

BBA 46395

ÉTUDE DES ÉCHANGES DE CO₂ DES CELLULES ENTIÈRES ET DES
 ACTIVITÉS PHOTOCHIMIQUES DES FRAGMENTS DE CHLOROPLASTES
 DE TROIS MUTANTS NON PHOTOSYNTHÉTIQUES DE *CHLAMYDOMONAS*
*REINHARDTI**

JACQUES GARNIER ET JEANNINE MAROC

Laboratoire de Photosynthèse, C.N.R.S., 91190-Gif-sur-Yvette (France)

(Reçu le 24 mai, 1972)

SUMMARY

Studies of the CO₂ exchanges of whole cells and of the photochemical activities of chloroplast fragments, with three non-photosynthetic mutants of Chlamydomonas reinhardtii

Investigations were performed in order to determine the different kinds of electron transport, which are carried out by three non-photosynthetic mutants (*Fl 5*, *Fl 9*, *Fl 15*) of *Chlamydomonas reinhardtii*. These mutants had been previously selected for their fluorescence and O₂ evolution anomalies, which indicate a blocking of the internal electron transport chain close to Photoreaction II.

Aerobic and anaerobic (with H₂ or N₂) CO₂ exchanges of whole cells were measured with a pCO₂ electrode. Photochemical activities of chloroplast fragments with various exogenous electron carriers were measured spectrophotometrically.

The three mutants were unable to fix CO₂ in the light, in air and in the presence of H₂ with 3-*p*-chlorophenyl-1,1-dimethylurea (CMU) only; in addition, they could not perform photoreduction of NADP⁺ with water. However, *Fl 9* and *Fl 15* were able to carry out photoreduction of NADP⁺ with 2,6-dichlorophenolindophenol (DCIP)-ascorbate, photooxidation of exogenous cytochrome *c*, and CO₂ fixation in the light in the presence of H₂, CMU and phenazine methosulfate. *Fl 5* did not perform any of these reactions.

With DCIP and plastocyanin the Hill activities of the three mutants were very weak, compared to those of the wild type; with K₃Fe(CN)₆, the activities were relatively more important, particularly for *Fl 5*.

These results indicate a non-functioning of System I in *Fl 5*, on the one hand, and a blocking of the electron transport chain between the two photoreactions (both of which are functional) in *Fl 9* and in *Fl 15*, on the other. An interpretation is attempted, taking into consideration the analytical results obtained elsewhere (lack of P700 for *Fl 5*, deficiencies in bound cytochromes *c*-553 and *b*-563 for *Fl 9* and *Fl 15*). Some points, concerning the nature of the defect(s) in each mutant, the

Abréviations: CMU, 3-*p*-chlorophényl-1,1-diméthylurée; DCIP, 2,6-dichlorophénol indo-phénol; PMS, phénazine méthosulfate; P700, chlorophylle *a* holochrome, pigment effecteur de la Photoréaction I.

* Une partie des résultats présentés ici a fait l'objet d'une courte communication au II International Congress on Photosynthesis Research, Stresa, 1971.

reaction sites of the various cytochromes, and the possibility of different pathways for the photosynthetic electron transports, *in vivo* and *in vitro*, are discussed.

INTRODUCTION

L'étude comparative de divers mutants non photosynthétiques d'algues vertes unicellulaires est un moyen d'investigation fructueux fréquemment utilisé pour l'analyse du mécanisme de la photosynthèse. En particulier, l'examen des propriétés de différents mutants de *Chlamydomonas* et de *Scenedesmus* a déjà permis d'apporter de nombreux renseignements sur la chaîne de transporteurs d'électrons liée aux réactions photochimiques et sur son fonctionnement (voir revues¹⁻³). En effet, si l'intervention dans la photosynthèse de différents transporteurs, dont plusieurs cytochromes, est établie, le rôle exact et le site d'action précis de beaucoup d'entre eux ne sont pas encore bien élucidés (voir revue⁴).

Trois mutants non photosynthétiques de *Chlamydomonas reinhardtii* (souches *Fl 5*, *Fl 9* et *Fl 15*) ont été précédemment isolés dans notre laboratoire et ont été sélectionnés en raison du niveau élevé de la fluorescence de leurs colonies^{5,6}. Les études physiologiques effectuées antérieurement ont permis de mettre en évidence, pour chacun des mutants, les principales anomalies suivantes: (1) absence de jet d' O_2 à l'illumination, absence de dégagement d' O_2 en conditions de photosynthèse normale, mais faible réaction de Hill en présence de *p*-benzoquinone; (2) variation photoinduite d'absorption à 519 nm de faible amplitude, qui décroît ensuite très lentement à l'obscurité; (3) niveau élevé de la fluorescence en phase stationnaire. Ces anomalies ont été interprétées comme témoignant d'un blocage du transport d'électrons entre les deux réactions photochimiques, à un niveau proche de la Photoréaction II^{5,7}. Par ailleurs, des recherches biochimiques et spectrophotométriques ont montré que chacun des mutants possède les transporteurs d'électrons suivants: plastoquinone A, cytochrome *c*-553 soluble, plastocyanine, ferrédoxine, ferrédoxine-NADP⁺-réductase et cytochrome *b*-559. Mais les mutants *Fl 9* et *Fl 15* sont pratiquement dépourvus de la forme insoluble, liée, du cytochrome *c*-553, qui est présente chez *Fl 5* et chez la souche sauvage⁸. Enfin, les résultats de récentes analyses spectrophotométriques de particules chloroplastiques, obtenues à l'aide de détergent, indiquent que, d'une part, les mutants *Fl 9* et *Fl 15* sont déficients en cytochrome *b*-563*, et que, d'autre part, la souche *Fl 5* ne possède pas l'holochrome chlorophyllien P700*.

Le but du présent travail est de compléter l'étude des transports photosynthétiques d'électrons chez chacun des mutants, en examinant en particulier deux points qui n'avaient pas été abordés au cours des recherches précédentes: la fixation de CO_2 et le fonctionnement de la Photoréaction I. C'est pourquoi deux types d'expériences ont été effectuées avec chacune des souches: d'une part, l'étude des échanges de CO_2 réalisés à la lumière par des algues entières, soit en aérobiose (photosynthèse normale), soit en anaérobiose après adaptation à l' H_2 (photoréduction), et, d'autre part, la mesure de différentes activités photochimiques avec des fragments de chloroplastes placés, *in vitro*, en présence de divers transporteurs d'électrons exogènes. Les résultats mettent en évidence une absence totale d'activité de type Système I chez

* J. Maroc et J. Garnier, résultats non publiés.

Fl 5 et confirment l'existence d'un blocage du transport d'électrons entre les deux photoréactions chez *Fl 9* et chez *Fl 15*; ils sont discutés en fonction des renseignements d'ordre analytique, obtenus par ailleurs pour ces mutants. Quelques hypothèses concernant différentes voies possibles pour les transferts d'électrons, *in vivo* et *in vitro*, sont proposées.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Organismes, conditions de culture, dosage des chlorophylles

Les trois mutants *Fl 5*, *Fl 9* et *Fl 15*, isolés au laboratoire, et la souche sauvage de *C. reinhardtii*, qui font l'objet de ces recherches, ont déjà été décrits précédemment^{6,8}.

