboratoire de Photosynthèse, C.N.R.S., 91, Gif-sur-Yvette, France.

Les états S_0 et S_1^+ sont stables à l'obscurité et l'étape $S_4^{4+} \rightarrow S_0 + O_2$ est une réaction sombre dont le $t_{1/2}$ est voisin de 1 msec. Rappelons qu'après une longue période d'obscurité, un éclair saturant de courte durée ne produit pas d'oxygène⁴: cela signifie que la concentration de la forme S_3 qui précède d'une seule étape photochimique l'émission d'oxygène, est alors nulle; tous les états S_3 se sont désactivés pendant la période d'obscurité qui a précédé l'éclair.

Cette disparition à l'obscurité des charges positives accumulées au cours d'une illumination (désactivation) doit nécessiter l'intervention de réducteurs. Les mesures d'oxygène dont cet article rend compte ont pour but de préciser le processus de désactivation d'au moins une des formes oxydées du donneur Z, la forme S_3 .

La disparition de l'état S_3 à l'obscurité a déjà été étudiée par d'autres auteurs¹⁻⁸; pour suivre la désactivation, la concentration $S(t)$ de S_3 est mesurée au cours du temps d'obscurité suivant un prétraitement donné. Dans notre cas un faisceau de préillumination continu place un certain nombre de centres photochimiques du Système II dans la forme S_3 .

Nous désignerons par $S(0)$ la concentration de S_3 atteinte à la fin de la préillumination, $S(0)$ dépend de l'intensité, de la durée et de la longueur d'onde de préillumination. Cette préillumination modifie également l'état des transporteurs de la chaîne de transfert d'électrons qui pourraient être des partenaires des réactions de désactivation. Des expériences antérieures sur la cinétique de désactivation en fonction de la nature de la préillumination avaient conduit à des résultats controversés^{2,6}; ainsi la désactivation pouvait être plus rapide après 650 nm qu'après 700 nm ou inversement. Nous avons repris cette étude dans de meilleures conditions pour tenter de préciser les mécanismes de disparition de l'état S_3 .

MATÉRIEL ET MÉTHODES

(1) Les expériences décrites dans cet article ont été effectuées sur des algues unicellulaires *Chlorella pyrenoidosa* ou sur des chloroplastes isolés d'Epinard. Les algues, cultivées en milieu de Knop avec les oligoéléments A₅ et B₈ d'Arnon, sont placées dans un tampon phosphate 0.05 M (pH 6.4), KCl 0.1 M pendant les mesures. Les chloroplastes, préparés par une technique voisine de celle décrite par AVRON⁹, sont utilisés immédiatement après l'extraction, dans un tampon Tris-HCl 0.05 M (pH 7.8), saccharose 0.4 M, KCl 0.1 M, NaCl 0.01 M, sérumalbumine à 9 g/l. Ils peuvent être conservés quelques jours à forte concentration de chlorophylle dans le glycérol (50 %, v/v) à -20° (réf. 10). Les chloroplastes sont utilisés à 500 µg de chlorophylle par ml, en présence de NADP⁺ ($2 \cdot 10^{-4}$ M). Suivant les expériences, on a ajouté du NH₄Cl à la concentration finale de 10^{-3} M; ce découplant donne une meilleure stabilité des mesures en accélérant la réaction limitante. Toutes les mesures sont faites à 20°.

(2) La préillumination est faite en lumière monochromatique continue de type Système I ou Système II. Ce faisceau P est fourni par une lampe quartz-iode OSRAM 650 W et des filtres interférentiels (Baird-Atomic ou SEAVOM, maximum de transmission à 481 nm ou 652 nm pour le Système II, 708 nm pour le Système I, bandes passantes à demi-transmission 6 à 7 nm). L'intensité de la lumière est ajustée pour obtenir le même temps d'activation à chaque longueur d'onde, c'est-à-dire que la constante de vitesse de la Photoréaction II reste la même¹¹. On choisit une intensité suffisante pour que la désactivation ne soit pas prépondérante. Pour les algues, le temps d'activation est de 0.5 sec; pour les chloroplastes où la désactivation est plus

lente, ce temps est de 1 sec. Pour ce réglage d'intensité, le faisceau P est modulé (25 cycles/sec) en synchronisation avec l'avance d'adresse de l'analyseur multicanaux CAT (T.M.C.) qui enregistre le signal ampérométrique. En détectant le signal modulé produit par ce faisceau après une longue période d'obscurité, on obtient la cinétique d'activation dont les caractéristiques sont photochimiques^{3,11}.

(3) La concentration $S(t)$ de l'état S_3 est suivie par deux modes de détection différents qui utilisent la méthode polarographique mise au point et décrite par JOLIOT ET JOLIOT¹² pour mesurer l'émission d'oxygène.

