

BBA 46404

ACTION DU *m*-DINITROBENZÈNE SUR LA PHASE THERMIQUE D'INDUCTION DE FLUORESCENCE EN PHOTOSYNTHÈSE

A. L. ETIENNE ET J. LAVERGNE

Laboratoire de Photosynthèse du C.N.R.S., 91-Gif-sur-Yvette (France)

(Reçu le 5 juin, 1972)

SUMMARY

Effect of m-dinitrobenzene on the thermal phase of fluorescence induction in photosynthesis

The effect of *m*-dinitrobenzene on the two phases (photochemical and thermal) of fluorescence induction, was studied under various conditions.

There is a specific inhibitory action of *m*-dinitrobenzene on the thermal phase at concentrations lower than 10^{-4} M.

The results are interpreted in terms of an irreversible binding of *m*-dinitrobenzene to the centers, where *m*-dinitrobenzene serves as a substitute for the non-photochemical quencher R of Delosme.

The effects observed for higher *m*-dinitrobenzene concentrations would involve a second type of action.

INTRODUCTION

On sait, depuis le travail de Morin¹, que la croissance de rendement caractéristique du début de l'induction de fluorescence en forte lumière se déroule selon deux phases successives, la première (phase OI) étant purement photochimique (*i.e.* ne dépendant que de l'énergie lumineuse absorbée $I \cdot t$), la seconde (phase IP) ne présentant pas ce caractère. On constate souvent une petite décroissance du rendement au début de la phase IP (passage par un minimum *D*).

Poursuivant le travail de Morin, Delosme² apportait deux éléments essentiels:

(a) Une élévation de l'intensité d'illumination ne fait pas disparaître la phase IP au profit de la phase OI: les niveaux I et P ne se rejoignent pas, mais se "saturent" en intensité.

(b) Au delà du seuil de saturation, la cinétique IP est indépendante de l'intensité; la vitesse photochimique étant saturée, la phase IP n'est limitée que par des réactions non photochimiques d'où sa désignation par le terme de "phase thermique".

Ces résultats établissaient l'impossibilité d'expliquer les variations du rendement de fluorescence par la seule intervention du quencher photochimique Q de Duysens et Sweers³. Delosme² montrait que l'on pouvait rendre compte de ces données

Abréviation: DCMU, dichlorophényl diméthyl urée.

expérimentales en supposant l'existence d'un deuxième quencher R, destructible seulement par une réaction thermique. Confirmant pour des intensités saturantes la complémentarité cinétique (établie par Joliot⁴ pour des intensités plus faibles) de la phase thermique IP avec la vitesse de dégagement d'oxygène (période du "jet"), Delosme remarquait que la destruction du quencher R semblait refléter la réduction du pool d'oxydants A et suggérait l'existence d'un équilibre entre R et A. Une telle description ne fait évidemment intervenir le quencher R que comme une entité cinétique et ne préjuge nullement de sa réalité moléculaire: Delosme proposait d'interpréter R moins comme un quencher réel en équilibre avec A que comme "une interaction entre A et la chlorophylle".

L'étude de l'action des agents chimiques qui modifient les cinétiques d'induction de fluorescence (notamment le dichlorophényl diméthyl urée (DCMU), l'hydroxylamine, les quinones) devrait permettre de progresser dans l'analyse des propriétés de quenching des centres du Système II.

Le *m*-dinitrobenzène, connu comme quencher de la chlorophylle *in vitro*⁵ a également pour effet d'inhiber la fluorescence *in vivo*. D'abord utilisé pour inhiber la fluorescence des chlorelles par Teale⁶, son mode d'action a ensuite été étudiée par Ames et Fork⁷, J. Lavorel (communication personnelle), qui ont montré que l'action du dinitrobenzène était plus importante sur la fluorescence variable que sur la fluorescence constante. P. Joliot (communication personnelle), Lavorel *et al.*⁸ se sont intéressés notamment à la modification de forme de la phase photochimique (la diminution du niveau ϕ_I s'accompagnant d'une transition de la forme sigmoïde à la forme exponentielle).

Nous avons constaté qu'à des concentrations de *m*-dinitrobenzène plus faibles, où cet effet ne se manifeste pas encore, on assiste à une inhibition sélective de la phase thermique, la phase OI n'étant que peu ou pas touchée. C'est cette action différentielle sur les deux phases de croissance du rendement de fluorescence qui fait l'objet du présent article.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel biologique

(1) *Chlorella pyrenoidosa* Chick souche Emerson. Cultivée en milieu Tamiya modifié, pH 5.4, à 23 °C. L'intensité lumineuse utilisée pour les cultures est de 6000 lux. Les algues sont récoltées journellement. Les algues sont utilisées dans leur milieu diluées à des concentrations allant de 20 à 50 μ g de chlorophylle totale par ml.

(2) *Chloroplastes d'épinards*. Les chloroplastes sont préparés selon la méthode d'Avron⁹ et conservés congelés dans 50 % de glycérol, 50 % de milieu Tris-maléate-saccharose, à la température de l'azote liquide (77 °K).

