

BBA 46482

RECHERCHE DU CYTOCHROME *b*-563 ET DU P700 CHEZ TROIS MUTANTS NON PHOTOSYNTHÉTIQUES DE *CHLAMYDOMONAS REINHARDTI*

JEANNINE MAROC et JACQUES GARNIER

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

(Reçu le 31 juillet, 1972)

SUMMARY

Studies of cytochrome b-563 and P 700 in three non-photosynthetic mutants of Chlamydomonas reinhardtii

An investigation into the presence of cytochrome *b*-563 and of P700 in three non-photosynthetic mutants (*Fl* 5, *Fl* 9, *Fl* 15) of *Chlamydomonas reinhardtii* was carried out. These three mutants exhibit several functional anomalies (described elsewhere), which indicate that the electron transport chain between the two photo-reactions is blocked. In addition, *Fl* 5 is unable to carry out any reaction related to System I.

Mutants *Fl* 9 and *Fl* 15 had less than 19% of the cytochrome *b*-563 content found in the wild type (which was about 0.27 mole per 100 moles chlorophyll); mutant *Fl* 5 had more than 80% of this content. The deficiencies (only traces) in bound cytochrome *c*-553, previously observed with mutants *Fl* 9 and *Fl* 15, but not *Fl* 5, were confirmed (in the wild type, there is about 0.20 mole bound cytochrome per 100 moles chlorophyll).

Photosystem I particles, prepared from wild type and mutants *Fl* 9 and *Fl* 15 chloroplast fragments, had about 2 (*Fl* 9, *Fl* 15) and 3 (wild type) moles P700 per 100 moles chlorophyll. Mutant *Fl* 5 particles showed neither P700 spectroscopic characteristics nor photooxidation activity; their chlorophyll *a/b* ratio was lower by a factor of 2 and protein/chlorophyll ratio about 8 times higher than in the wild type particles. This mutant appears to lack P700.

INTRODUCTION

Dans une récente publication¹, un certain nombre d'anomalies de fonctionnement, mises en évidence chez trois mutants non photosynthétiques de *Chlamydomonas reinhardtii* (souches *Fl* 5, *Fl* 9 et *Fl* 15), ont été étudiées en détail. Ces mutants, qui ont été isolés et sélectionnés dans notre laboratoire en raison de leur fluorescence anormale^{2,3}, ne peuvent effectuer ni photosynthèse en aérobiose, ni photoréduction en anaérobiose en présence d'H₂. Chez *Fl* 5, la réaction photochimique II fonctionne, mais le transport d'électrons apparaît bloqué après cette photoréaction et probablement près d'elle^{2,4}; en outre, ce mutant ne présente aucune activité de type Système I^{1,5}. Chez *Fl* 9 et *Fl* 15, les deux systèmes photochimiques sont fonctionnels, mais le transport d'électrons est interrompu entre les deux photoréactions^{1,2,4,5}. Les

analyses biochimiques et spectroscopiques, qui ont été effectuées précédemment, 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 sauvage⁶.

Le présent travail a pour but de compléter l'étude de l'appareil photosynthétique de chacun des mutants *Fl* 5, *Fl* 9, *Fl* 15, en recherchant deux constituants qui n'avaient pas pu être examinés jusqu'à présent: le cytochrome *b*-563, d'une part, et l'holochrome chlorophyllien P700, d'autre part.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Organismes et conditions de culture, techniques générales

Les souches de *C. reinhardtii* qui font l'objet du présent travail, mutants *Fl* 5, *Fl* 9 et *Fl* 15, isolés au laboratoire, et souche sauvage dont ils dérivent, ont déjà été décrites auparavant^{1,3,6}. Les algues de chacune de ces souches sont cultivées à la lumière, sur milieu Tris-acétate-phosphate⁷, comme indiqué précédemment^{1,6}.

Les fragments de chloroplastes sont préparés, après traitement des algues dans un oscillateur ultrasonique, selon la méthode de Levine et Gorman⁸.

Les chlorophylles *a* et *b* sont dosées spectrophotométriquement selon Mackinney⁹ et Arnon¹⁰. Les protéines sont dosées selon Lowry *et al.*¹¹. Pour toutes les mesures d'absorption, un spectrophotomètre enregistreur Cary 14 est utilisé.

Recherche des cytochromes dans les fragments de chloroplastes

Les cytochromes *b*-563 et *c*-553, présents dans les fragments de chloroplastes, sont solubilisés à l'aide de Triton X-100 et sont mis en évidence selon la méthode indiquée par Hind et Nakatani¹².