Mode A: On dispose pour éclairer la cuve de mesure d'un tube à décharge Verre et Quartz VQX, CAD 22 (énergie électrique = 1 joule, durée: 1 μ sec à mi-hauteur et 5 μ sec à 10 % de la hauteur). Le déclenchement du flash est synchronisé avec l'avance d'adresse du multicanaux CAT, ce qui assure une parfaite reproductibilité de la mesure du signal ampérométrique émis sous l'effet de l'éclair. A la fin de la préillumination, l'éclair saturant de courte durée est déclenché à différents temps d'obscurité. La quantité d'oxygène dégagé est proportionnelle à S_3 . Le temps t d'obscurité qui s'écoule entre l'obturation du faisceau P de préillumination et le déclenchement de l'éclair peut être mesuré à l'oscilloscope. Chaque expérience ne permet de déterminer qu'un point de la courbe de désactivation. Dans certaines expériences deux éclairs sont émis en série, le premier à l'instant t , le second à l'instant $t + \Delta t$, la quantité d'oxygène émise par le premier éclair est proportionnelle à $S(t)$; la quantité d'oxygène émise par le second est proportionnelle à la concentration de l'état S_2 à condition de négliger l'effet de la désactivation pendant l'intervalle Δt . Tel est le principe de la technique de détection par une série d'éclairs utilisée par JOLIOT *et al.*² et KOK *et al.*³ dans leur étude du fonctionnement du Système II. On a pris en général $\Delta t = 160$ msec.

Mode B: Quand on utilise un éclairement modulé de faible intensité i , la vitesse modulée d'émission d'oxygène est proportionnelle à chaque instant à la concentration des centres à l'état S_3 soit $v(O_2) = k i S(t)$. A la fin de la préillumination, on peut donc suivre de façon continue la fonction $S(t)$; cependant ceci n'est possible que si l'intensité du faisceau modulé détecteur est suffisamment faible pour ne produire qu'une quantité de S_3 négligeable devant $S(t)$. Cette condition n'est remplie que pendant un temps limité après la préillumination. Le faisceau modulé détecteur (faisceau D, 25 cycles/sec) est fourni par une lampe Xénon OSRAM 900 W et un monochromateur à réseau HUET M 25 réglé sur 515 nm pour exciter de façon équilibrée les deux photosystèmes¹¹. Au cours des mesures, l'intensité de détection (faisceau D modulé) est 20 fois plus faible que l'intensité de préillumination. L'obturation du faisceau P peut être synchronisée avec le départ de l'enregistrement du signal modulé produit par le faisceau D; le temps de fermeture de l'obturateur est voisin de 2 msec, mais le signal est perturbé par un artefact pendant environ 40 msec, ce qui détermine le temps de réponse de la méthode. La valeur initiale de la vitesse d'émission d'oxygène, proportionnelle à $S(0)$, est mesurée à la fin de la préillumination pendant laquelle les deux faisceaux P et D sont ouverts, le faisceau D ayant alors un effet actinique négligeable tout comme au cours de la période qui suit immédiatement l'obturation du faisceau P.

RÉSULTATS

Effet de la préillumination sur l'état $S(0)$.

Rappelons que l'état "initial" $S(0)$ est celui qui est atteint à la fin de la préillumination (temps zéro avant la désactivation à l'obscurité). Les vitesses initiales

d'émission d'oxygène étant les mêmes (même temps d'activation), on constate que la concentration $S(o, I)$ atteinte avec la lumière Système I (710 nm) est plus élevée que la concentration $S(o, II)$ atteinte avec la lumière Système II (480 ou 650 nm). Cet effet a été observé par de nombreux auteurs, entre autres par JOLIOT¹¹ et GINGRAS ET LEMASSON⁵; il confirme l'existence de deux systèmes photochimiques fonctionnant en série^{13,14}; le rapport $S(o, I)/S(o, II)$ sera pris dans la suite comme une mesure de "l'effet Emerson". Les mesures de fluorescence^{15,16} ont montré que la fluorescence correspondant à l'état $S(o, I)$ est plus élevée que celle correspondant à l'état $S(o, II)$, c'est-à-dire que la concentration du quencher de fluorescence Q (accepteur primaire du Photosystème II) varie en fonction de la longueur d'onde d'illumination. Soulignons que, si on admet une répartition uniforme de l'accepteur tant sous la forme oxydée que sous la forme réduite, c'est-à-dire une répartition des Q et Q^- indépendante de l'état du donneur Z, il existe des centres (S_3Q^-) qui ne seront pas photochimiquement actifs; le terme S_3 utilisé dans ce travail ne désigne que les centres sous la forme (S_3Q) .