Décongelés, ils sont centrifugés d'abord 2 min à $200 \times g$ pour éliminer les plus gros débris, puis à $2000 \times g$ pendant 10 min. Ils sont resuspendus dans du milieu Tris-maléate-saccharose de pH 6.6. Ils sont utilisés à des concentrations de 20 μ g de chlorophylle totale par ml à 25 μ g de chlorophylle totale par ml.

Méthodes

Deux appareils ont été utilisés pour la détermination des niveaux ϕ_0 , ϕ_I et ϕ_P du rendement de fluorescence.

(1) Le Phosphoroscope-laser décrit par ailleurs¹⁰. La source actinique est un laser Helium-néon ($\lambda = 632.8$ nm). Un système de disques tournants détermine un éclair de durée voulue appliqué à un échantillon de la suspension d'algues renouvelé par écoulement. Outre son caractère monochromatique et sa puissance, le faisceau laser offre l'avantage d'une très faible divergence facilitant l'obtention de temps de coupure très courts par le système de disques. Des valeurs typiques sont 200 μ s de temps de montée pour la phase photochimique avec un temps d'ouverture du faisceau de 5 μ s.

Le début de l'illumination de chaque nouvel échantillon est synchronisé avec le déclenchement du balayage d'un analyseur multicanaux (DIDAC 800) qui enregistre les cinétiques de fluorescence et améliore le rapport signal sur bruit par un nombre convenable d'accumulations.

Les niveaux ϕ_I et ϕ_P peuvent également être enregistrés en continu sur un galvanomètre suiveur de spot; l'illumination est alors permanente et l'échantillon d'algues est soumis à une alternance écoulement–arrêt. Pour une intensité suffisamment grande (par rapport à la vitesse d'écoulement) le niveau atteint en écoulement est le niveau ϕ_I , le maximum atteint à l'arrêt, le niveau ϕ_P . Cette méthode a été utilisée dans l'expérience de la Fig. 5.

(2) Appareil à mélange rapide, décrit par ailleurs¹¹. Le matériel biologique est contenu dans un réservoir sous pression (≈ 1.5 atm) d'air. Son écoulement jusqu'à une chambre d'observation est commandé par une électrovanne. Il peut être mélangé rapidement à une autre solution dans une chambre de mélange située en amont de la chambre d'observation. Le temps minimum entre le mélange et l'observation est de 90 ms.

La source lumineuse est une lampe à filament de tungstène alimentée en continu. Le temps d'ouverture du faisceau par un obturateur électromécanique est de l'ordre de la milliseconde. L'intensité autorise des temps de montée de la phase photochimique de l'ordre de la cinquantaine de millisecondes.

La cinétique d'induction de fluorescence est observée sur un oscilloscope à écran rémanent.

Détermination des niveaux ϕ_0 , ϕ_I et ϕ_P . Un balayage rapide de l'oscilloscope ou de l'analyseur multicanaux permet de mesurer ϕ_0 et ϕ_I ; un balayage lent donne ϕ_I et ϕ_P (Fig. 1).

RÉSULTATS

(I) Effet du dinitrobenzène

(a) Effet de la concentration

La Fig. 2 montre l'effet de la concentration de *m*-dinitrobenzène sur les niveaux ϕ_0 , ϕ_I , ϕ_P en intensité non saturante sur des chlorelles. Le niveau ϕ_P diminue beaucoup plus vite que le niveau ϕ_I de sorte que vers 10^{-4} M *m*-dinitrobenzène, on constate une suppression de la phase thermique alors que la phase photochimique est très peu touchée. Sur les chloroplastes d'épinards (Fig. 3) l'effet existe, mais de façon moins marquée.

En lumière d'intensité saturante (Fig. 4) on a également une inhibition spécifique de la phase thermique, le niveau ϕ_I étant toutefois généralement plus sensible au *m*-dinitrobenzène qu'à faible intensité.

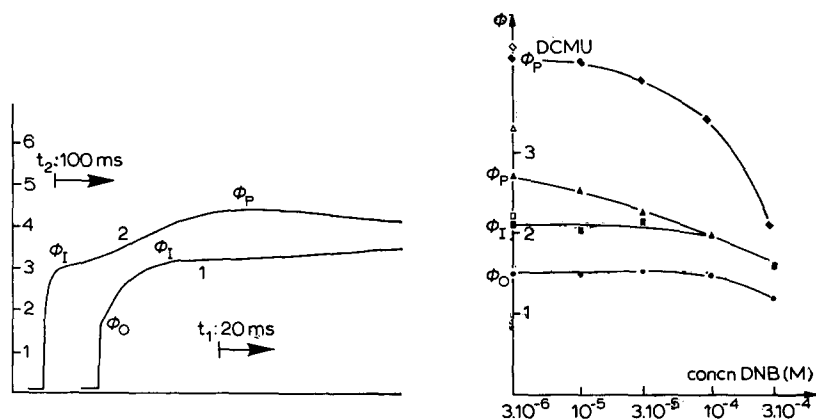


Fig. 1. Type d'enregistrement à l'oscilloscope à écran rémanent pour les mesures en lumière d'intensité non saturante. Courbe 1, base de temps 20 ms/div. Détermination des niveaux ϕ_0 , ϕ_I . Courbe 2, base de temps 100 ms/div. Détermination du niveau ϕ_P . Même sensibilité d'enregistrement pour les deux courbes. La méthode est la même dans le cas du phosphorescope laser les vitesses de balayage utilisées étant de $12 \mu\text{s}/\text{canal}$ pour la phase photochimique et $1 \text{ ms}/\text{canal}$ pour la phase thermique.