Pour les calculs de concentrations en cytochrome *b*-563, les hauteurs des pics à 563 nm sont mesurées, sur les spectres: réduit (par le Na₂S₂O₄) moins réduit (par l'ascorbate), par rapport à une ligne de base moyenne passant par les points situés à 575–580, 553, 540 et 527 nm, qui correspondent aux points isobestiques du cytochrome *b*-563 dans cette région^{12,13}. Pour le cytochrome *c*-553, les hauteurs des pics à 553,5 nm sont mesurées, sur les spectres: réduit (par l'hydroquinone) moins oxydé (par le K₃Fe(CN)₆), par rapport à une ligne joignant les points isobestiques situés à 542 et 561 nm^{12,14}. Les coefficients d'extinction utilisés sont de 20 cm²·μmole⁻¹ pour les cytochromes *b* et de 25 cm²·μmole⁻¹ pour le cytochrome *c*¹⁵.

Préparation et analyse de particules enrichies en P700

La méthode employée pour préparer des particules enrichies en P700, à partir de fragments de chloroplastes de *C. reinhardtii*, s'inspire pour l'essentiel du procédé classique utilisé et décrit par Vernon *et al.*¹⁶, pour la préparation de particules de type Système I d'épinard. Les fragments de chloroplastes, en suspension dans du tampon phosphate 0.01 M (pH 7.5), sont soumis à l'action de Triton X-100 (5% en poids) pendant 15 min, à la température de la pièce. Une première centrifugation à 30000 × *g* pendant 15 min, à 4 °C, permet d'éliminer un faible culot contenant de l'amidon; le surnageant est ensuite centrifugé pendant 5 h à 220000 × *g*; le culot

recueilli est alors extrait avec du tampon neuf pendant une nuit, puis il est centrifugé à $30\,000 \times g$ pendant 15 min. Le surnageant finalement obtenu constitue la fraction enrichie en P700.

L'holochrome chlorophyllien P700 est identifié et dosé au moyen de deux types de spectres de différence: lumière *moins* obscurité et oxydé (par le $K_3Fe(CN)_6$) *moins* réduit (par le $Na_2S_2O_4$); le coefficient d'extinction utilisé est de $60\text{ cm}^2 \cdot \mu\text{mole}^{-1}$ à 698 nm^{17} .

Les caroténoïdes sont extraits par l'éther éthylique, après saponification des particules dans un mélange méthanol-acétone-eau (2:2:1, v/v/v) renfermant 2.4% de KOH (en poids), à 40°C , pendant 15 min. Le β -carotène (*plus* traces d' α -carotène), d'une part, et l'ensemble des xanthophylles, d'autre part, sont séparés par chromatographie sur colonne d' Al_2O_3 ¹⁸ et dosés spectrophotométriquement^{18,19}.

Les cytochromes sont identifiés comme indiqué plus haut pour les fragments de chloroplastes. Les hèmes *a* et *b* sont extraits par l'acétone acide et sont identifiés sous forme d'hémochromogènes pyridiniques²⁰.

Les activités de photooxydation de cytochrome *c* réduit sont mesurées selon Plesničar et Bendall²¹, les particules enrichies en P700 étant placées en présence de cytochrome *c* de coeur de cheval (Calbiochem) réduit et, suivant les lots, de benzylviologène (Mann Research Laboratories) et de plastocyanine. L'oxydation du cytochrome *c* est suivie par mesure de l'absorbance à 551 nm ; le coefficient d'extinction utilisé est de $21.1\text{ cm}^2 \cdot \mu\text{mole}^{-1}$ (réf. 22). La plastocyanine est préparée, à partir de feuilles d'épinard, et purifiée, par chromatographie sur DEAE-cellulose, selon Katoh *et al.*²³.

RÉSULTATS

Cytochromes des fragments de chloroplastes

Sur la Fig. 1 sont représentés les divers spectres de différence d'un surnageant $S_{30\,000}$ et d'un culot $C_{30\,000}$, obtenus après centrifugation à $30\,000 \times g$, pendant 1 h, de fragments de chloroplastes de la souche sauvage traités par du Triton X-100 (1 à 2%). La Fig. 2 montre les spectres: réduit (par le $Na_2S_2O_4$) *moins* réduit (par l'ascorbate), de culots $C_{220\,000}$ recueillis après centrifugation à $220\,000 \times g$, pendant 8 h, de surnageants $S_{30\,000}$ provenant de la souche sauvage et des mutants *Fl 5*, *Fl 9* et *Fl 15*. Ces spectres sont comparables à ceux qui ont été publiés par Hind et Nakatani¹², pour des fractions analogues préparées à partir de chloroplastes d'épinard. Ils permettent de mettre en évidence, séparément, le cytochrome *b*-563 caractérisé par ses maximums à 563 et à $533\text{ nm}^{12,13}$, le cytochrome *b*-559, qui présente un maximum à $559\text{--}560\text{ nm}^{6,12}$, et le cytochrome *c*-553 dont le pic est à $553.5\text{ nm}^{6,12}$.