Les algues sont cultivées en conditions axéniques sur un milieu contenant de l'acétate (milieu Tris-acétate-phosphate¹⁰), à 25 °C, à la lumière (éclairement faible d'environ 800 lux), les suspensions étant continuellement agitées et aérées. Elles sont récoltées lorsque les cultures parviennent à la fin de la phase de croissance exponentielle.

Dans le cas des algues entières comme dans celui des fragments de chloroplastes, les chlorophylles sont extraites par l'acétone à 80 % dans l'eau et dosées spectro-photométriquement selon MacKinney¹¹ et Arnon¹².

Mesure des échanges de CO₂ d'algues entières

Les mesures d'échanges de CO₂ sont réalisées au moyen d'une électrode à CO₂ (Beckman), qui est adaptée sur un montage construit au laboratoire (voir schéma, Fig. 1). La cuve de mesure est constituée d'un tube (1) en polyméthacrylate transparent muni d'une ramifications latérale (2), dans laquelle est placée l'électrode (7); ce tube

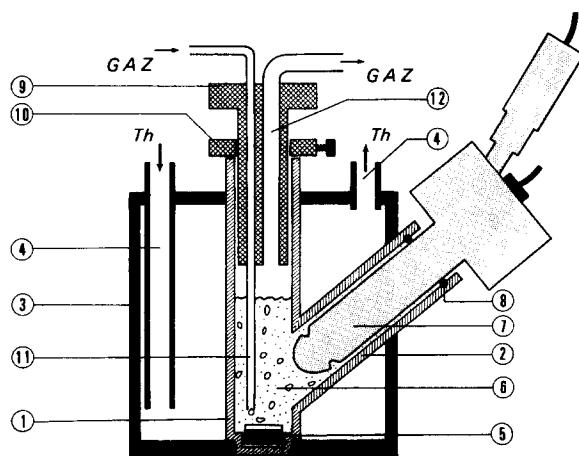


Fig. 1. Schéma de la cuve utilisée pour la mesure des échanges de CO₂. 1 et 2, tube en polyméthacrylate transparent; 3, boîtier en polyvinyle noir; 4, tuyaux d'arrivée et de sortie d'eau thermorégularisée (Th); 5, toupee magnétique d'agitation; 6, suspension d'algues; 7, électrode à CO₂ Beckman; 8, joint torique d'étanchéité; 9, bouchon en polytétrafluoroéthylène; 10, bague de blocage du bouchon; 11, tuyau d'arrivée de gaz, coulissant dans le bouchon; 12, tuyau de sortie de gaz. L'éclairage de la suspension d'algues est assuré par deux faisceaux lumineux perpendiculaires au plan du schéma.

est entouré d'un boîtier en chlorure de polyvinyle noir (3), à l'intérieur duquel une circulation d'eau thermorégularisée est entretenue; deux fenêtres en verre, placées sur les côtés du boîtier, permettent l'éclairage des algues.

La cuve de mesure reçoit un volume utile de 5 ml de suspension d'algues; celle-ci est agitée au moyen d'une toupie en polyméthacrylate (5) entraînée magnétiquement. A sa partie supérieure, le tube 1 est fermé par un bouchon (9), dont la position est réglée au moyen d'une bague (10). Ce bouchon est traversé par un tuyau d'arrivée de gaz (11), coulissant et de faible diamètre, et par un tuyau de sortie de gaz (12), fixe et de plus gros diamètre: en position de barbotage, le tuyau 11 est enfoncé au fond du tube 1 et le bouchon est maintenu en position haute; pour les mesures, le tuyau 11 est remonté dans le bouchon et celui-ci est enfoncé jusqu'au contact avec la suspension. Grâce à ce dispositif, il est possible: d'une part, de laisser l'électrode en place (et de faire des mesures, éventuellement) pendant le barbotage gazeux et, d'autre part, d'interrompre ce dernier et de fermer le tube 1 en cours d'expérience, sans risque d'introduction d'air ambiant.

Le boîtier contenant la cuve de mesure est posé sur un agitateur magnétique, entre deux lampes de microscope (6 V, 5 A) équipées de filtres anticaloriques (filtres Balzers "calflex, B₁K₁"). L'intensité lumineuse peut être réglée par modification du voltage d'alimentation des lampes ou par adjonction de filtres neutres. Les tuyaux d'arrivée et de sortie de gaz, reliés à la cuve de mesure, sont montés en dérivation d'une canalisation principale: durant les mesures, le barbotage dans la cuve est interrompu, mais une circulation de gaz est entretenue dans le tuyau principal; ce qui permet d'éliminer les risques de pénétration d'air ambiant dans la cuve, sans obturer le tuyau de sortie de celle-ci qui peut ainsi jouer le rôle de trop-plein, le cas échéant.

L'électrode à CO₂ est raccordée à un amplificateur ("physiological gaz analyzer", Beckman), qui est lui-même relié à un enregistreur potentiométrique (W + W electronic). L'ensemble est étalonné à l'aide de mélanges gazeux renfermant différentes quantités de CO₂ et un abaque, permettant de déterminer facilement les concentrations en CO₂ dissous, à partir des enregistrements potentiométriques, est tracé. Pour la réalisation des mélanges gazeux de compositions définies, les débits sont mesurés à l'aide de débitmètres à flotteurs (Houdec) et ils sont ajustés au moyen de manodétendeurs à double détente.

Pour les mesures, les algues sont mises en suspension dans un milieu minéral de pH 4,9 (milieu minimum¹³, dans lequel le tampon phosphate est remplacé par une solution de KH₂PO₄ de même concentration finale 6,5 · 10⁻³ M). Ce pH est suffisamment bas pour empêcher la formation de bicarbonate à partir du CO₂ dissous; ce qui perturberait le dosage de ce dernier. La suspension d'algues est ensuite placée, à l'obscurité, à 25 °C, dans la cuve de mesure où elle est agitée et soumise à un barbotage d'air, d'N₂ ou d'H₂, selon les lots, pendant trente minutes; cette durée est suffisante pour permettre l'adaptation des algues, dans le cas de l'anaérobiose en présence d'H₂. A la fin de cette période d'adaptation, du CO₂ (3 % en vol.) est ajouté au gaz que l'on fait barboter et, le cas échéant, du 3-p-chlorophényl-1,1-diméthylurée (CMU) ou du CMU et du phénazine méthosulfate (PMS) sont introduits dans la cuve. Lorsque la concentration en CO₂ du milieu a atteint l'équilibre avec celle du mélange gazeux, le barbotage est interrompu et le bouchon de la cuve est enfoncé. Les mesures d'échanges de CO₂ sont alors effectuées, les algues étant soumises successivement à

des périodes d'obscurité et de lumière. Le temps de réponse de l'électrode étant relativement long (2 à 3 min), ces périodes sont généralement d'au moins 10 min. Pour le calcul des vitesses d'absorption photosynthétique de CO₂, les valeurs mesurées à la lumière sont corrigées de celles obtenues à l'obscurité (respiration dans les cas d'aérobiose, éventuellement légère dérive dans les autres cas).