Fig. 2. Effet de la concentration du dinitrobenzène sur la fluorescence des chlorelles en lumière d'intensité non saturante (temps de montée de la phase photochimique: 50 ms). Niveaux ϕ_I (\square), ϕ_P (\triangle) du lot d'algues sans dinitrobenzène. Niveau ϕ_P (\diamond) d'algues en présence de DCMU $5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. Niveaux ϕ_I (\blacksquare), ϕ_P (\blacktriangle) d'algues en présence de dinitrobenzène. Niveau ϕ_P (\blacklozenge) en présence de dinitrobenzène et DCMU $5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. Pour chaque concentration, dinitrobenzène incubé 30 min. Ordonnée: en unités arbitraires. Abscisse: concentration en dinitrobenzène molaire. Echelle logarithmique.

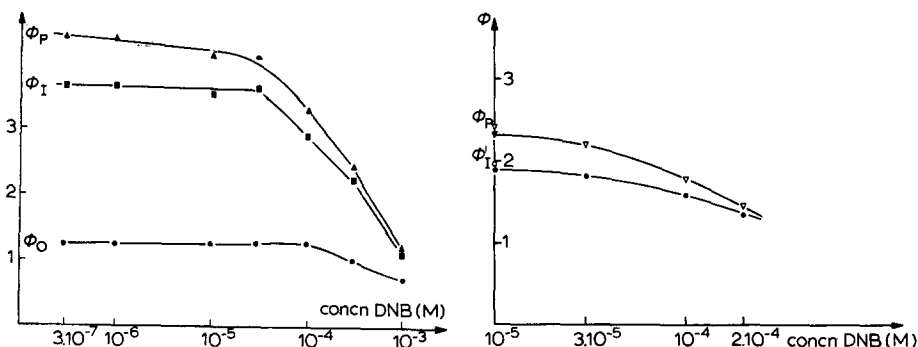


Fig. 3. Effet de la concentration du dinitrobenzène sur la fluorescence des chloroplastes d'épinards en lumière d'intensité non saturante (temps de montée de la phase photochimique en 100 ms). Ordonnée: ϕ_0 (\bullet), ϕ_I (\blacksquare), ϕ_P (\blacktriangle) en unités arbitraires. Abscisse: concentration en dinitrobenzène molaire. Echelle logarithmique.

Fig. 4. Effet de la concentration du dinitrobenzène sur la fluorescence des chlorelles en lumière d'intensité saturante (temps de montée de la phase photochimique: $200 \mu\text{s}$). Niveaux ϕ_I (\circ) ϕ_P (∇) des algues sans dinitrobenzène. Niveaux ϕ_I (\bullet) ϕ_P (\blacktriangledown) des algues avec dinitrobenzène. Ordonnée: en unités arbitraires. Abscisse: concentration en dinitrobenzène molaire. Echelle logarithmique. Les points atteints en DCMU saturant se situeraient sur la courbe supérieure. Pour chaque concentration, dinitrobenzène incubé 30 min.

L'effet spécifique sur la phase thermique est toujours observé mais avec des différences quantitatives: d'une manière générale les valeurs relatives des niveaux

ϕ_0 , ϕ_I , ϕ_P sont assez variables d'une expérience à l'autre (y compris en absence d'inhibiteur). Ainsi, en forte intensité, on observe parfois en présence de *m*-dinitrobenzène, une suppression complète de la phase thermique sans modification de la phase photochimique. Delosme² signale avoir remarqué dans certaines de ses expériences un effet du DCMU similaire à celui du *m*-dinitrobenzène (suppression de la phase thermique sans modification de la phase photochimique).

(b) *Effet du temps d'incubation des algues en présence de dinitrobenzène*

L'hétérogénéité d'action (inhibition spécifique de la phase thermique, puis inhibition globale de la fluorescence) révélée par l'effet de la concentration, se manifeste également dans l'évolution des niveaux de fluorescence après addition d'une concentration donnée de *m*-dinitrobenzène. La Fig. 5 montre une telle évolution: la chute de rendement après l'addition est extrêmement rapide: nous avons pu vérifier sur l'appareil à mélange rapide qu'elle intervenait en moins de 200 ms. Après la chute initiale on assiste à une lente remontée des niveaux ϕ_I , ϕ_P mais l'amplitude de la phase thermique ($\phi_P - \phi_I$) reste constante, ou tend à diminuer. Il y a donc une diminution relative de la phase thermique au cours du temps. A une concentration de 10^{-4} M, on tend ainsi plus ou moins nettement vers une restauration de la phase photochimique avec forte inhibition de la phase thermique.