On voit (Fig. 1) que le surnageant $S_{30\,000}$ contient pratiquement tout le cytochrome *b*-563 et tout le cytochrome *c*-553 initialement présents dans les fragments de chloroplastes. On retrouve, par contre, du cytochrome *b*-559 à la fois dans le surnageant $S_{30\,000}$ et dans le culot $C_{30\,000}$. Les culots $C_{220\,000}$ constituent des fractions très purifiées et leurs spectres (Fig. 2) indiquent nettement la présence de cytochrome *b*-563 dans les fragments de chloroplastes des quatre souches étudiées, en plus faible concentration, apparemment, pour *Fl 9* et pour *Fl 15* que pour *Fl 5* et pour la souche sauvage. Les teneurs globales de chaque souche en cytochrome *b*-563 et en cytochrome *c*-553 ont été calculées approximativement à partir des spectres des surnageants

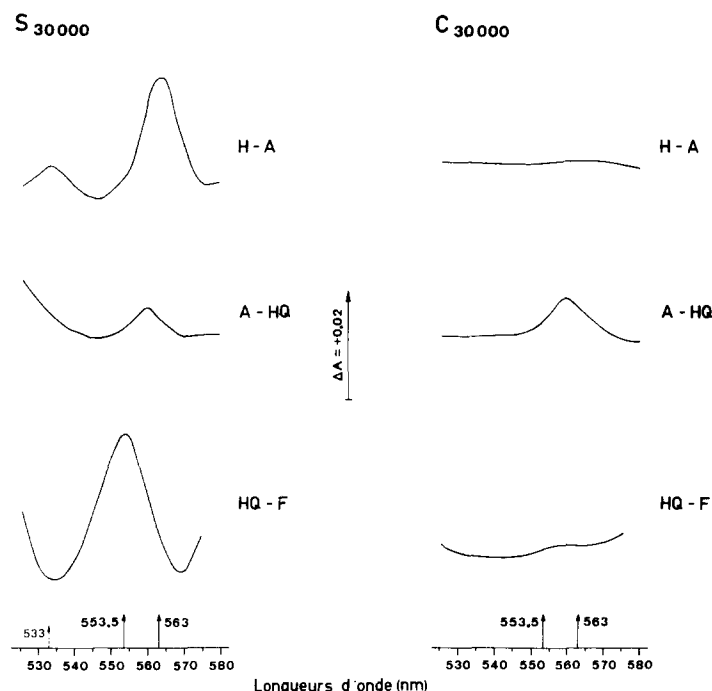


Fig. 1. Spectres de différence d'un surnageant S_{30000} et d'un culot C_{30000} , obtenus à partir de fragments de chloroplastes de la souche sauvage de *C. reinhardtii*. H-A: réduit (par le $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) moins réduit (par l'ascorbate); A-HQ: réduit (par l'ascorbate) moins réduit (par l'hydroquinone); HQ-F: réduit (par l'hydroquinone) moins oxydé (par le $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$). S_{30000} et C_{30000} : surnageant et culot obtenus après centrifugation à $30000 \times g$, pendant 1 h, de fragments de chloroplastes traités par du Triton X-100 à 1-2%; le culot est en suspension dans du tampon phosphate 0.01 M (pH 7.5); la concentration du S_{30000} correspond à 200 et celle du C_{30000} à 98 μg de chlorophylles $a+b/\text{ml}$. Pour la mesure de ces spectres, des lames de verre opalin sont accolées aux cuves du spectrophotomètre, selon Shibata *et al.*³⁴. Maximums à 533 et 563 nm: cytochrome b -563, à 559-560: cytochrome b -559, à 553.5 nm: cytochrome c -553.

S_{30000} . Il n'a pas été possible, par contre, de doser de façon satisfaisante le cytochrome b -559, en majeure partie contenu dans les culots C_{30000} très riches en pigments.

Les résultats des dosages concernant les cytochromes b -563 et c -553 sont indiqués dans le Tableau I. On voit que le mutant *Fl 5* a une teneur en cytochrome b -563 voisine de celle de la souche sauvage, quoique légèrement plus faible; il n'en est pas de même pour les mutants *Fl 9* et *Fl 15* qui apparaissent très appauvris en ce cytochrome, leurs teneurs ne représentant, en effet, que moins de 19% (*Fl 9*) et moins de 8% (*Fl 15*) de celle de la souche sauvage. En ce qui concerne le cytochrome c -553, les teneurs obtenues ici, avec les surnageants S_{30000} , confirment nettement celles qui avaient été déterminées précédemment pour le cytochrome c -553 insoluble, avec des cellules extraites par de l'acétone puis par un tampon phosphate⁶. Il est donc vérifié que les mutants *Fl 9* et *Fl 15* sont déficients en cytochrome c -553 lié, dont ils ne présentent que des traces non mesurables.