Mesure des activités photochimiques de fragments de chloroplastes

Pour la préparation des fragments de chloroplastes, un culot humide d'algues centrifugées est broyé doucement avec du sable, dans un mortier, à 4 °C. Le broyat est ensuite repris dans du tampon phosphate 0.01 M, pH 7.5; il est centrifugé à 480 × g pendant 6 min, pour éliminer les débris cellulaires, puis à 20000 × g pendant 15 min. Le culot final, qui contient les fragments de chloroplastes, est mis en suspension dans du tampon phosphate; sa teneur en chlorophylles *a* + *b* est déterminée.

Les différentes activités de photoréduction de transporteurs d'électrons exogènes sont mesurées spectrophotométriquement à 600 nm (2,6-dichlorophénol indo-phénol (DCIP)), à 597 nm (plastocyanine), à 420 nm (K₃Fe(CN)₆) et à 340 nm (NADP⁺), en utilisant la méthode de Levine et Smillie¹⁴. La lumière actinique est fournie par la source infrarouge du spectrophotomètre¹⁵, l'éclairement utile étant de l'ordre de 1 · 10⁶ ergs · cm⁻² · s⁻¹. Dans le cas des réactions de photoréduction de NADP⁺, il est nécessaire d'ajouter aux mélanges réactionnels de la plastocyanine, de la ferrédoxine et de la ferrédoxine-NADP⁺-réductase en excès, afin de compenser les pertes en ces transporteurs endogènes solubles, qui se produisent au cours de la préparation des fragments de chloroplastes.

Les mesures des activités de photooxydation de cytochrome *c* réduit sont réalisées selon la méthode de Plesničar et Bendall¹⁶, les fragments de chloroplastes étant placés en présence de digitonine et des transporteurs d'électrons suivants: cytochrome *c* de cœur de cheval (Calbiochem) réduit, benzylviologène (Mann Research Laboratories) et plastocyanine. Une lampe de projecteur, qui est installée sur le côté du compartiment du spectrophotomètre et devant laquelle sont placés un filtre anticalorique (filtre Balzers "calflex, B₁K₁") et un filtre coloré (filtre Corning CS 2-59) ne laissant passer que les radiations de longueurs d'onde supérieures à 620 nm, permet d'envoyer sur la cuve de mesure un éclairement actinique rouge de 4 · 10⁵ ergs · cm⁻² · s⁻¹. L'oxydation du cytochrome *c* est suivie par mesure de la densité optique à 551 nm, un filtre interférentiel à bande passante étroite (filtre M.T.O. 22-41) étant placé à la sortie du compartiment de mesure du spectrophotomètre, pour empêcher la lumière actinique rouge d'atteindre le photomultiplicateur.

La ferrédoxine, la ferrédoxine-NADP⁺-réductase et la plastocyanine, utilisées pour les diverses réactions, sont extraites de feuilles d'épinard. Elles sont préparées et purifiées par chromatographie sur DEAE-cellulose, selon Böger *et al.*¹⁷ et Nelson et Neumann¹⁸ pour la ferrédoxine, selon Shin *et al.*¹⁹ pour la ferrédoxine-NADP⁺-réductase, selon Katoh *et al.*²⁰ pour la plastocyanine. Les différents coefficients d'extinction utilisés pour les mesures sont les suivants: pour le DCIP: 19.6 cm² · μmole⁻¹ à 600 nm²¹; pour la plastocyanine: 9.8 cm² · μmole⁻¹ à 597 nm²²; pour le K₃Fe(CN)₆: 0.97 cm² · μmole⁻¹ à 420 nm²¹; pour le NADPH: 6.22 cm² · μmole⁻¹ à 340 nm²³; pour le cytochrome *c*: 21.1 cm² · μmole⁻¹ à 550 nm²⁴. Toutes les mesures d'absorbance sont réalisées au moyen d'un spectrophotomètre enregistreur Cary 14.

RÉSULTATS

Fixation de CO₂ par les algues entières

Les courbes de la Fig. 2 illustrent les variations de la vitesse de fixation de CO₂, en fonction de l'éclairement et de la composition de l'atmosphère, pour la souche sauvage. On voit qu'en présence d'N₂ + CO₂, l'activité photosynthétique est environ deux fois plus faible qu'en aérobiose, quel que soit l'éclairement. Cet effet inhibiteur de l'anaérobiose sur la photosynthèse d'algues vertes a déjà été observé et décrit, depuis longtemps, par divers auteurs^{25, 26}. Plus récemment, Urbach et Fork²⁷ ont montré, au moyen de mesures de variations d'absorption photoinduites *in vivo* à différentes longueurs d'onde, que l'absence d'O₂ peut inhiber certains transports photosynthétiques d'électrons chez *Chlorella*. On constate aussi que, dans le cas de la photoréduction en présence d'H₂ et de CMU, la saturation lumineuse est pratiquement atteinte à tous les éclairements employés et que, pour les plus forts d'entre ceux-ci, la vitesse de fixation de CO₂ est beaucoup plus faible que dans le cas de la photosynthèse, même quand cette dernière est réalisée en anaérobiose en présence d'N₂.

Différentes séries de mesures ont également été effectuées avec les mutants *Fl 5*, *Fl 9* et *Fl 15*, à divers éclairements, en présence de différents mélanges gazeux, avec ou sans addition de CMU ou de CMU + PMS. Les résultats des mesures correspondant à l'éclairement de $1.2 \cdot 10^6$ ergs · cm⁻² · s⁻¹, ainsi qu'à celui de $7.6 \cdot 10^5$ ergs · cm⁻² · s⁻¹ dans le cas de la photoréduction en présence de PMS, sont rassemblés dans le Tableau I. Par ailleurs, la Fig. 3 montre un exemple d'enregistrements obtenus avec les souches *Fl 9* et sauvage placées en atmosphère d'H₂. Il apparaît très nettement que, contrairement à la souche sauvage, aucun des mutants n'est capable de fixer le CO₂ ni en conditions de photosynthèse ni en atmosphère d'H₂ en présence de CMU seul. Mais, dans ces dernières conditions de photoréduction, l'addition de PMS provoque chez *Fl 9* et chez *Fl 15* une photoabsorption de CO₂, quantitativement comparable à celle de la souche sauvage ou légèrement plus importante. Il semble

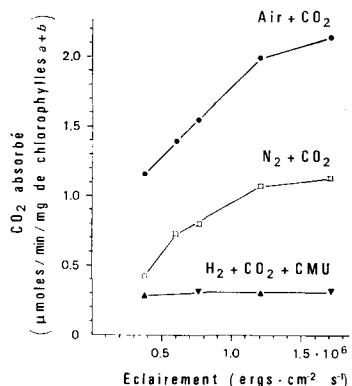


Fig. 2. Variations, en fonction de l'éclairement, des vitesses de fixation de CO₂ par des cellules de la souche sauvage de *C. reinhardtii*, en aérobiose, en atmosphère d'N₂ et en atmosphère d'H₂. Algues en suspension dans un milieu minéral de pH 4.9, à une concentration correspondant à 80 µg de chlorophylles a + b/ml; 25 °C; lumière blanche; dans le cas de H₂ + CO₂ + CMU: CMU 1 · 10⁻⁴ M. Adaptation aux différents gaz à l'obscurité: 30 min avant le début des mesures, 3 % de CO₂ (en vol.). Dans le cas de l'aérobiose, les valeurs sont corrigées de celles correspondant à la respiration à l'obscurité.