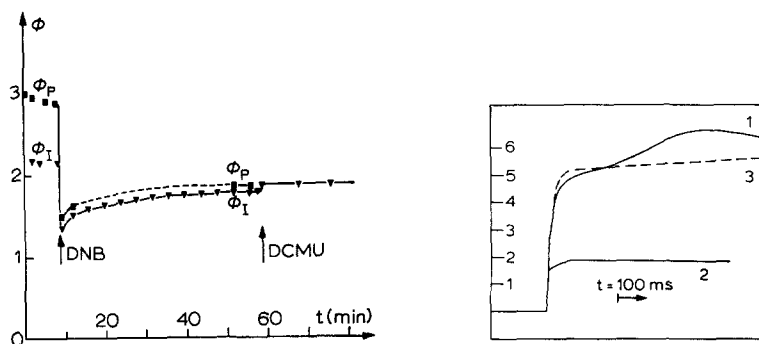


Fig. 5. Evolution des niveaux ϕ_I et ϕ_P en intensité saturante après addition de dinitrobenzène $2 \cdot 10^{-4}$ M puis de DCMU 10^{-5} M. Ordonnée: unités arbitraires. Abscisse: temps en minutes. Une addition de DCMU saturant relève ϕ_I en ϕ_P (comme le montre la figure pour un temps long après le mélange, mais on a vérifié que cette propriété ne dépendait pas du temps d'incubation).

Fig. 6. Réversibilité de l'action du dinitrobenzène. Courbe 1, algues sans dinitrobenzène; Courbe 2, algues en présence de dinitrobenzène $3 \cdot 10^{-4}$ M; Courbe 3, algues préincubées avec du dinitrobenzène $3 \cdot 10^{-4}$ M centrifugées, resuspendues dans le même volume de milieu.

(c) *Réversibilité de l'action du m-dinitrobenzène*

Les algues préincubées avec du *m*-dinitrobenzène $3 \cdot 10^{-4}$ M sont centrifugées puis resuspendues dans un même volume de milieu. La Fig. 6 montre qu'on obtient dès le premier lavage une restauration totale des niveaux ϕ_0 et ϕ_I des algues préincubées avec le *m*-dinitrobenzène alors que la phase thermique est très peu restaurée.

(d) *Effet du m-dinitrobenzène sur le jet d'oxygène*

La complémentarité classique⁴ entre phase thermique de fluorescence et vitesse de dégagement d'oxygène devrait se traduire par une suppression du jet d'oxygène en présence de *m*-dinitrobenzène. Nous avons constaté qu'il n'en était rien: le *m*-dinitrobenzène 10^{-4} M (supprimant la phase thermique en intensité non saturante) n'entraîne

aucune modification sensible de la cinétique d'induction de l'émission d'oxygène. Cette expérience a été effectuée sur une électrode modulée de vitesse d'oxygène identique à celle de Joliot *et al.*¹².

(II) Action du *m*-dinitrobenzène et du DCMU

On sait que le DCMU a pour effet de supprimer la phase thermique en élevant ϕ_I jusqu'en ϕ_P . En intensité saturante², on atteint le même niveau maximum par une cinétique monophasique photochimique en présence de DCMU, que par une cinétique biphasique en son absence. Ce niveau maximum du rendement est également atteint en DCMU pour des intensités plus faibles, où la phase thermique en l'absence de DCMU, culmine à un niveau inférieur ou est même complètement supprimée. Dans l'hypothèse des deux quenchers rappelée en introduction, l'effet du DCMU s'interprète par une action double: d'une part blocage du transfert d'électrons de Q^- vers A, d'autre part mise hors-jeu du deuxième quencher R, non photochimique. On se trouve ainsi en présence d'un seul quencher Q, destructible photochimiquement et dont la régénération (réoxydation) est très ralentie. Le seuil d'intensité saturante correspondant à une destruction du quencher photochimique rapide devant sa régénération est ainsi considérablement diminué et ce n'est qu'à des intensités beaucoup plus faibles qu'on verra réapparaître une non-saturation¹³.

m-Dinitrobenzène et DCMU ont donc un effet inverse sur les cinétiques de fluorescence: alors que le *m*-dinitrobenzène supprime la phase thermique par blocage en ϕ_I , le DCMU la supprime en élevant la phase photochimique au niveau ϕ_P . On peut se demander dans ces conditions quelle sera l'action cumulée des deux inhibiteurs.

(a) Action cumulée des deux inhibiteurs sur la fluorescence

En lumière d'intensité saturante, l'addition de DCMU (à concentration égale ou supérieure à 10^{-5} M) a pour effet de supprimer la phase thermique qui subsistait en présence de *m*-dinitrobenzène seul (Fig. 5). Le niveau maximum atteint en dinitrobenzène-DCMU est le même que le niveau maximum de la phase thermique en présence de *m*-dinitrobenzène.