Nous avons pu déterminer, tant sur les algues que sur les chloroplastes, un effet Emerson (mesuré par la valeur ϵ du rapport $S(o, I)/S(o, II)$) voisin de 2. Mais cet effet évolue au cours de l'expérience; ceci est particulièrement net chez les algues où le rapport ϵ peut atteindre 1. Chez les algues, l'effet Emerson diminue sous l'action de la lumière de type Système II et il est au moins partiellement rétabli par l'action de la lumière de type Système I. Ainsi, au cours de l'illumination à 650 nm, on observe une augmentation importante du rendement de l'éclair qui mesure $S(o, II)$ alors que $S(o, I)$ n'évolue pas sensiblement pendant l'illumination à 710 nm. Ces changements lents induits par une illumination prolongée ont été étudiés par BONAVENTURA ET MYERS¹⁷ qui les interprètent comme des transitions définissant deux cas limites, l'état 1 (atteint à l'obscurité ou en lumière Système I) et l'état 2 (atteint en lumière Système II), la répartition des photons absorbés par les deux photosystèmes étant différente selon chaque état. Les mesures de DELRIEU ET DE KOUCHKOVSKY¹⁸ montrent qu'une même variation de cette répartition s'accompagne d'une variation beaucoup plus importante de la concentration stationnaire des centres du Système II à 650 nm qu'à 710 nm; c'est-à-dire que dans l'état 1 le rapport ϵ est plus élevé que dans l'état 2.

L'amplitude de ces changements lents dépend des algues utilisées: pour éliminer cette évolution au cours des cinétiques de désactivation, nous avons choisi un protocole qui assure une valeur constante à ϵ pendant chaque expérience. Pour maintenir les algues dans l'état 1 (rapport ϵ élevé), on intercale un éclairement de 1 à 2 min à 710 nm entre chaque prééclairage de type Système II dont la durée est courte (30 sec). Pour maintenir les algues dans l'état 2 (rapport ϵ faible, voisin de 1), l'étude de la désactivation est précédée d'un long traitement à 650 nm (30 min environ), les prééclairages à 650 nm (1 min) et à 710 nm (30 sec) étant ensuite alternées.

Dans le cas des chloroplastes, nous n'avons pas observé de changements induits par une longue illumination et nous avons couramment obtenu un rapport ϵ élevé et stable. Il semble donc que ces effets lents soient liés à l'intégrité de structures fragiles dans les chloroplastes (membranes par exemple). Les résultats récents de VREDENBERG¹⁹ en fluorescence sont en accord avec nos observations. Pour limiter la perte d'activité des chloroplastes au cours de l'expérience, nous avons choisi des prééclairages de courte durée avec alternance des éclairages à 710 nm et 650 nm.

Etude des cinétiques de désactivation

Nous allons considérer les fonctions $S(t)$ obtenues après les préilluminations de type Système I et de type Système II en les désignant respectivement par $S(t, I)$ et $S(t, II)$. Les courbes représentant ces deux fonctions mesurées par le mode de détection A sont portées sur chacune des Figs. 1a, 2a, 3a qui correspondent à trois cas différents:

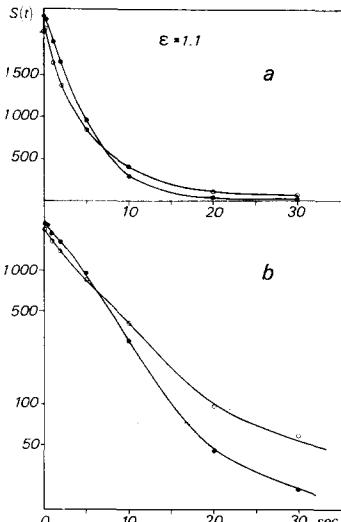
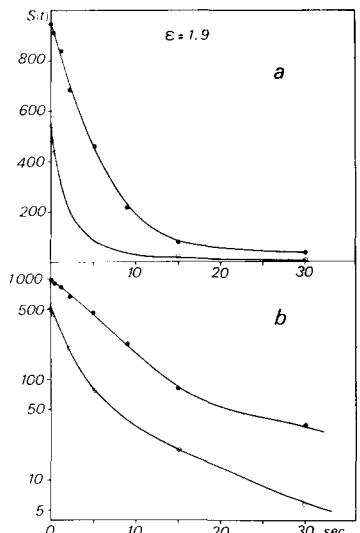


Fig. 1. $S(t)$ représente la concentration de S_3 en fonction du temps d'obscurité qui suit la pré-illumination de type Système I ou Système II. Mode de détection A (voir MATÉRIEL ET MÉTHODES). L'effet Emerson (ϵ) est donné par le rapport des concentrations mesurées au temps zéro. Les Courbes b sont une représentation semi-logarithmique des Courbes a. Algues maintenues dans l'état 1, effet Emerson élevé $\epsilon = 1.9$. ●, préillumination à 710 nm; ○, préillumination à 480 nm.

Fig. 2. Voir légende Fig. 1. Algues maintenues dans l'état 2, effet Emerson $\epsilon = 1.1$. ●, préillumination à 710 nm; ○, préillumination à 480 nm.