La teneur en cytochrome b -563 de la souche sauvage est plus faible que celle (0.63 nmole/100 nmoles de chlorophylles $a+b$), qui a été mesurée à partir de poudres

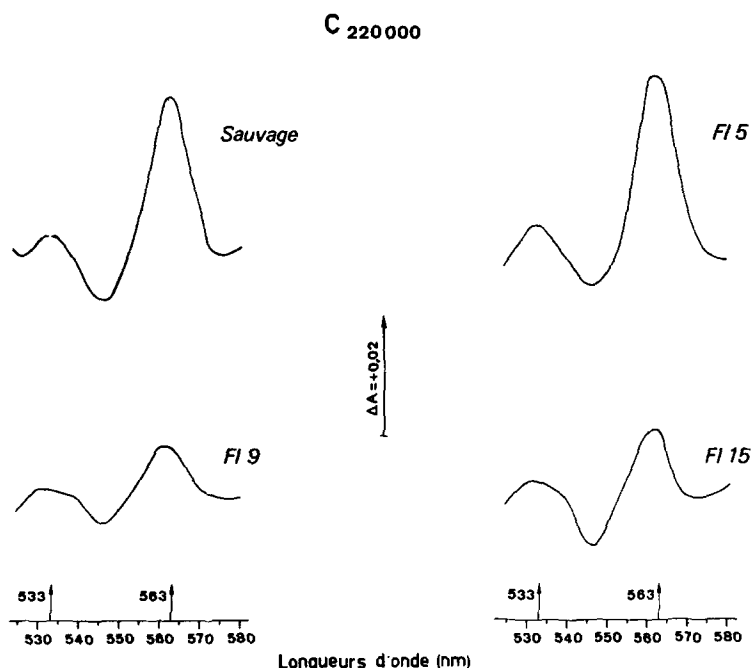


Fig. 2. Spectres de différence de culots C_{220000} , obtenus à partir de fragments de chloroplastes de *C. reinhardtii* (souche sauvage et mutants *Fl 5*, *Fl 9*, *Fl 15*): réduit (par le $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) moins réduit (par l'ascorbate). C_{220000} : culots résultant de la centrifugation à $220000 \times g$, pendant 8 h, des surnageants S_{30000} obtenus après traitement de fragments de chloroplastes par du Triton X-100 à 1–2%. Les culots sont en suspension dans du tampon phosphate 0.01 M (pH 7.5) à des concentrations correspondant à 203 (Sauvage), 147 (*Fl 5*), 125 (*Fl 9*) et 116 (*Fl 15*) μg de chlorophylles $a+b/\text{ml}$. Pour la mesure de ces spectres, des lames de verre opalin sont accolées aux cuves du spectrophotomètre, selon Shibata *et al.*³⁴. Maximums à 533 et 563 nm: cytochrome *b*-563.

TABLEAU I

TENEURS EN CYTOCHROMES *b*-563 ET *c*-553 DES FRAGMENTS DE CHLOROPLASTES DE LA SOUCHE SAUVAGE ET DES MUTANTS *Fl 5*, *Fl 9*, *Fl 15* DE *C. REINHARDTI*

Les teneurs sont exprimées en: nmoles/100 nmoles de chlorophylles $a+b$. Les valeurs indiquées sur les deux premières lignes sont calculées à partir des spectres de différence d'absorption des surnageants S_{30000} , obtenus après centrifugation à $30000 \times g$, pendant 1 h, de fragments de chloroplastes traités par du Triton X-100 à 1–2% (voir Méthodes et réf. 12); elles sont des moyennes correspondant à deux séries de mesures, effectuées à partir de récoltes d'algues différentes. Dernière ligne, entre parenthèses: rappel des valeurs obtenues antérieurement pour le cytochrome *c*-553 insoluble, avec des cellules extraites par de l'acétone puis par un tampon phosphate⁶.

	Souche sauvage	Mutants		
		<i>Fl 5</i>	<i>Fl 9</i>	<i>Fl 15</i>
Cytochrome <i>b</i> -563	0.27	0.22	0.05	0.02
Cytochrome <i>c</i> -553	0.21	0.14	Traces	Traces
(Cytochrome <i>c</i> -553 insoluble ⁶)	(0.20)	(0.12)	(Traces)	(Traces)

acétoniques d'algues, par Levine et Armstrong²⁴. Cependant, les rapports: teneur en cytochrome *b*-563/teneur en cytochrome *c*-553, de 1.3 dans le cas de la souche sauvage et de 1.6 dans celui de *Fl* 5, sont sensiblement du même ordre de grandeur que ceux, variant entre 1.3 et 2.1, qui ont été mesurés par différents auteurs pour des chloroplastes de plantes supérieures ou pour diverses fractions subchloroplastiques de type Système I^{12,17,25,26}.

Composition pigmentaire des particules enrichies en P700

La Fig. 3 montre les spectres d'absorption respectifs de fragments de chloroplastes de la souche sauvage, d'une part, et de particules enrichies en P700 obtenues à partir de ces fragments de chloroplastes, après action de Triton X-100, d'autre part: les épaulements situés vers 470 nm et vers 650 nm, nettement prononcés sur le spectre des fragments de chloroplastes, sont à peine visibles sur le spectre des particules enrichies en P700. Ceci témoigne d'un appauvrissement relatif des particules en chlorophylle *b* et en caroténoïdes.