En intensité non saturante (Fig. 3), l'addition de DCMU entraîne une élévation du niveau maximum. L'amplitude de cette augmentation du niveau ϕ_P diminue quand la concentration de *m*-dinitrobenzène augmente, elle tend à disparaître aux fortes concentrations de *m*-dinitrobenzène.

L'effet cumulé des deux inhibiteurs sur la fluorescence est indépendant de l'ordre des additions.

On pourrait interpréter ces effets en supposant que le *m*-dinitrobenzène, même ajouté en second, se fixe sur les centres et les préserve de l'action du DCMU. Les contrôles suivants montrent que ce n'est pas le cas:

(1) *Action cumulée des deux inhibiteurs sur la vitesse de dégagement d'oxygène.* Alors que le *m*-dinitrobenzène 10^{-3} M agissant seul ne provoque qu'une inhibition très partielle du dégagement d'oxygène¹², l'inhibition totale de l'émission d'oxygène provoquée par le DCMU 10^{-5} M n'est pas modifiée par la présence de *m*-dinitrobenzène 10^{-3} M.

(2) *Action cumulée sur le déclin de fluorescence.* Nous avons constaté que le *m*-dinitrobenzène modifiait peu les cinétiques de déclin du rendement de fluorescence après un éclair actinique. Par contre, on sait que le DCMU ralentit considérablement ces cinétiques, ce qui s'explique bien par un blocage entre Q et A. En présence de *m*-dinitro-

benzène, le DCMU provoque un ralentissement du déclin de fluorescence tout à fait comparable à celui obtenu en DCMU seul.

(b) *Ralentissement de la vitesse d'action du DCMU par le dinitrobenzène*

Des expériences effectuées sur l'appareil à mélange rapide montrent que la vitesse d'action du DCMU après mélange avec une suspension d'algues est considérablement ralentie par le *m*-dinitrobenzène comme le montre la Fig. 7 où l'on a porté l'évolution de la différence entre les niveaux ϕ_I et ϕ_P mesurée à des intervalles de temps variables après l'addition du DCMU. Le ralentissement se manifeste à partir de concentrations très faibles de *m*-dinitrobenzène: il se saturé dès 10^{-6} M de *m*-dinitrobenzène, concentration où la cinétique de fluorescence n'est pas touchée.

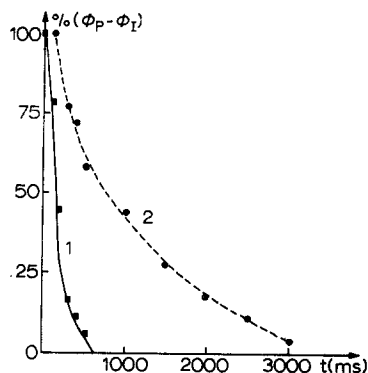


Fig. 7. Ralentissement de la vitesse d'action du DCMU par le dinitrobenzène. Courbe 1, action du DCMU $5 \cdot 10^{-4}$ M sur des algues sans dinitrobenzène; Courbe 2, action du DCMU $5 \cdot 10^{-4}$ M sur des algues en présence de dinitrobenzène $2 \cdot 10^{-4}$ M. Abscisse: temps en millisecondes écoulé à l'obscurité après le mélange avec le DCMU. Ordonnée: pourcentage de phase thermique résiduelle: $\phi_P - \phi_I$.

Par contre, le DCMU ajouté en premier ne ralentit pas l'effet rapide d'inhibition des niveaux de fluorescence lors d'une addition de *m*-dinitrobenzène (décrit en I, b).

DISCUSSION

Deux voies distinctes d'interprétation des expériences qui viennent d'être décrites peuvent être envisagées:

- soit on fera intervenir le *m*-dinitrobenzène au niveau du processus primaire de capture de l'excitation, comme quencher de la fluorescence chlorophyllienne, en se fondant sur ce que l'on observe avec la chlorophylle en solution;
- soit on supposera que le *m*-dinitrobenzène modifie d'une façon ou d'une autre le fonctionnement de l'appareil photosynthétique, l'effet sur les cinétiques de fluorescence ne témoignant que plus ou moins indirectement de cette modification.

Un argument nous semble autoriser à trancher entre ces deux voies en faveur de la première: tous les tests d'activité effectués au Laboratoire⁸ (vitesse stationnaire et cinétiques d'induction du dégagement d'oxygène, activité de Hill, activité Système I) montrent que le *m*-dinitrobenzène n'a d'effet inhibiteur qu'à partir de 10^{-4} M et qu'aucun effet sensible autre que sur la fluorescence n'intervient aux concentrations plus faibles (à l'exception de l'effet de ralentissement du temps d'action du DCMU;

mais le domaine de concentration de cet effet — saturation dès 10^{-6} M de *m*-dinitrobenzène — laisse supposer qu'il est disjoint des autres phénomènes décrits). Cette concentration de 10^{-4} M est précisément celle à partir de laquelle les niveaux ϕ_0 et ϕ_I commencent à diminuer, alors qu'à concentration plus faible, l'inhibition n'intervenait que sur ϕ_P .