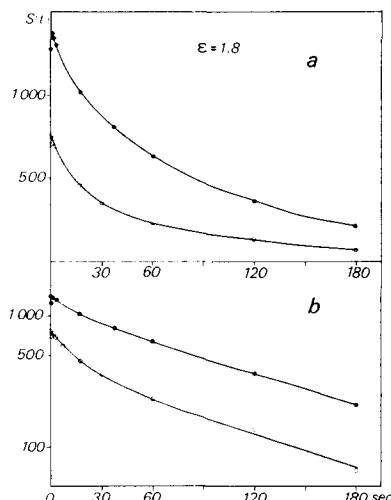


Fig. 3. Voir légende Fig. 1. Chloroplastes en présence de NADP^+ et ferredoxine. Effet Emerson $\epsilon = 1.8$. ●, préillumination à 710 nm; ○, préillumination à 650 nm.

(1) Sur les Figs. 1a et 2a il s'agit d'algues où l'effet Emerson a été maintenu respectivement à une valeur élevée ($\varepsilon = 1.9$, Fig. 1a) et à une valeur faible ($\varepsilon = 1.1$, Fig. 2a).

(2) Sur la Fig. 3a il s'agit d'une expérience avec des chloroplastes et l'effet Emerson était voisin de 1.8.

(3) Les Figs. 1b, 2b, 3b sont une représentation semi-logarithmique des cinétiques précédentes.

La désactivation de l'état S_3 est terminée en 30 sec chez les algues, mais demande plusieurs minutes chez les chloroplastes; c'est un résultat déjà obtenu par d'autres auteurs^{7,8}. On peut globalement caractériser chaque cinétique par son $t_{1/2}$; nous résumons dans le Tableau I les valeurs de $t_{1/2}$ correspondant aux courbes présentées.

Ces résultats montrent clairement que, lorsque l'effet Emerson est élevé, la désactivation de S_3 est plus rapide après la préillumination II qu'après la préillumination I. Lorsque l'effet Emerson est faible, la durée totale de la désactivation des états S_3 est au contraire légèrement plus courte après la préillumination I qu'après la préillumination II (Fig. 2a) comme l'avait déjà constaté LEMASSON⁶. La divergence apparue entre les travaux antérieurs de JOLIOT *et al.*² et de LEMASSON⁶ nous paraît ainsi

TABLEAU I

$t_{1/2}$ CALCULÉ D'APRÈS LES CINÉTIQUES DE DÉSACTIVATION PRÉSENTÉES SUR LES FIGS. 1-3
 ε = effet Emerson.

	$t_{1/2}$ (sec)		
	Algues $\varepsilon = 1.9$	Algues $\varepsilon = 1.1$	Chloroplastes $\varepsilon = 1.8$
Préillumination 480 ou 650 nm	1.6	3.8	26
Préillumination 710 nm	4.8	4.2	55

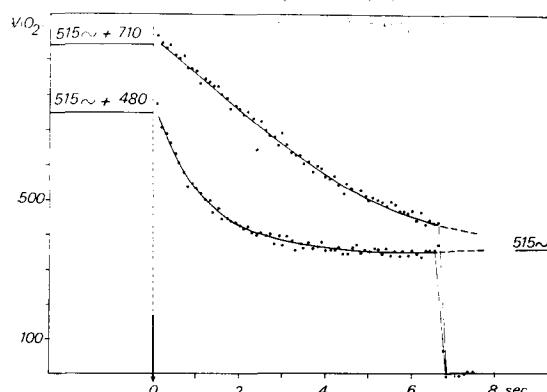


Fig. 4. Vitesse modulée d'émission d'oxygène détectée à 515 nm en présence ou en l'absence d'un faisceau continu de type Système I (710 nm) ou Système II (480 nm ou 650 nm). Mode de détection B (voir MATERIEL ET MÉTHODES). Au temps zéro le faisceau de préillumination continue est coupé. Chaque point représente la valeur de la vitesse intégrée sur 100 msec. Les résultats correspondent à la sommation de 10 expériences semblables. Algues à effet Emerson élevé qui se traduit par les vitesses différentes en présence du faisceau continu. Amplification $2 \cdot 10^3$.

essentiellement due à la différence d'état des algues qui présentaient un effet Emerson élevé pour les premiers et faible pour le second (1.3 à 1.15).

Les courbes $S(t)$ obtenues par le mode A sont assez imprécises dans les temps très courts ($t < 0.5$ sec). Sur les Figs. 4 et 5, nous avons porté les courbes obtenues directement par le mode de détection B dans le cas d'algues à effet Emerson élevé et de chloroplastes. Bien que ces courbes ne représentent pas exactement les fonctions $S(t)$, nous observons une différence de vitesse très nette dès l'arrêt de la préillumination ($t = 0$); il suffit de comparer les pentes initiales: la désactivation apparaît tout de suite plus rapide après la lumière II qu'après la lumière I.