TABLEAU I

FIXATION DE CO_2 A LA LUMIÈRE PAR DES CELLULES ENTIÈRES DE LA SOUCHE SAUVAGE ET DES MUTANTS *Fl 5*, *Fl 9*, *Fl 15* DE *C. reinhardtii*, EN AÉROBIOSE, EN ATMOSPHÈRE D' N_2 ET EN ATMOSPHERE D' H_2

Fixation de CO_2 : résultats exprimés en $\mu\text{moles de CO}_2$ absorbé/min par mg de chlorophylles *a+b*. Algues en suspension dans un milieu minéral de pH 4.9, à une concentration correspondant à 80 μg de chlorophylles *a+b*/ml, à 25 °C. Adaptation aux différents gaz à l'obscurité: 30 min avant le début des mesures, 3% de CO_2 (en vol.). Concentrations finales des substances ajoutées: CMU $1 \cdot 10^{-4}$ M, PMS $1 \cdot 10^{-5}$ M. Lumière blanche: $1.2 \cdot 10^6$ ergs $\cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, excepté pour la dernière ligne. Les valeurs relatives aux conditions d'aérobiose sont corrigées de celles correspondant à la respiration à l'obscurité.

Gaz	Additions	Fixation de CO_2			
		Souche sauvage	Mutants		
			<i>Fl 5</i>	<i>Fl 9</i>	<i>Fl 15</i>
Air + CO_2	Néant	1.99	0	0	0
	+ CMU	0	0	0	0
$\text{N}_2 + \text{CO}_2$	Néant	1.07	0	0	0
	+ CMU	0	0	0	0
	+ CMU + PMS	0	0	0	0
$\text{H}_2 + \text{CO}_2$	+ CMU	0.31	0	0	0
	+ CMU + PMS	0.33	0	0.41	0.42
	+ CMU + PMS*	0.32	0	0.28	0.33

* Eclairage de $7.6 \cdot 10^5$ ergs $\cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, autre série de mesures effectuées avec des récoltes d'algues différentes.

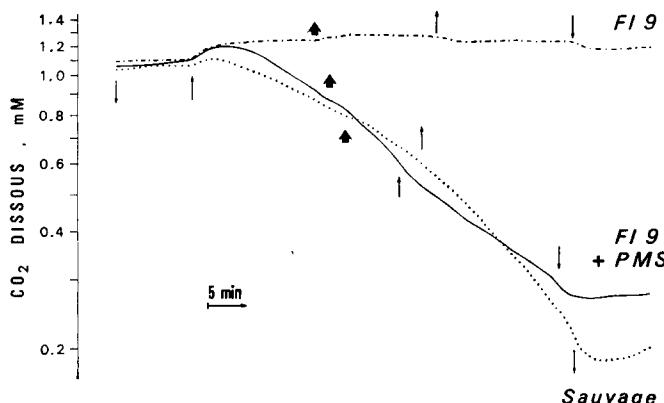


Fig. 3. Fixation de CO_2 en atmosphère d' H_2 , par des cellules de la souche sauvage et du mutant *Fl 9* de *C. reinhardtii*. Enregistrements potentiométriques obtenus au cours de mesures réalisées à l'aide d'une électrode à CO_2 (voir Méthodes et Figs 1, 2). Algues en suspension dans un milieu minéral de pH 4.9, additionné de CMU $1 \cdot 10^{-4}$ M, à une concentration correspondant à 80 μg de chlorophylles *a+b*/ml; 25 °C; dans le cas de *Fl 9 + PMS*: PMS $1 \cdot 10^{-5}$ M. Prétraitement avant le début des mesures: barbotage d' H_2 puis d' H_2 + 3% de CO_2 (en vol.), à l'obscurité, pendant 30 min. ↓: obscurité; ↑: lumière blanche (flèches en traits fins: éclairage de $1.2 \cdot 10^6$ ergs $\cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; flèches en traits épais: éclairage de $1.7 \cdot 10^6$ ergs $\cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). A titre indicatif: l'échelle d'ordonnée comprise entre 0.9 et 1 mM correspond à une différence de potentiel de 5 mV.

même qu'avec ces mutants, la saturation lumineuse ne soit atteinte qu'à des éclairements un peu plus forts que dans le cas de la souche sauvage. Ce fait est peut-être dû à une augmentation de la quantité d'énergie lumineuse perdue par diffusion; en effet, pour une même concentration en chlorophylles *a* + *b*, les suspensions de *Fl 9* et de *Fl 15* ont des densités cellulaires plus grandes que celles des suspensions de souche sauvage. Le mutant *Fl 5*, par contre, demeure incapable de fixer le CO₂, même en présence d'H₂ et de PMS.

Ces résultats ont été vérifiés qualitativement à plusieurs reprises, au cours de mesures effectuées avec des algues provenant de récoltes différentes, placées dans diverses conditions de concentration et d'éclairement. Ils peuvent être rapprochés des observations faites par Levine²⁸ avec des mutants de *C. reinhardtii*: *ac-206*, d'une part, qui est dépourvu de cytochrome *c-553* et chez lequel le PMS restaure une photoréduction en atmosphère d'H₂; *F-1*, d'autre part, qui est dépourvu de P700 et est incapable de toute fixation de CO₂.

Activités photochimiques des fragments de chloroplastes

Le Tableau II indique les différentes vitesses de réactions de Hill, de photoréduction de NADP⁺ et de photooxydation de cytochrome *c*, qui ont été mesurées

TABLEAU II

ACTIVITÉS PHOTOCHIMIQUES DES FRAGMENTS DE CHLOROPLASTES DE LA SOUCHE SAUVAGE ET DES MUTANTS *Fl 5*, *Fl 9*, *Fl 15* DE *C. reinhardtii*

Activités: μmoles de réactif photoréduit ou photooxydé/min par mg de chlorophylles *a* + *b*. Pour les réactions de Hill et les photoréductions de NADP⁺, les fragments de chloroplastes (10 µg de chlorophylles *a* + *b*/ml) sont mis en suspension dans le milieu: tampon phosphate 0.01 M, pH 7.5, KCl 0.02 M et MgCl₂ 2.5 · 10⁻³ M. De plus, sont ajoutés aux suspensions, selon les cas: (a) DCIP 4.7 · 10⁻⁵ M; (b) plastocyanine oxydée 1.2 · 10⁻⁵ M; (c) K₃Fe(CN)₆ 3.3 · 10⁻⁴ M; (d) NADP⁺ 2 · 10⁻⁴ M et un excès de plastocyanine, de ferrédoxine et de ferrédoxine-NADP⁺-réductase; (e) comme pour (d) avec en plus DCIP 4.7 · 10⁻⁵ M, ascorbate de sodium 6.5 · 10⁻³ M et CMU 1 · 10⁻⁵ M. Eclairage actinique: source infrarouge du spectrophotomètre, environ 1 · 10⁶ ergs · cm⁻² · s⁻¹. Pour la photooxydation de cytochrome *c* (f), les fragments de chloroplastes (5 µg de chlorophylles *a* + *b*/ml) sont mis en suspension dans le milieu réactionnel suivant: tampon phosphate 3.3 · 10⁻³ M, pH 7.5, MgCl₂ 3.3 · 10⁻⁴ M, NaCl 3.3 · 10⁻³ M, digitonine (0.13 mg/ml), KCN 1 · 10⁻³ M, CMU 1 · 10⁻⁵ M, benzylviologène 4.1 · 10⁻⁶ M, plastocyanine 4.7 · 10⁻⁷ M et cytochrome *c* de coeur de cheval réduit 2.7 · 10⁻⁵ M. Eclairage actinique: lampe de projecteur + filtre rouge ($\lambda > 620$ nm), 4 · 10⁵ ergs · cm⁻² · s⁻¹. Excepté pour (f), les valeurs sont des moyennes correspondant à deux séries de mesures, effectuées avec des récoltes d'algues différentes.