On voit mal comment le deuxième type d'intervention pourrait n'avoir de conséquence sur aucune des ces activités. Cet argument nous permet également d'aller plus loin dans le cadre de la première interprétation (*m*-dinitrobenzène comme quencher) car il impose d'importantes restrictions quant au mode d'intervention du *m*-dinitrobenzène. Si l'on suppose par exemple que le dinitrobenzène joue le rôle d'un piège supplémentaire dans les unités photosynthétiques, indifférent à l'état des centres photochimiques, on devrait s'attendre d'une part à une diminution générale des niveaux de fluorescence, et d'autre part à une diminution des différentes activités de l'appareil photosynthétique (au moins celles qui sont liées au Système II). L'effet serait qualitativement comparable à une diminution d'intensité lumineuse (ce ne serait pas vrai quantitativement pour des raisons qui apparaîtront dans la suite). On est donc amené à écarter ce type d'explication et à spécifier le point suivant: si le *m*-dinitrobenzène intervient comme quencher sans modifier l'activité photochimique du système, il faut que l'énergie qu'il piège soit une énergie qui de toute façon n'aurait pas été utilisée photochimiquement. Ce ne sera le cas que si le dinitrobenzène n'entre pas en compétition avec le quenching photochimique, ou du moins ne modifie pas la compétition déjà existante entre le quenching photochimique et le quencher non photochimique R.

L'effet observé sur les cinétiques de fluorescence confirme cette analyse. On peut le décrire ainsi: pour des concentrations de *m*-dinitrobenzène $< 10^{-4}$ M, la phase photochimique est peu ou pas touchée, la phase thermique diminuée ou supprimée. Ce schéma s'applique bien au cas de la Fig. 2, il peut sembler plus contestable pour les expériences des Figs 3 et 4. Dans tous les cas cependant, le pourcentage d'inhibition est plus fort sur la phase thermique que sur la phase photochimique. Cet argument est toutefois insuffisant si l'on tient compte de la non linéarité de la relation quantité de quencher — rendement de fluorescence^{15,16}. Cette non linéarité est liée à la forme sigmoïde (non exponentielle) de la phase photochimique et peut s'expliquer par la connection des unités photosynthétiques (les centres photochimiques "fermés" peuvent transférer l'excitation aux centres voisins). Si l'on tient compte de la forme de la relation $\phi = f(K)$ (où K désigne la concentration de tous les quenchers présents) qui est donnée par la Fig. 8, on voit qu'il est normal en tout état de cause qu'une certaine quantité de quencher déprime d'autant plus fortement les niveaux de fluorescence que l'on se place dans une région où la pente de la fonction $\phi = f(K)$ est importante, c'est-à-dire vers les niveaux de fluorescence élevés.

Pour vérifier que la phase thermique est réellement spécifiquement touchée par le *m*-dinitrobenzène à faible concentration on peut procéder de la manière suivante à partir de la fonction représentée Fig. 8: pour une concentration donnée de dinitrobenzène, on peut comparer la quantité de quencher supplémentaire D_P correspondant à l'inhibition du niveau ϕ_P à celle (D_I) qui correspondrait à l'inhibition sur le niveau ϕ_I . Cette comparaison est faite dans le Tableau I pour l'expérience de la Fig. 4 (intensité saturante). On voit que l'on a toujours $D_P > D_I$. Cela confirme bien l'impossibilité d'expliquer les effets observés par une intervention du *m*-dinitrobenzène comme quencher supplémentaire permanent (où l'on aurait $D_P = D_I$).

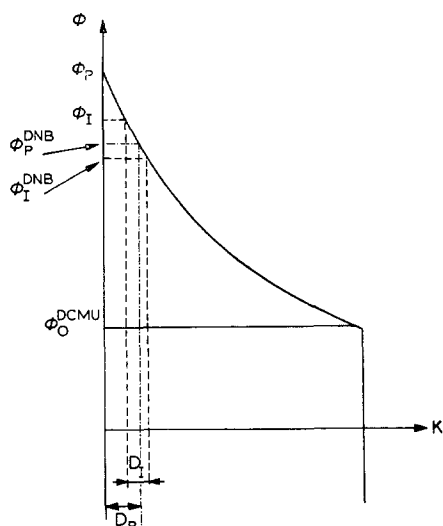


Fig. 8. Relation $\phi = f(K)$ d'après Bennoun¹⁵. La concentration de quencher K a été obtenue par cet auteur en mesurant l'aire complémentaire des montées photochimiques en DCMU à partir de chaque niveau ϕ (voir Malkin¹⁷). Les niveaux de fluorescence sont pris dans l'expérience de la Fig. 4 (intensité saturante). ϕ_P, ϕ_I = concentration nulle de dinitrobenzène. $\phi_P^{\text{DNB}}, \phi_I^{\text{DNB}}$ = dinitrobenzène 10^{-4} M. Les quantités D_P et D_I de "quencher équivalent" sont déterminées sur la figure comme la variation d'abscisse correspondant respectivement au passage de ϕ_P à ϕ_P^{DNB} et de ϕ_I à ϕ_I^{DNB} .