Afin de préciser l'effet de la longueur d'onde de préillumination sur la cinétique apparemment complexe de la désactivation, nous avons calculé les dérivées logarithmiques des fonctions $S(t)$. Les fonctions

$$v(t) = -\frac{1}{S(t)} \frac{dS}{dt}$$

représentent une évaluation relative de la vitesse de désactivation et nous les désignerons par la suite par "vitesse de désactivation", soit $v(t, I)$ et $v(t, II)$ selon le type de préillumination. Les courbes de la Fig. 6 sont obtenues à partir des résultats présentés sur les Figs. 1, 2, 3. Par suite de la définition adoptée pour $v(t)$, les courbes correspondant à différentes expériences sont comparables entre elles en valeur absolue. Le calcul des vitesses $v(t)$ n'est possible que dans un intervalle de temps limité par l'incertitude sur les mesures de la quantité d'oxygène émise sous l'effet de l'éclair à la fin de la désactivation; pour les algues le calcul est limité à l'intervalle 0.5–15 sec, pour les chloroplastes à 0.5–60 sec. Ces données font apparaître une similitude entre les deux types d'algues (effet Emerson élevé ou faible) qui se distinguent ainsi des chloroplastes. En effet, l'allure générale des fonctions $v(t)$ est la même chez les algues quelle que soit la valeur de ϵ . On constate que:

(1) la vitesse de désactivation $v(t, II)$ décroît constamment au cours du temps d'obscurité suivant la lumière II; (2) la vitesse de désactivation après la lumière I, $v(t, I)$ présente une phase de croissance dans les premières secondes, le maximum étant atteint pour $t \approx 10$ sec, puis décroît pour rejoindre $v(t, II)$ vers 20 sec.

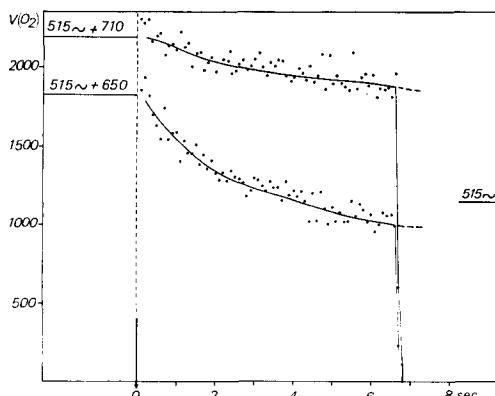


Fig. 5. Voir légende Fig. 4. Chloroplastes en présence de NADP⁺ et ferredoxine. L'effet Emerson se traduit par les vitesses différentes en présence du faisceau continu. Amplification 10⁴.

L'ensemble de nos observations sur la désactivation de l'état S_3 chez les algues se résume ainsi:

(1) Lorsque l'effet Emerson est élevé, la désactivation est sensible à la nature de la prééclairage; elle est plus rapide après la lumière II qu'après la lumière I.

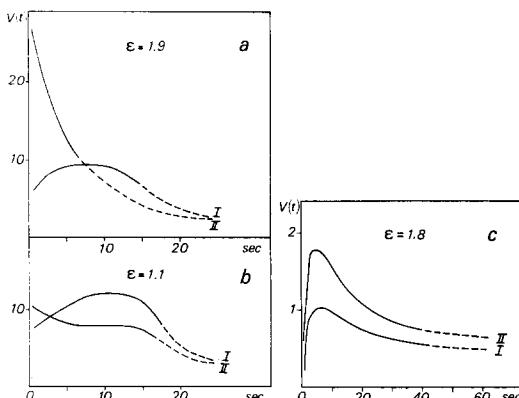


Fig. 6. $v(t)$ représente la vitesse logarithmique soit $-1/S(t) dS/dt$ calculée à partir des résultats des Figs. 1-3. Ce calcul n'est valable que dans un intervalle de temps limité au delà duquel la courbe est en pointillé. I, prééclairage à 710 nm; II, prééclairage à 480 ou 650 nm. (a) Courbes calculées à partir de la Fig. 1. Algues à effet Emerson élevé. (b) Courbes calculées à partir de la Fig. 2. Algues à effet Emerson faible. (c) Courbes calculées à partir de la Fig. 3. Chloroplastes.

(2) Lorsque l'effet Emerson est faible, les cinétiques de désactivation apparaissent assez semblables, sans grande influence de la qualité de la lumière de fond. En fait il subsiste clairement, dans les temps courts ($t < 3$ sec), un faible effet de même sens que celui des algues avec effet Emerson; $v(t, II)$ est supérieure à $v(t, I)$. Ensuite on observe un croisement des courbes $S(t, II)$ et $S(t, I)$ qui traduit une accélération transitoire de la désactivation après la lumière I; ce fait a été mis en évidence précédemment par LEMASSON⁶.