Réactions	Activités photochimiques		
	Souche sauvage	Mutants	
	<i>Fl 5</i>	<i>Fl 9</i>	<i>Fl 15</i>
<i>Réactions de Hill avec:</i>			
DCIP (a)	1.5	0.20	0.14
Plastocyanine (b)	2.3	0.18	0.06
K ₃ Fe(CN) ₆ (c)	5.8	4.1	2.6
<i>Photoréductions de NADP⁺ avec:</i>			
Eau (d)	2.4	0	0
DCIP + ascorbate (e)	2.3	0	0.75
<i>Photooxydation de cytochrome c (f)</i>			
	1.9	0	1.4
			1.7

avec des fragments de chloroplastes de la souche sauvage et des mutants *Fl 5*, *Fl 9*, *Fl 15*.

Les trois mutants ne présentent que des activités de Hill très faibles (moins de 17 % de celles de la souche sauvage), lorsque les accepteurs d'électrons sont le DCIP et la plastocyanine. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Gorman et Levine¹⁰ avec des fragments de chloroplastes des mutants de *C. reinhardtii* *ac-206* et *ac-208*, qui manquent respectivement de cytochrome *c*-553 ou de plastocyanine, et par Pratt et Bishop²⁹ et Bishop et Wong³⁰ avec des fragments de chloroplastes de plusieurs mutants de *Scenedesmus*, bloqués entre les deux réactions photochimiques ou au voisinage de la Photoréaction II.

Par contre, les mutants *Fl 5*, *Fl 9* et *Fl 15* sont capables de réduire le $K_3Fe(CN)_6$ à la lumière de façon non négligeable: leurs activités représentent environ 70 % (*Fl 5*), 45 % (*Fl 9*) et 34 % (*Fl 15*) de celle de la souche sauvage. De semblables activités de photoréduction du $K_3Fe(CN)_6$, relativement élevées mais moins importantes que celles des souches sauvages, ont déjà été observées avec des mutants apparemment dépourvus d'activité de type Système I: mutant *ac-80 a* de *C. reinhardtii*^{31,32}, mutant 8 de *Scenedesmus*²⁹. Cependant, il faut noter que, dans le cas de ces dernières souches, les activités de photoréduction de DCIP sont comparativement moins faibles, que dans le cas des mutants *Fl 5*, *Fl 9* et *Fl 15*.

Les trois mutants sont incapables de réduire le NADP⁺ avec l'eau comme donneur d'électrons. Mais, si les électrons sont fournis par le couple DCIP-ascorbate, les fragments de chloroplastes de *Fl 9* et de *Fl 15* effectuent alors une photoréduction de NADP⁺ appréciable. On peut même préciser que de très faibles activités de photoréduction de NADP⁺ avec DCIP-ascorbate ont été observées avec des fragments de chloroplastes de *Fl 9* et de *Fl 15*, au cours de quelques essais pour lesquels aucune plastocyanine exogène n'avait été ajoutée aux milieux réactionnels. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus avec différents mutants de *Scenedesmus* (11, 26, 40, 50, a')²⁹ et de *C. reinhardtii* (*ac-115*, *ac-141*, *ac-21*, *ac-206*)^{10,33}, bloqués soit au niveau de la Photoréaction II, soit à celui de transporteurs d'électrons qui interviennent entre les deux réactions photochimiques. En outre, les fragments de chloroplastes des mêmes deux mutants *Fl 9* et *Fl 15* sont capables, comme ceux de la souche sauvage, de réaliser la photooxydation de cytochrome *c* exogène, en présence de digitonine, de plastocyanine et de benzylviologène. Cette réaction constitue un test d'activité du Système I³⁴.

Au contraire, les fragments de chloroplastes du mutant *Fl 5* ne sont capables d'effectuer ni photooxydation de cytochrome *c* exogène ni photoréduction de NADP⁺, même en présence de DCIP-ascorbate. Une inactivité comparable a été observée avec les mutants *ac-80 a* de *C. reinhardtii*³¹ et 8 de *Scenedesmus*²⁹, qui sont dépourvus d'activité de type Système I et ne présentent pas certaines variations photoinduites d'absorption caractéristiques de l'holochrome P700.

DISCUSSION

Les résultats présentés ici, relatifs aux échanges de CO₂ de cellules entières et aux activités photochimiques de fragments de chloroplastes, confirment et complètent ceux qui ont été obtenus précédemment au moyen de mesures d'échanges d'O₂, de rendements de fluorescence et de variations photoinduites d'absorption à

519 nm, avec des algues entières^{5,6,7,35}. Le schéma de la Fig. 4 indique comment on peut interpréter, en ce qui concerne le mécanisme de la photosynthèse, l'ensemble des renseignements recueillis jusqu'à présent pour chacune des souches.