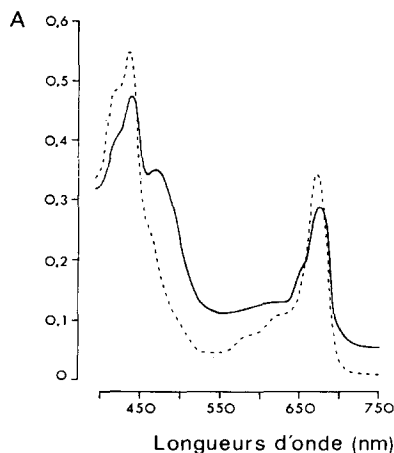


Fig. 3. Spectres d'absorption de fragments de chloroplastes (—) et de particules enrichies en P700 (-----), préparées à partir de la souche sauvage de *C. reinhardtii*. Les fragments de chloroplastes et les particules sont en suspension dans du tampon phosphate 0.01 M (pH 7.5), à des concentrations correspondant à 6.5 μ g de chlorophylles *a* + *b*/ml. On peut noter que, sur le spectre des particules enrichies en P700, les épaulements situés vers 470 et 650 nm, caractéristiques de la chlorophylle *b*, sont extrêmement réduits.

Les spectres de différence: oxydé (par le $K_3Fe(CN)_6$) moins réduit (par le $Na_2S_2O_4$), des particules préparées à partir des différentes souches *Fl* 5, *Fl* 9, *Fl* 15 et sauvage, sont reproduits sur la Fig. 4. Les spectres obtenus pour les mutants *Fl* 9 et *Fl* 15 et pour la souche sauvage sont analogues: tous les trois présentent nettement un pic négatif principal à 695 nm et un petit pic négatif à 675–680 nm, caractéristiques de l'holochrome P700^{17,27–29}. Des pics similaires ont aussi été obtenus, de manière réversible, sur des spectres: lumière moins obscurité. Par contre, ces pics à 695 et 675–680 nm sont inexistantes sur le spectre des particules de *Fl* 5, qui ne présente qu'un large minimum vers 670–675 nm dû aux chlorophylles collectrices^{27,30}.

Les résultats des dosages de pigments et de protéines, effectués pour les frag-

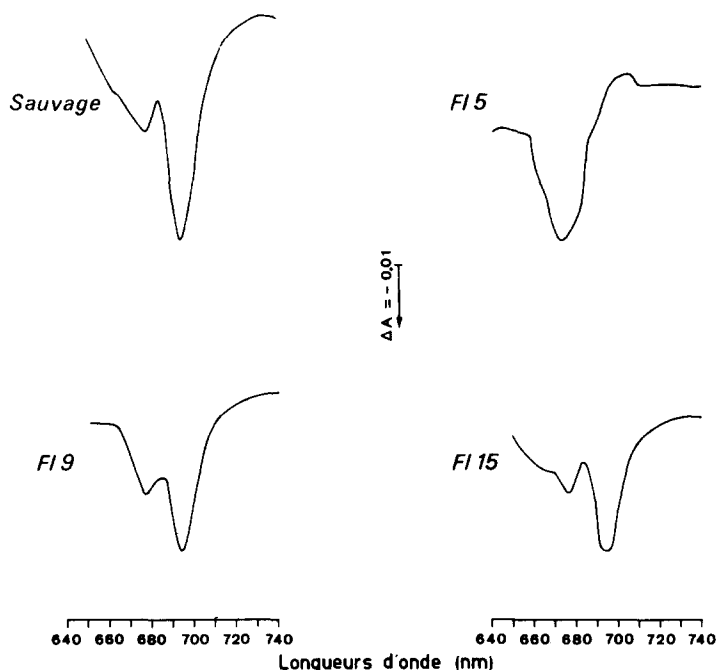


Fig. 4. Spectres de différence de particules enrichies en P700 de *C. reinhardtii* (souche sauvage et mutants *Fl 5*, *Fl 9*, *Fl 15*): oxydé (par le $K_3Fe(CN)_6$) moins réduit (par le $Na_2S_2O_4$). Les particules sont en suspension dans du tampon phosphate 0.01 M (pH 7.5), à des concentrations correspondant à 13 (Sauvage), 23 (*Fl 5*), 14.4 (*Fl 9*) et 17.5 (*Fl 15*) μg de chlorophylles *a* + *b*/ml. Sauvage, *Fl 9* et *Fl 15*: le pic négatif principal à 695 nm et le pic négatif secondaire vers 675–680 nm correspondent à l'holochrome P700; *Fl 5*: le large pic négatif vers 670–675 nm correspond à l'ensemble des molécules de chlorophylles collectrices.