(3) Après 710 nm, que les algues soient maintenues dans l'état 1 (ϵ élevé) ou dans l'état 2 (ϵ faible), la cinétique de désactivation ne semble guère affectée, $v(t, I)$ ne présente que des différences mineures lorsque l'effet Emerson varie. Après 650 nm, le passage de l'état 1 à l'état 2 modifie grandement $S(0, II)$ et $v(t, II)$. Ainsi à $t = 0.5$ sec (notre limite de résolution initiale de vitesse), $v(t, II)$ est deux fois et demi plus grand pour $\epsilon = 1.9$ que pour $\epsilon = 1.1$.

En ce qui concerne les chloroplastes, la désactivation des états S_3 est plus lente que chez les algues; ce ralentissement est probablement en relation avec l'état des chloroplastes après leur préparation. On constate que les deux cinétiques $S(t, II)$ et $S(t, I)$ sont environ 10 fois plus lentes que leurs homologues dans le cas des algues. Cependant la désactivation est, dans tout l'intervalle de temps où nous avons pu l'étudier avec précision, plus rapide après la prééclairage II qu'après la prééclairage I.

Si l'on se reporte à la Fig. 6c, on voit que la fonction $v(t)$ est différente chez les chloroplastes: après la prééclairage II comme après la prééclairage I, la vitesse de désactivation commence par croître pour décroître ensuite; le maximum est atteint

entre 2 et 5 sec, au delà de 60 sec les deux courbes $v(t)$ se confondent. Il est probable que deux effets se produisent simultanément et cette phase initiale rapide où $S(t)$ dépasse $S(0)$ (Fig. 3a) pourrait traduire la réoxydation de l'accepteur primaire Q . Ainsi des centres qui se trouvaient à la fin de la prééclairage ($t = 0$) sous la forme $S_3 Q^-$ seraient susceptibles de prendre la forme $S_3 Q$ et de participer ensuite à la désactivation.

Au cours de nos expériences en mode A, nous nous sommes intéressés aussi aux variations de l'état S_2 au cours de la désactivation suivant chaque type de prééclairage. La relation entre S_2 et la quantité d'oxygène dégagé par le second éclair dépend de paramètres (*cf. FORBUSH et al.*⁷) dont on ne connaît pas la valeur exacte; dans cette étude préliminaire, nous avons simplement assimilé la quantité d'oxygène du 2ème éclair à la mesure de l'état S_2 . La Fig. 7 présente la disparition de S_2 à l'obscurité chez des algues à effet Emerson élevé: la disparition totale de S_2 demande plus de deux minutes et l'effet de la nature de la prééclairage observée sur S_3 n'apparaît pas sur S_2 dont la désactivation semble plus rapide après la lumière I. Il est probable que les désactivations de S_2 et de S_3 suivent des mécanismes différents.

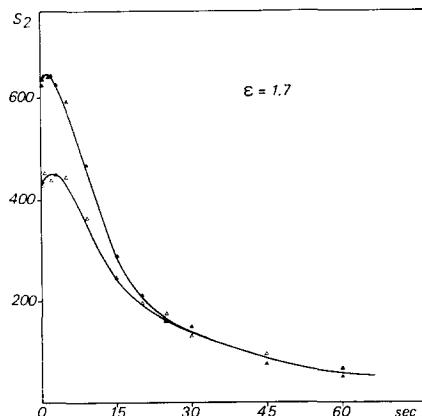


Fig. 7. Concentration de S_2 mesurée par le second éclair. Mode de détection A. En abscisse: temps d'obscurité séparant la fin de la prééclairage du déclenchement des éclairs (160 msec entre les 2 éclairs). Algues à effet Emerson élevé ($\epsilon = 1.7$). ▲, prééclairage à 710 nm; △, prééclairage à 650 nm.

Un paramètre que nous n'avons pas considéré précédemment intervient également dans la comparaison avec les travaux antérieurs déjà cités: la durée totale de l'éclair qui valait environ 1 msec chez LEMASSON⁶, 100 μ sec chez JOLIOT *et al.*² et, rappelons-le, 5 μ sec dans le cas présent. Alors qu'un éclair suffisamment court ne provoque qu'une seule réaction photochimique par centre et ne produit donc d'oxygène qu'à partir de l'état S_3 , un éclair plus long peut, par absorption successive de plusieurs photons par centre, provoquer un certain nombre de doubles réactions et produire de l'oxygène à partir d'autres états du donneur Z que l'état S_3 , en particulier à partir de S_2 . D'après l'évolution de S_2 pendant la désactivation on peut indiquer que l'utilisation d'un éclair trop long par LEMASSON⁶ fait ressortir davantage l'accélération de la désactivation produite par la prééclairage I et masque la différence que présente la phase initiale de la cinétique de désactivation de S_3 .