TABLEAU I

ESTIMATION DE L'INHIBITION DES NIVEAUX ϕ_P, ϕ_I PAR LES "CONCENTRATIONS ÉQUIVALENTES DE QUENCHER" D_P, D_I DÉTERMINÉES GRAPHIQUEMENT SUR LA FIG. 8 (VOIR TEXTE)

Concentration dinitrobenzène (M)	D_P (unités relatives)	D_I (unités relatives)
$1 \cdot 10^{-5}$	2	2
$3 \cdot 10^{-5}$	5	3
$1 \cdot 10^{-4}$	14	8
$2 \cdot 10^{-4}$	21	14

En intensité non saturante, on peut faire la même vérification graphique à partir des expériences des Figs 2 (où elle est évidente puisque ϕ_I ne varie pas jusqu'à 10^{-4} M) et 3. Il est vrai que dans le cas où l'intensité n'est pas saturante on ne doit plus s'attendre à avoir $D_P = D_I$ puisque la quantité de quenchers naturels présents en ϕ_I dépend alors de l'intensité (la difficulté peut être tournée pour ϕ_P en prenant (Fig. 2) le niveau ϕ_P DCMU où l'on a bien avec ou sans *m*-dinitrobenzène $[Q] = 0$; pour la Fig. 3, le problème ne se pose pas: en chloroplastes aux intensités utilisées le niveau ϕ_P correspond même en intensité non saturante à $[Q] = 0$). Cependant la présence d'un quencher supplémentaire se traduisant par une diminution de l'intensité vue par les centres, le niveau ϕ_I devrait être diminué plus fortement que de la quantité correspondant au quenching supplémentaire, autrement dit on devrait avoir $D_I > D_P$. Or, on vérifie facilement tant pour la Fig. 2 que pour la Fig. 3 que l'on a $D_P > D_I$.

On peut donc bien conclure dans tous les cas que l'on a une inhibition spécifique de la phase thermique par le *m*-dinitrobenzène aux faibles concentrations.

Cette constatation sera cohérente avec ce qui a été établi plus haut (l'exigence que le *m*-dinitrobenzène ne modifie pas l'activité photochimique) si l'on admet qu'il se substitue au quencher non photochimique R. Le *m*-dinitrobenzène bloquera bien alors la fluorescence au niveau ϕ_I , s'il n'est pas sensible à la réaction obscure qui, détruisant (réduisant) R, commandait la phase thermique. Ce quenching par le *m*-dinitrobenzène n'intervient que sur des excitons qui, de toute façon, auraient été perdus pour la photochimie (soit ils auraient disparu par quenching de R, soit ils auraient été émis par fluorescence), ce qui explique bien qu'on ne mesure aucune perte sensible d'activité avant 10^{-4} M de *m*-dinitrobenzène. En particulier, on comprend bien que la complémentarité entre phase thermique de fluorescence et jet d'oxygène soit mise en défaut par le *m*-dinitrobenzène: alors qu'à 10^{-4} M il a presque supprimé la phase thermique, la cinétique d'induction de la vitesse d'oxygène n'a subi aucune modification sensible.

Cette hypothèse d'un site bien défini de fixation du *m*-dinitrobenzène à faible concentration (remplacement de R) se trouve confirmée par l'effet différentiel d'un lavage d'algues incubées en présence de *m*-dinitrobenzène; on a dans ce cas persistance de l'effet sur la phase thermique, mais disparition de l'effet sur la phase photochimique.

Les résultats de l'action cumulée du *m*-dinitrobenzène et du DCMU sur l'émission d'oxygène et les déclin de fluorescence permettent d'exclure l'hypothèse selon laquelle le *m*-dinitrobenzène protégerait les centres qu'il a touchés de l'action du DCMU. Les expériences en *m*-dinitrobenzène et DCMU s'interprètent donc simplement en supposant que le DCMU ne détruit ou ne déconnecte que R et pas le *m*-dinitrobenzène qui lui est éventuellement substitué.

L'hypothèse d'une fixation irréversible sur le centre (action de Type 1) correspondant à l'action spécifique sur la phase thermique semble expliquer la majeure partie des résultats expérimentaux décrits dans cet article.