ments de chloroplastes et pour les particules enrichies en P700 des différentes souches, sont rassemblés dans le Tableau II. On voit que, par rapport à la composition des fragments de chloroplastes dont elles proviennent, les particules obtenues à partir des souches sauvage, *Fl 9* et *Fl 15* présentent les caractéristiques suivantes: (1) rapport chlorophylle *a*/chlorophylle *b* environ deux fois plus élevé; (2) teneurs en β -carotène plus faibles et teneurs en xanthophylles fortement diminuées, d'où des rapports β -carotène/xanthophylles de deux (*Fl 9*, *Fl 15*) à trois (sauvage) fois plus élevés; (3) teneurs en protéines, par rapport aux chlorophylles, trois à quatre fois plus grandes. Les trois souches ont des teneurs en P700 voisines, quoiqu'un peu plus faibles pour les mutants *Fl 9* et *Fl 15* que pour la souche sauvage. On peut aussi noter que les compositions de ces particules de *C. reinhardtii* sont intermédiaires entre celles des particules TSF 1 et HP700 préparées, sans ou avec extraction préalable des caroténoïdes par l'hexane, à partir de chloroplastes d'épinard, par Vernon *et al.*³¹ et par Yamamoto et Vernon¹⁷ (voir Tableau II); la teneur en P700 des particules de souche sauvage est comparable à celle des particules HP700. Par contre, les résultats sont différents pour les particules du mutant *Fl 5*, dans lesquelles il n'a pas été possible de détecter spectroscopiquement du P700, dont le rapport chlorophylle *a*/chlorophylle *b* et la teneur en β -carotène sont sensiblement les mêmes que ceux des fragments de

TABLEAU III

PHOTOXYDATION DE CYTOCHROME *c* EXOGENE PAR LES FRAGMENTS DE CHLOROPLASTES DE LA SOUCHE SAUVAGE ET PAR LES PARTICULES ENRICHIES EN P700 DE LA SOUCHE SAUVAGE ET DES MUTANTS *Fl 5*, *Fl 9*, *Fl 15* DE *C. REINHARDTI*

Les résultats sont exprimés en: μ moles de cytochrome *c* photooxydé/min par mg de chlorophylles *a + b*. Les fragments de chloroplastes ainsi que les particules enrichies en P700 sont mis en suspension, à une concentration correspondant à 5 μ g de chlorophylles *a + b*/ml, dans le milieu suivant: tampon phosphate $3.3 \cdot 10^{-3}$ M (pH 7.5), $MgCl_2$ $3.3 \cdot 10^{-4}$ M, NaCl $3.3 \cdot 10^{-4}$ M, KCN $1 \cdot 10^{-3}$ M, cytochrome *c* de coeur de cheval réduit $2.7 \cdot 10^{-5}$ M. En outre, dans le cas des fragments de chloroplastes uniquement, de la digitonine (0.13 mg/ml) est ajoutée au mélange réactionnel. Lumière actinique rouge ($\lambda > 610$ nm): $4.7 \cdot 10^3$ ergs \cdot cm $^{-2}$ \cdot s $^{-1}$).

Additions	Fragments de chloroplastes Souche sauvage	Particules enrichies en P700			
		Souche sauvage	Mutants		
			<i>Fl 5</i>	<i>Fl 9</i>	<i>Fl 15</i>
Néant	0	1.0	0	0.6	0.8
+ plastocyanine ($4.7 \cdot 10^{-7}$ M)	0.1	1.1	0	0.7	0.8
+ benzylviologène ($4.1 \cdot 10^{-6}$ M)	0	2.2	0	2.0	2.4
+ benzylviologène ($4.1 \cdot 10^{-6}$ M) + plastocyanine ($4.7 \cdot 10^{-7}$ M)	0.7	2.3	0	2.1	2.3

chloroplastes, et qui sont relativement moins appauvries en xanthophylles que dans le cas des autres souches. En outre, pour une même quantité de chlorophylles, ces particules de *Fl 5* renferment sept à huit fois plus de protéines que les particules des autres souches; ce qui indique qu'elles sont relativement très peu pigmentées.

Activité photochimique des particules enrichies en P700

Les résultats des divers essais d'activité de photooxydation de cytochrome *c* exogène, effectués avec des fragments de chloroplastes de souche sauvage et avec des particules enrichies en P700 de chacune des quatre souches, sont indiqués dans le Tableau III. Avec les fragments de chloroplastes de souche sauvage, traités par de la digitonine dans le mélange réactionnel lui-même, la réaction n'a lieu que si de la plastocyanine exogène est ajoutée au milieu; de plus, elle ne devient importante qu'en présence de benzylviologène. Par contre, avec les particules enrichies en P700 de la même souche sauvage, la réaction a lieu en l'absence de plastocyanine exogène et de benzylviologène avec une vitesse importante. Si l'on ajoute du benzylviologène, la réaction devient environ deux fois plus rapide; mais l'addition de plastocyanine n'est plus nécessaire et ne change rien au déroulement de la réaction. Il semble que le fractionnement des lamelles chloroplastiques par le Triton X-100 rende possible, d'une part, un transfert direct des électrons du cytochrome *c* au P700, l'intervention d'un pont de plastocyanine exogène devenant alors inutile, et facilite, d'autre part, une réaction directe entre l'O $_2$ de l'air et le réducteur du Système I (voir réf. 32), sans intervention du benzylviologène.