DISCUSSION

L'analyse des résultats que nous venons de présenter nous semble prouver que la désactivation n'est pas un processus simple, mais que la vitesse de désactivation est modulée par l'état d'oxydoréduction de la chaîne des transporteurs entre les deux photoréactions. La cinétique n'est jamais du premier ordre; cependant, dans les temps longs et surtout après la prééclairage I, la courbe $S(t, I)$ est voisine d'une exponentielle. FORBUSH *et al.*⁷ proposent pour la désactivation un modèle basé sur la combinaison d'une réaction du premier ordre et d'une réaction du second ordre, mais ce schéma ne s'adapte pas parfaitement aux résultats obtenus par ces auteurs.

Dans l'interprétation de la désactivation de l'état S_3 on peut envisager l'intervention de la réaction $S_4Q^- \rightarrow S_3Q$; toutefois comme la durée de vie de l'état S_4 est d'environ 1 msec l'importance quantitative de cette réaction apparaît négligeable.

Parmi les substrats possibles, on peut envisager l'intervention de Q^- et du pool A. Si on admet que Q^- peut être ce substrat, il est nécessaire de considérer la relation qu'il doit y avoir entre la désactivation et la durée de vie de Q^- . Il est généralement admis que l'essentiel des Q^- est réoxydé, après une prééclairage quelconque, dans un temps très court de l'ordre de quelques msec²⁰. Cependant des observations en fluorescence par LAVOREL²¹ et plus récemment par JOLIOT *et al.*⁸ montrent qu'une partie de Q^- n'est pas réoxydée rapidement par A et est responsable de la fluorescence détectée jusqu'à un temps voisin de la seconde. Cette fraction de Q^- se réoxyderait par une réaction inverse avec l'oxydant primaire Z comme l'indiquent les mesures en présence de 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurea (DCMU) faites par BENNOUN²². Les résultats de MALKIN²³ s'interprètent en considérant qu'à l'obscurité les relations entre Q et A sont interrompues, ce qui assurerait le maintien de Q à l'état oxydé quel que soit l'état du pool A. La durée de vie de Q^- n'étant pas supérieure à une seconde, Q^- ne peut pas intervenir dans la désactivation, sauf dans sa phase initiale et principalement après la lumière II.

Le pool A apparaît comme le substrat le plus probable de la désactivation; sa proximité du centre photochimique du Système II et sa réoxydation lente¹¹ sont en faveur de cette hypothèse. Une prééclairage de type Système II maintient A partiellement réduit et sa réoxydation par S_3 traduirait l'accélération de la désactivation que l'on observe alors chez les algues comme chez les chloroplastes. Une lumière de type Système I favorise le maintien de A à l'état oxydé et la désactivation se ferait par un autre réducteur excédentaire (placé en aval de la photoréaction I ou indépendant de la chaîne des transporteurs) qui donnerait à la désactivation une allure presque exponentielle. On rejoint donc ici le schéma proposé par FORBUSH *et al.*⁷.

Plusieurs auteurs^{16, 20, 21} ont observé une décroissance lente à l'obscurité du rendement de fluorescence dont nous pensons qu'elle peut être rattachée à la désactivation. La signification de cette fluorescence demeure confuse, elle n'est pas associée à Q^- dont la durée de vie ne dépasse pas 1 sec. Chez les chloroplastes, HEATH²⁴ décompose le déclin de fluorescence suivant une illumination actinique en trois composants exponentiels dont les $t_{1/2}$ sont 0.8, 5 et 30 sec à 12°; il interprète la partie la plus lente de cette cinétique comme associée au côté oxydant du Photosystème II, ce qui est en faveur d'une relation avec la désactivation. Les oscillations du rendement de fluorescence après une séquence d'éclairs observées récemment par JOLIOT *et al.*⁸ montrent aussi une dépendance de la fluorescence vis-à-vis des états du donneur Z.

Des mesures plus précises et plus complètes de la fluorescence dans les temps longs permettraient de rechercher si un mécanisme la relie à la désactivation.

Parmi nos résultats, deux points particuliers retiendront notre attention. Le comportement différent de S_3 et de S_2 au cours de la désactivation après chaque pré-illumination pourrait indiquer une hétérogénéité de structure des centres du Système II. L'accélération transitoire de la désactivation après 710 nm bien visible sur les algues sans effet Emerson, reste totalement inexpliquée.