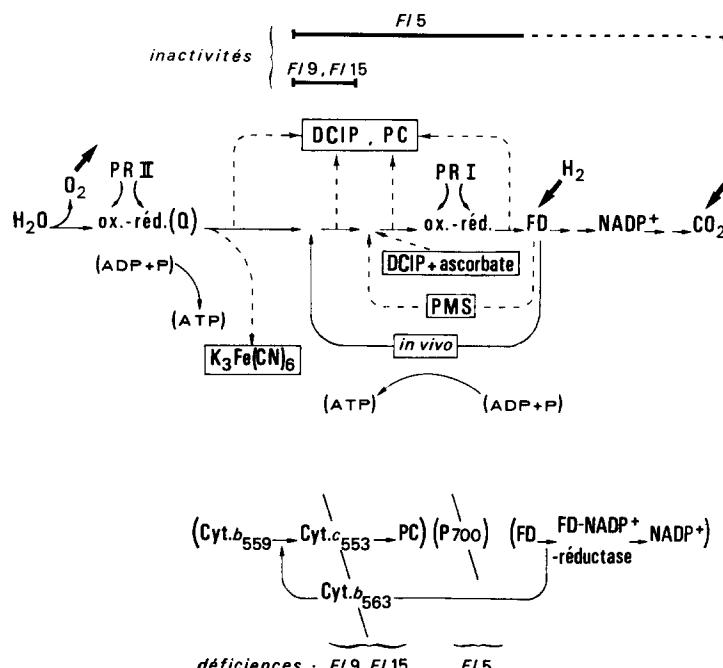


Fig. 4. Schéma simplifié de la photosynthèse. Au centre, schéma représentant l'intervention en série de deux réactions photochimiques et les divers transports d'électrons qui leur sont liés. Les flèches en traits pleins indiquent des transferts d'électrons probables *in vivo* ou, pour O₂, H₂ et CO₂, des échanges gazeux. Les flèches en traits discontinus représentent différentes voies possibles pour les transferts d'électrons *in vitro*. Un seul site a été représenté pour la photoréduction du K₃Fe(CN)₆; les autres sites possibles, vraisemblablement moins importants, sont analogues à ceux indiqués pour le DCIP et la PC. Dans la partie supérieure, les segments de droite indiquent les fractions de la chaîne de transport d'électrons, qui apparaissent non fonctionnelles chez les mutants. Dans la partie inférieure, entre parenthèses: séquence d'intervention probable des différents transporteurs d'électrons mis en évidence chez *C. reinhardtii* (les traits obliques et les accolades indiquent les déficiences, qui ont été constatées pour les mutants *F*/5, *F*/9 et *F*/15). Abréviations: PR, photoréaction; ox., oxydant; réd., réducteur; Q, premier accepteur d'électrons de la photoréaction II (dont la réduction se traduit par un accroissement de la fluorescence chlorophyllienne); Cyt., cytochrome; PC, plastocyanine; FD, ferrédoxine.

Les activités de Hill non nulles qui ont été observées, notamment avec le K₃Fe(CN)₆, ainsi que l'émission d'une fluorescence variable au début de l'illumination, qui avait été constatée antérieurement^{5,7}, indiquent que la Photoréaction II fonctionne chez chacun des mutants *F*/5, *F*/9 et *F*/15. Mais les faibles activités de Hill présentées par ces trois mutants, avec le DCIP et la plastocyanine, d'une part, ainsi que leur incapacité d'effectuer la photoréduction de NADP⁺ avec l'eau et de fixer le CO₂ à la lumière en aérobiose, d'autre part, confirment que, chez eux, les transports d'électrons sont bloqués après la Photoréaction II. Il semble, en outre, que le blocage (ou l'un des blocages) ait lieu à un niveau proche du Système II, probablement entre le premier accepteur d'électrons de la Photoréaction II (Q) et le (ou les) transporteur(s)

qui reçoivent les électrons provenant de Q réduit (transporteurs souvent désignés "substances A'"^{5,7,8} et identifiés, par certains auteurs³⁶, avec des plastoquinones). En effet, les trois mutants n'émettent pas de jet d'O₂ à l'illumination^{5,7}. De plus, des mesures de cinétiques de variations de fluorescence, réalisées par de Kouchkovsky^{7,35}, ont montré que, dans le cas de chacun des mutants, durant la période d'induction: (1) la phase de montée (O-P) est plus simple et plus lente que dans le cas de la souche sauvage et (2) on n'observe pas, ensuite, de phase de décroissance (P-S).

Si les trois mutants *Fl 5*, *Fl 9*, *Fl 15* ne présentent que de très faibles activités de Hill avec le DCIP ou la plastocyanine, il n'en est pas de même lorsque l'accepteur d'électrons est le K₃Fe(CN)₆: les activités ne sont alors pas négligeables et celle de la souche *Fl 5* est même relativement importante. Ces faits amènent à faire une hypothèse, selon laquelle la photoréduction du K₃Fe(CN)₆ par le Système II ne se ferait pas par la même voie que celle de la photoréduction d'autres accepteurs d'électrons comme le DCIP. La voie du K₃Fe(CN)₆ pourrait être en parallèle et serait peu affectée par les anomalies des mutants (blocage responsable de l'absence de jet d'O₂, déficiences en cytochromes *c*-553 et *b*-563, absence d'activité du Système I). Une hypothèse comparable a été proposée par Pratt et Bishop²⁹ pour expliquer le fait que l'activité de Hill du mutant 8 de *Scenedesmus* est relativement plus forte avec le K₃Fe(CN)₆ qu'avec le DCIP. En outre, la voie du K₃Fe(CN)₆ pourrait peut-être impliquer une intervention du cytochrome *b*-559, qui est présent chez les trois mutants (en plus faibles quantités chez *Fl 9* et chez *Fl 15*, que chez *Fl 5*⁸). En effet, les résultats obtenus par différents auteurs, avec des algues³⁷ et avec des plantes supérieures^{38, 39}, indiquent que le cytochrome *b*-559 n'intervient vraisemblablement pas directement dans la chaîne principale de transfert d'électrons entre les deux photoréactions. Une telle hypothèse, d'une voie latérale importante pour la photoréduction du K₃Fe(CN)₆ par le Système II, n'exclut d'ailleurs pas la possibilité qu'il y ait d'autres sites de réduction du K₃Fe(CN)₆, en particulier après la Photoréaction I comme l'ont montré des expériences réalisées avec les souches *ac-80 a* et sauvage de *C. reinhardtii*³² et avec des fragments de chloroplastes de plantes supérieures⁴⁰.

Les mutants *Fl 9* et *Fl 15* sont capables de fixer le CO₂ à la lumière en présence d'H₂ et de PMS, de photoréduire le NADP⁺ avec le couple DCIP-ascorbate et de photooxyder le cytochrome *c* exogène réduit; ce qui indique que la Photoréaction I fonctionne chez ces deux mutants. Par ailleurs, les analyses, qui ont été effectuées, ont montré que les deux souches *Fl 9* et *Fl 15* sont pratiquement dépourvues de la forme liée, insoluble, du cytochrome *c*-553 et qu'elles sont aussi déficientes en cytochrome *b*-563, dont elles ne renferment que de très faibles quantités^{8,9}. On sait que le cytochrome *c*-553 intervient vraisemblablement directement dans les transports d'électrons entre les deux réactions photochimiques, tandis que le cytochrome *b*-563 pourrait participer à un circuit cyclique d'électrons lié à la Photoréaction I (voir revues^{3,4}). Il apparaît donc que ni le cytochrome *c*-553 ni le cytochrome *b*-563 ne sont nécessaires pour le transfert au Système I des électrons fournis par des donneurs exogènes comme le couple DCIP-ascorbate ou le cytochrome *c* réduit, puisqu'un tel transfert a lieu chez *Fl 9* et chez *Fl 15*. Cette interprétation est en accord avec les résultats de Gorman et Levine¹⁰, qui ont constaté que le mutant *ac-206* de *C. reinhardtii*, dépourvu de cytochrome *c*-553, est capable de photoréduire le NADP⁺ avec le couple DCIP-ascorbate, tandis que le mutant *ac-208*, dépourvu de plastocyanine, en est incapable.