Toutefois elle ne permet pas d'expliquer ce qui se passe à plus forte concentration. On aurait donc affaire à une action différente (de Type 2) du *m*-dinitrobenzène se superposant à l'action de Type 1. L'action de Type 2 est réversible (expériences de lavage) et s'accompagne d'une inhibition des activités photochimiques (dégagement d'oxygène, phase photochimique de fluorescence, réaction de Hill, activité Système I)⁸. Cette hypothèse de deux modes d'action dont l'un seulement correspond à une fixation réversible rend bien compte de l'évolution lente décrite par la Fig. 5. Après addition, la fixation irréversible sur les centres déplace le *m*-dinitrobenzène vers les centres de sorte que l'on va tendre vers une accumulation pour l'action de Type 1 du *m*-dinitrobenzène disponible, au détriment de l'action de Type 2.

Une difficulté subsiste quant à l'explication des différences entre les expériences des Figs 2, 3 et 4. Sur algues (Figs 2 et 4), l'effet du *m*-dinitrobenzène sur le niveau ϕ_I est notable en intensité saturante alors qu'à faible intensité il est négligeable jusqu'à 10^{-4} M de *m*-dinitrobenzène. La sensibilité du niveau ϕ_I à l'intensité vue par les centres laisserait prévoir la situation inverse. En se fondant sur les travaux de Joliot^{14, 18} on peut proposer l'hypothèse suivante: on aurait non pas un, mais deux quenchers photochimiques fonctionnant alternativement, l'un (Q_1) rapidement réoxydable par A ($t_{1/2} \simeq 1$ ms) l'autre (Q_2) réoxydé beaucoup plus lentement ($t_{1/2} \simeq 100$ ms). Aux

intensités saturantes, le niveau ϕ_I correspondrait à la réduction de ces deux quenchers, alors qu'à intensité plus faible (temps de montée de la phase photochimique supérieur à la milliseconde) le niveau ϕ_I ne correspondrait qu'à la réduction de Q_2 . Une tendance du *m*-dinitrobenzène à se substituer à Q_1^- et non à Q_2^- pourrait expliquer l'inhibition de ϕ_I en forte lumière.

Dans un récent article, Joliot¹⁸ émet l'hypothèse d'une corrélation entre l'état d'oxydation du côté donneur du Système II (états S_0 , S_1 , S_2 , S_3 de Kok¹⁹) et les quenchers Q_1 et Q_2 . Nous avons tenté diverses expériences dans cette direction en cherchant à mettre en évidence une variation de l'action de Type I du *m*-dinitrobenzène selon la préparation du système (état S_1 principalement à l'obscurité, S_2 et S_3 après un ou deux flashes courts et saturants, équipartition des S après préillumination) sans parvenir à une confirmation claire des diverses hypothèses impliquées.

RÉSUMÉ

L'effet du *m*-dinitrobenzène sur les deux phases (photochimique et thermique) d'induction de fluorescence est étudiée dans différentes conditions. Le *m*-dinitrobenzène a une action d'inhibition spécifique de la phase thermique pour des concentrations $\leq 10^{-4}$ M.

On propose d'interpréter cet effet par une intervention du *m*-dinitrobenzène comme quencher non photochimique se fixant irréversiblement sur les centres où il se substitue au quencher non photochimique R de Delosme. Les effets observés à concentration plus élevée témoigneraient d'un second mode d'action du *m*-dinitrobenzène.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 P. Morin, *J. Chim. Phys.*, 61 (1964) 674.
- 2 R. Delosme, *Biochim. Biophys. Acta*, 143 (1967) 108.
- 3 L. N. M. Duysens et H. Sweers, *Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria*, University of Tokyo Press, Tokyo, 1963, p. 353.
- 4 P. Joliot, *Biochim. Biophys. Acta*, 102 (1965) 135.
- 5 R. Livingston and C. L. Ke, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 909.
- 6 F. W. J. Teale, *Biochim. Biophys. Acta*, 42 (1960) 69.
- 7 J. Ames et D. C. Fork, *Biochim. Biophys. Acta*, 143 (1967) 97.
- 8 J. Lavorel, C. Lemasson et A. L. Etienne, à paraître.
- 9 M. Avron, *Biochim. Biophys. Acta*, 40 (1960) 257.
- 10 J. Lavorel, *Photochem. Photobiol.*, 14 (1971) 261-275.
- 11 A. L. Etienne, à paraître.
- 12 P. Joliot, H. Hofnung et R. Chabaud, *J. Chim. Phys.*, 10 (1966) 1423.
- 13 P. Bennoun, Thèse, Paris, 1971.
- 14 P. Joliot, A. Joliot, B. Bouges et G. Barbieri, *Photochem. Photobiol.*, 14 (1971) 287.
- 15 A. Joliot et P. Joliot, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 258 (1964) 4622.
- 16 J. Lavorel et P. Joliot, *Biophys. J.*, 12 (1972) 815.
- 17 S. Malkin, *Biochim. Biophys. Acta*, 162 (1968) 392.
- 18 P. Joliot, 2nd Int. Congr. on Photosynthesis, Stresa, 1971, Dr W. Junk N.V. Publishers, The Hague, p. 26.
- 19 B. Kok, B. Forbush et M. M. McGloin, *Photochem. Photobiol.*, 11 (1970) 457.

Biochim. Biophys. Acta, 283 (1972) 268-278