Les phénomènes lents induits par des illuminations Système I ou Système II observés en oxygène ou en fluorescence (effet Bonaventura) n'ont pas reçu une explication satisfaisante. Comme BONAVENTURA ET MYERS¹⁷, MURATA²⁵ interprète ses observations en fluorescence comme une modification du transfert de l'excitation entre les deux photosystèmes qui se traduirait par un déplacement du niveau d'oxydoréduction des transporteurs entre les deux photoréactions. Notre observation sur les algues sans effet Emerson traduit bien un tel changement vers l'oxydation sous l'action d'une lumière II. Les résultats récents de VREDENBERG¹⁹ l'amènent à rapprocher ces effets, de changements lents dans le potentiel de membrane associés au transport d'ions. Il n'est pas impossible qu'un tel mécanisme intervienne également au cours de la désactivation, la réaction pouvant exiger le déplacement de charges positives et négatives les unes vers les autres.

RÉSUMÉ

Les expériences de désactivation ont été effectuées sur des algues (*Chlorella pyrenoidosa*) ou sur des chloroplastes isolés d'Epinard. Les mesures concernent la disparition à l'obscurité du troisième état oxydé du donneur d'électrons du Système II: la forme S_3 selon le schéma proposé par B. KOK, B. FORBUSH ET M. MC GLOIN (*Photochem. Photobiol.*, 11 (1970) 457). La désactivation est suivie après une pré-illumination continue de différentes longueurs d'onde (lumière I = 710 nm; lumière II = 650 ou 480 nm). Des résultats différents sont obtenus avec les algues dans l'état 1 ou dans l'état 2 suivant la définition donnée par C. BONAVENTURE ET J. MYERS (*Biochim. Biophys. Acta*, 189 (1969) 366). Dans l'état 1 la désactivation de S_3 est plus rapide après la lumière II qu'après la lumière I: dans l'état 2, sauf au début de la cinétique la désactivation de S_3 est assez semblable après les deux types de préillumination. Dans le cas des chloroplastes la désactivation est plus lente, mais la disparition de S_3 est toujours plus rapide après la lumière II qu'après la lumière I, aucune transition entre l'état 1 et l'état 2 n'a été observée. Les résultats sont discutés en recherchant les substrats réducteurs nécessaires à la réaction de disparition des charges positives accumulées au cours de l'illumination.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 P. JOLIOT, *Photochem. Photobiol.*, 8 (1968) 451.
- 2 P. JOLIOT, G. BARBIERI ET R. CHABAUD, *Photochem. Photobiol.*, 10 (1969) 309.
- 3 B. KOK, B. FORBUSH ET M. McGLOIN, *Photochem. Photobiol.*, 11 (1970) 457.
- 4 F. ALLEN ET J. FRANCK, *Arch. Biochem. Biophys.*, 58 (1955) 124.
- 5 G. GINGRAS ET C. LEMASSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 109 (1965) 67.
- 6 C. LEMASSON, *C.R. Acad. Sci. Paris*, 270 (1970) 350.
- 7 B. FORBUSH, B. KOK ET M. McGLOIN, communication présentée à *Int. Conf. on the Photosynthetic Unit*, Gatlinburg, Tenn., 1970.

- 8 P. JOLIOT, A. JOLIOT, B. BOUGES ET G. BARBIERI, communication présentée à *Intern. Conf. on the Photosynthetic Unit, Gatlinburg, Tenn., 1970.*
- 9 M. AVRON, *Anal. Biochem.*, 2 (1961) 535.
- 10 A. R. WASSERMAN ET S. FLEISCHER, *Biochim. Biophys. Acta*, 153 (1968) 154.
- 11 P. JOLIOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 102 (1965) 116.
- 12 P. JOLIOT ET A. JOLIOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 153 (1968) 625.
- 13 R. HILL ET F. BENDALL, *Nature*, 186 (1960) 136.
- 14 L. N. M. DUYSENS ET J. AMESZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 64 (1962) 243.
- 15 L. N. M. DUYSENS ET H. E. SWEERS, dans H. TAMIYA, *Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria*, University of Tokyo Press, Tokyo, 1963, p. 353.
- 16 P. JOLIOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 102 (1965) 135.
- 17 C. BONAVENTURA ET J. MYERS, *Biochim. Biophys. Acta*, 189 (1969) 366.
- 18 M. J. DELRIEU ET Y. DE KOUCHKOVSKY, *Biochim. Biophys. Acta*, 226 (1971) 409.
- 19 M. J. VREDENBERG, *Biochim. Biophys. Acta*, 223 (1970) 230.
- 20 B. FORBUSH ET B. KOK, *Biochim. Biophys. Acta*, 162 (1968) 243.
- 21 J. LAVOREL, dans J. B. THOMAS ET J. C. GOEDHEER, *Currents in Photosynthesis*, Donker, Rotterdam, 1966, p. 39.
- 22 P. BENNOUN, *Biochim. Biophys. Acta*, 216 (1970) 357.
- 23 S. MALKIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 234 (1971) 415.
- 24 R. L. HEATH, *Biophys. J.*, 10 (1970) 1173.
- 25 N. MURATA, *Biochim. Biophys. Acta*, 205 (1970) 379.

Biochim. Biophys. Acta, 245 (1971) 386-397