Chez les algues adaptées à l' H_2 , la photoréduction, qui se traduit par une absorption d' H_2 et de CO_2 , ne fait intervenir que la Photoréaction I. Elle implique un transport cyclique d'électrons entre la ferrédoxine réduite par l' H_2 (qui est activé par une hydrogénase) et le côté Système II de la Photoréaction I, transport cyclique probablement couplé à une photophosphorylation⁴¹. Or, lorsque les mutants *Fl 9* et *Fl 15* sont placés en conditions de photoréduction ($H_2 + CO_2 + CMU$), il ne se produit de photofixation de CO_2 qu'en présence de PMS. Il résulte de ce fait que le transport cyclique d'électrons lié au Système I ne suit probablement pas la même voie *in vitro* (avec PMS) et *in vivo* (voir schéma, Fig. 4). Une interprétation similaire a été avancée par Pratt et Bishop²⁹ à propos des mutants 26 et 50 de *Scenedesmus*, capables de photophosphorylation cyclique avec PMS, mais incapables de photoréduction en présence d' H_2 et de CO_2 ^{29,30}. En outre, ni le cytochrome *c-553* ni le cytochrome *b-563*, en lesquels les mutants *Fl 9* et *Fl 15* sont déficients, ne paraissent intervenir obligatoirement dans la voie avec PMS. Mais ces cytochromes sont susceptibles de participer normalement *in vivo* au transport cyclique d'électrons, leur absence (ou celle de l'un d'entre eux seulement) pouvant alors expliquer l'incapacité des mutants *Fl 9* et *Fl 15* de réaliser la photoréduction sans PMS. Il faut remarquer, toutefois, que Levine²⁸ a observé une faible variation photoinduite d'absorption à 564 nm (attribuée à l'oxydation du cytochrome *b-563*), lorsque le mutant *ac-206* de *C. reinhardtii*, dépourvu de cytochrome *c-553*, était éclairé en présence d' H_2 et de PMS. Il semble donc que le transfert cyclique d'électrons avec PMS puisse entraîner des variations de l'état d'oxydoréduction du cytochrome *b-563*, sans pour autant être interrompu par une déficience en ce cytochrome.

Le mutant *Fl 5*, lui, possède les deux cytochromes *c-553* et *b-563*^{8,9}, mais il n'est capable de réaliser ni photoréduction de $NADP^+$ ni photofixation de CO_2 , même en présence de transporteurs d'électrons exogènes; de plus, il n'effectue pas la réaction de photooxydation de cytochrome *c* réduit. Ce mutant ne présente donc aucune activité de type Système I; il se comporte comme les mutants 8 de *Scenedesmus*^{29,30} et *ac-80 a* et *F-1* de *C. reinhardtii*^{28,31}, bloqués au niveau de l'holochrome chlorophyllien P700. Pour cette raison, une recherche comparée de l'holochrome P700 dans des particules chloroplastiques, préparées à partir des différentes souches, a été effectuée très récemment (J. Maroc et J. Garnier, résultats non publiés); elle a montré que le mutant *Fl 5* ne présente aucune des caractéristiques spectroscopiques de cet holochrome du Système I.

En ce qui concerne les souches *Fl 9* et *Fl 15*, il résulte de l'ensemble des observations effectuées jusqu'à présent que, chez ces deux mutants, les systèmes photochimiques I et II sont fonctionnels. Mais le transport d'électrons est interrompu entre les deux photoréactions et deux types de blocage peuvent être distingués: le premier, révélé par l'absence de jet d' O_2 à l'illumination et par des anomalies de fluorescence, peut être localisé très près du Système II; le second, dont témoigne l'incapacité de réaliser la photoréduction en présence d' H_2 et de CO_2 seuls, concerne plutôt le côté Système I de la chaîne de transfert d'électrons. Si l'absence de cytochrome *c-553* lié et la déficience en cytochrome *b-563* peuvent expliquer les anomalies relatives à la photoréduction en atmosphère d' H_2 , il n'en est pas de même pour celles qui se rapportent au jet d' O_2 et à la fluorescence (voir réf. 8). En outre, les mutants ont un équipement en plastoquinone A comparable à celui de la souche sauvage et ils possèdent du cytochrome *b-559*⁸. Il semble donc que l'absence de jet d' O_2 soit très probablement

due à un défaut de structure de la membrane chloroplastique, empêchant la connexion entre Q et les accepteurs A. Ce défaut de structure pourrait être le même que celui qui est vraisemblablement responsable de l'absence de cytochrome *c*-553 lié et de la déficience en cytochrome *b*-563, du côté du Système I auquel ces deux cytochromes sont associés. De même, selon une interprétation analogue, un défaut de structure pourrait être responsable à la fois de l'absence de P₇₀₀ et d'une interruption du transport d'électrons près de la Photoréaction II, chez le mutant *Fl 5*. Ces hypothèses ont été discutées par ailleurs (réfs 8, 9). Elles sont étayées, dans le cas du mutant *Fl 15*: d'une part, par les résultats obtenus récemment par Picaud⁴², qui indiquent que les fragments de chloroplastes de ce mutant présentent une importante déficience en lipides polaires et une sensibilité accrue à l'action du Triton X-100, et, d'autre part, par des observations en microscopie électronique, effectuées par G. Giraud, N. Hauswirth et J. Garnier (résultats non publiés), qui ont mis en évidence une accumulation anormale de globules lipidiques dans le cytoplasme des cellules de *Fl 15*. Toutefois, la possibilité que chacun des mutants ait subi plusieurs mutations distinctes ne peut pas être éliminée *a priori*, en attendant les résultats d'analyses génétiques qui vont être entreprises.

En conclusion, ce travail a permis de préciser certaines des anomalies de fonctionnement de l'appareil photosynthétique, qui affectent chacune des souches *Fl 5*, *Fl 9* et *Fl 15*. De plus, l'étude des propriétés de ces mutants a permis de dégager quelques renseignements d'ordre plus général, concernant les transferts d'électrons non cyclique et cyclique, *in vivo* et *in vitro*, et le rôle des cytochromes *b*-563 et *c*-553. Quelques-unes des observations et des hypothèses, qui ont été faites, méritent des études plus approfondies. Des recherches vont être poursuivies dans ce sens.

RÉSUMÉ

Une étude est effectuée, afin de déterminer les différents types de transports d'électrons que peuvent réaliser trois mutants non photosynthétiques (*Fl 5*, *Fl 9*, *Fl 15*) de *Chlamydomonas reinhardtii*. Ces mutants ont été précédemment sélectionnés en raison de leurs anomalies relatives à la fluorescence chlorophyllienne et au dégagement d'O₂, qui indiquent un blocage du transfert interne d'électrons au voisinage de la Photoréaction II.

Les échanges de CO₂ de cellules entières, placées soit en aérobiose, soit en atmosphère d'H₂ ou d'N₂, à la lumière, sont mesurés au moyen d'un dispositif équipé d'une électrode à CO₂, d'une part. Les activités photochimiques présentées par des fragments de chloroplastes, *in vitro* en présence de divers transporteurs d'électrons exogènes, sont déterminés spectrophotométriquement, d'autre part.