L'examen du Tableau III montre que les particules des mutants *Fl 9* et *Fl 15* sont capables de photooxyder le cytochrome *c* exogène comme les particules de

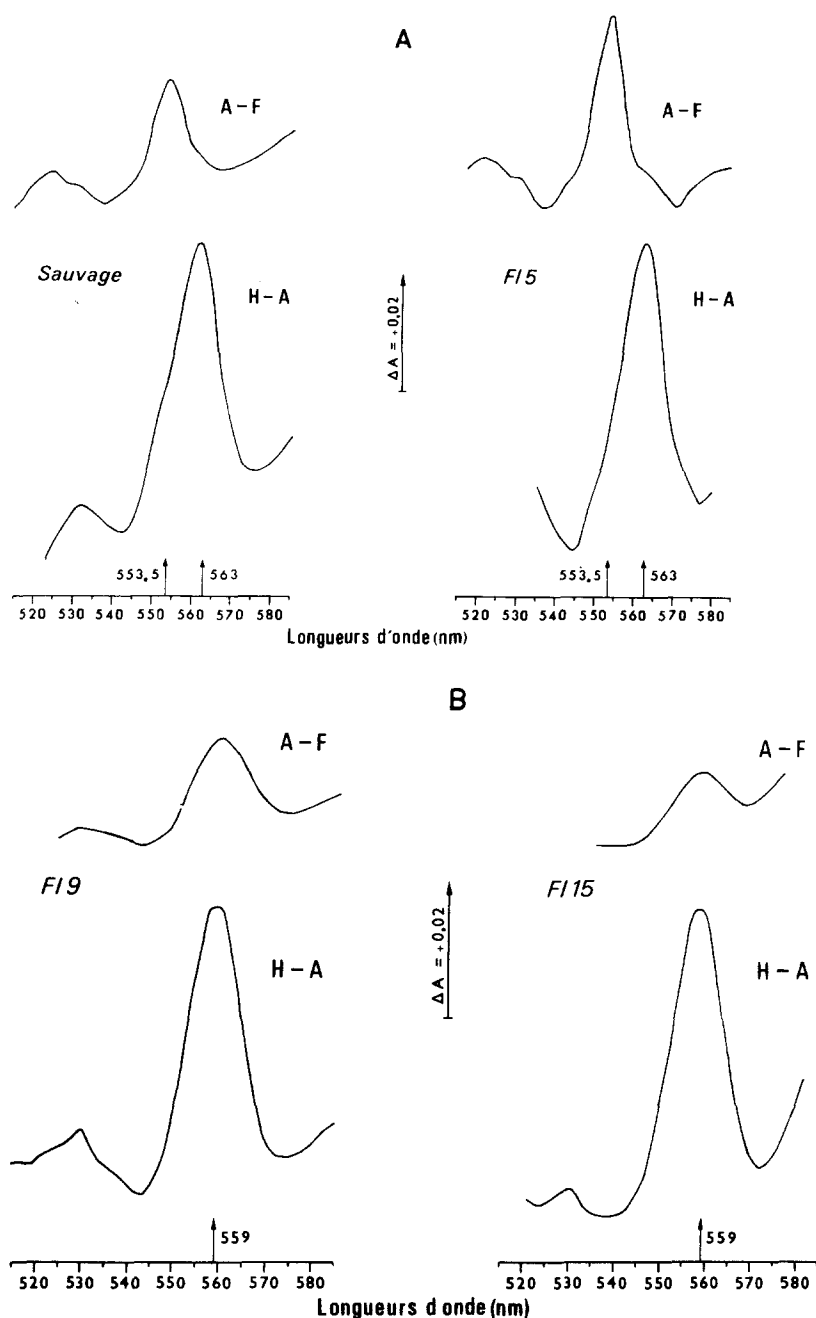


Fig. 5. Spectres de différence de particules enrichies en P700 de *C. reinhardtii* (souche sauvage et mutants Fl 5, Fl 9, Fl 15). A-F: réduit (par l'ascorbate) moins oxydé (par le $K_3Fe(CN)_6$); H-A: réduit (par le $Na_2S_2O_4$) moins réduit (par l'ascorbate). Les particules sont en suspension dans du tampon phosphate 0.01 M (pH 7.5), à des concentrations correspondant à 121 (Sauvage), 56 (Fl 5), 115 (Fl 9) et 175 (Fl 15) μg de chlorophylles *a* + *b*/ml. Maximums à 553.5 nm: cytochrome *c*-553, à 563 nm: cytochrome *b*-563, à 559-560 nm: cytochrome de type *b*.

souche sauvage, malgré l'absence des cytochromes *b*-563 et *c*-553 chez les mutants: les vitesses sont comparables pour les trois souches. Mais l'on constate qu'au contraire, les particules obtenues à partir du mutant *Fl* 5 sont totalement incapables de réaliser une photooxydation de cytochrome *c* exogène, même en présence de plastocyanine et de benzylviologène. Une telle incapacité avait déjà été observée précédemment avec des fragments de chloroplastes de *Fl* 5^{1,5}.