Les trois mutants sont incapables de fixer le CO₂ à la lumière en aérobiose, ainsi qu'en présence d'H₂ et de 3-*p*-chlorophényl-1,1-diméthyluré (CMU) seuls; en outre, ils ne réalisent pas de photoréduction de NADP⁺ avec l'eau. Mais *Fl 9* et *Fl 15* peuvent effectuer une photoréduction de NADP⁺ avec le couple 2,6-dichlorophénol indophénol (DCIP)-ascorbate, une réaction de photooxydation de cytochrome *c* exogène réduit, une fixation de CO₂ à la lumière en présence d'H₂, de CMU et de phénazine méthosulfate. Par contre, *Fl 5* n'est capable de réaliser aucune de ces réactions.

Avec le DCIP et avec la plastocyanine comme accepteurs, les activités de Hill

des trois mutants sont très faibles, par rapport à celles de la souche sauvage; elles sont relativement plus importantes avec le $K_3Fe(CN)_6$, notamment pour *Fl 5*.

Ces résultats témoignent, d'une part, d'une absence de fonctionnement du Système I chez *Fl 5* et, d'autre part, d'un blocage du transport d'électrons entre les deux photoréactions, qui sont fonctionnelles, chez *Fl 9* et chez *Fl 15*. Ils sont interprétés en fonction des renseignements d'ordre analytique obtenus par ailleurs (absence de l'holochrome P700 chez *Fl 5*, déficience des souches *Fl 9* et *Fl 15* en cytochrome *c-553* lié et en cytochrome *b-563*). Plusieurs hypothèses, concernant la nature du ou des défaut(s) affectant chaque mutant, les sites d'intervention des divers cytochromes et la possibilité de voies différentes, *in vivo* et *in vitro*, pour les transports photosynthétiques d'électrons, sont proposées et discutées.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient sincèrement Mademoiselle T. Taverny, pour l'aide technique compétente qu'elle leur a fournie au cours de ce travail. Ils adressent également leurs vifs remerciements à Messieurs G. Quaino et G. Besse, qui ont construit la cuve de mesure utilisée pour l'étude des échanges de CO_2 .

BIBLIOGRAPHIE

- 1 J. Garnier, *Physiol. Vég.*, 3 (1965) 121.
- 2 N. I. Bishop, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 17 (1966) 185.
- 3 R. P. Levine, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 20 (1969) 523.
- 4 Y. de Kouchkovsky, *Bull. Soc. Fr. Physiol. Vég.*, 14 (1968) 409.
- 5 J. Garnier, Y. de Kouchkovsky et J. Lavorel, *Séances Soc. Biol. Fr.*, 162 (1968) 365.
- 6 J. Garnier, dans *Prediction and Measurement of Photosynthetic Productivity*, PUDOC, Wageningen, 1970, p. 543.
- 7 Y. de Kouchkovsky, dans H. Metzner, *Progress in Photosynthesis Research*, Vol. 2, Metzner, Tübingen, 1969, p. 959.
- 8 J. Garnier et J. Maroc, *Biochim. Biophys. Acta*, 205 (1970) 205.
- 9 J. Garnier et J. Maroc, *Proc. 2nd Int. Congr. on Photosynthesis Research*, Vol. 1, Dr W. Junk N.V., The Hague, 1972, p. 669.
- 10 D. S. Gorman et R. P. Levine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 54 (1965) 1665.
- 11 G. MacKinney, *J. Biol. Chem.*, 140 (1941) 315.
- 12 D. I. Arnon, *Plant Physiol.*, 24 (1949) I.
- 13 R. P. Levine et W. T. Eberson, *Z. Vererbungslehre*, 89 (1958) 631.
- 14 R. P. Levine et R. M. Smillie, *J. Biol. Chem.*, 238 (1963) 4052.
- 15 R. M. Smillie, *Plant Physiol.*, 37 (1962) 716.
- 16 M. Plesničar et D. S. Bendall, *Biochim. Biophys. Acta*, 216 (1970) 192.
- 17 P. Böger, C. C. Black et A. San Pietro, *Arch. Biochem. Biophys.*, 115 (1966) 35.
- 18 N. Nelson et J. Neumann, *J. Biol. Chem.*, 244 (1969) 1926.
- 19 M. Shin, K. Tagawa et D. I. Arnon, *Biochem. Z.*, 338 (1963) 84.
- 20 S. Katoh, I. Suga, I. Shiratori et A. Takamiya, *Arch. Biochem. Biophys.*, 94 (1961) 136.
- 21 Y. Fujita et J. Myers, *Arch. Biochem. Biophys.*, 112 (1965) 506.
- 22 S. Katoh, I. Shiratori et A. Takamiya, *J. Biochem. Tokyo*, 51 (1962) 32.
- 23 F. Bendall, dans H. F. Linskens et M. V. Tracey, *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, Vol. 6, Springer-Verlag, Berlin, 1963, p. 424.
- 24 B. F. van Gelder et E. C. Slater, *Biochim. Biophys. Acta*, 58 (1962) 593.
- 25 E. I. Rabinowitch, *Photosynthesis and Related Processes*, Vol. 2, Interscience, New York, 1956, pp. 1913-1915.
- 26 F. L. Allen, *Arch. Biochem. Biophys.*, 55 (1955) 38.
- 27 W. Urbach et D. C. Fork, dans *Carnegie Institution Year Book*, Vol. 64, Carnegie Institution, Washington, D.C., 1964-1965, p. 390.
- 28 R. P. Levine, dans H. Metzner, *Progress in Photosynthesis Research*, Vol. 2, Metzner, Tübingen, 1969, p. 971.

- 29 L. H. Pratt et N. I. Bishop, *Biochim. Biophys. Acta*, 153 (1968) 664.
- 30 N. I. Bishop et J. Wong, *Biochim. Biophys. Acta*, 234 (1971) 433.
- 31 A. L. Givan et R. P. Levine, *Plant Physiol.*, 42 (1967) 1264.
- 32 A. L. Givan et R. P. Levine, *Biochim. Biophys. Acta*, 189 (1969) 404.
- 33 R. P. Levine, dans *Photosynthetic Mechanisms of Green Plants*, Publ. 1145, Natl. Res. Council, Natl. Acad. Sci., Washington, D.C., 1963, p. 158.
- 34 B. Kok, H. J. Rurainski et E. A. Harmon, *Plant Physiol.*, 39 (1964) 513.
- 35 Y. de Kouchkovsky, *Proc. 2nd Int. Congr. on Photosynthesis Research*, Vol. I, Dr W. Junk N.V., The Hague, 1972, p. 233.
- 36 H. H. Stiehl et H. T. Witt, *Z. Naturforsch.*, 24b (1969) 1588.
- 37 J. Amesz, J. W. M. Visser, G. J. van den Engh et M. P. Dirks, *Biochim. Biophys. Acta*, 256 (1972) 370.
- 38 R. G. Hiller, J. M. Anderson et N. K. Boardman, *Biochim. Biophys. Acta*, 245 (1971) 439.
- 39 R. G. Hiller et N. K. Boardman, *Biochim. Biophys. Acta*, 253 (1971) 449.
- 40 Govindjee et M. Bazzaz, *Photochem. Photobiol.*, 6 (1967) 885.
- 41 G. Gingras, *Physiol. Vég.*, 4 (1966) 1.
- 42 A. Picaud, *Biochim. Biophys. Acta*, 275 (1972) 414.

Biochim. Biophys. Acta, 283 (1972) 100-114