Cytochromes des particules enrichies en P700

Les Figs. 5A et 5B montrent des spectres de différence obtenus avec des particules enrichies en P700 de chacune des souches étudiées.

Pour la souche sauvage et le mutant *Fl* 5 (Fig. 5A), les spectres indiquent nettement la présence dans les particules de cytochrome *c*-553 [maximums à 553.5 nm, sur les spectres: réduit (par l'ascorbate) *moins* oxydé (par le $K_3Fe(CN)_6$)] et de cytochrome *b*-563 [maximums à 563 nm, sur les spectres: réduit (par le $Na_2S_2O_4$) *moins* réduit (par l'ascorbate)]. Mais pour les mutants *Fl* 9 et *Fl* 15 (Fig. 5B), les deux sortes de spectres ne montrent que des maximums situés vers 559–560 nm.

Par ailleurs, l'extraction des hèmes et leur identification sous forme d'hémochromogènes pyridiniques ont permis de mettre en évidence la présence de hème *a* et de hème *b* dans les particules de chacune des souches: la Fig. 6 montre, à titre d'exemple, le spectre de différence d'une solution d'hémochromogènes pyridiniques préparée à partir de particules de *Fl* 9. Il a, en outre, été constaté que les particules des quatre souches présentent à l'obscurité une nette activité cytochrome-oxydasique, qui est inhibée par le KCN; ce qui confirme la présence de cytochrome *a* d'origine mitochondriale.

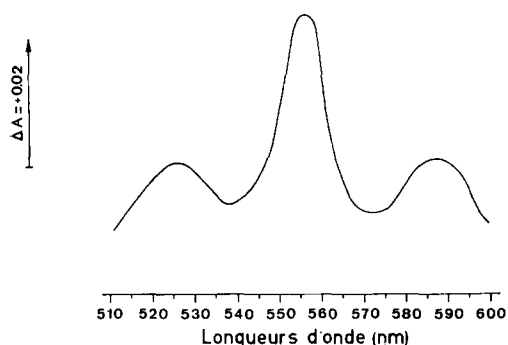


Fig. 6. Spectre de différence d'une solution d'hémochromogènes pyridiniques, préparée à partir de particules enrichies en P700 du mutant *Fl* 9 de *C. reinhardtii*: réduit (par le $Na_2S_2O_4$) *moins* oxydé (par le $K_3Fe(CN)_6$). Les hémochromogènes contenus dans un ml de solution correspondent aux hèmes extraits, par de l'acétone acide, à partir d'une quantité de particules enrichies en P700 renfermant 187 μg de chlorophylles *a* + *b*. Ce spectre témoigne de la présence de cytochrome *b* (maximums vers 526 et 557 nm^{20,26}) et de cytochrome *a* (maximum vers 587 nm^{20,35}) dans la préparation de particules initiale.

La présence de hème *b* dans les particules montre que les maximums à 559–560 nm observés sur les spectres de particules de *Fl* 9 et de *Fl* 15 (Fig. 5B), de hauteurs nettement différentes selon que le réducteur est l'ascorbate ou le $Na_2S_2O_4$, correspondent à deux cytochromes de type *b*, ou à deux formes d'un même cytochrome,

de potentiels d'oxydo-réduction différents. Il est possible qu'une fraction importante du cytochrome *b*-559 chloroplastique, qui peut présenter *in vitro* une forme réductible par l'ascorbate et une forme réductible uniquement par le $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ^{12,25}, soit solubilisée par le Triton X-100 à 5%. Il est aussi possible que le cytochrome *b* absorbant à 559–560 nm provienne, en partie ou en totalité, des mitochondries. Dans un cas comme dans l'autre, la bande d'absorption de ces cytochromes, à 559–560 nm, pourrait être masquée par celles des cytochromes *c*-553 et *b*-563, à 553.5 et 563 nm, sur les spectres de la Fig. 5A. Probablement en partie pour cette raison, il n'a pas été possible de réaliser des dosages significatifs des différents cytochromes présents dans les particules de chacune des souches examinées.

DISCUSSION

Les renseignements obtenus au cours de ce travail complètent les données d'ordre analytique, que l'on possède sur les souches *Fl* 5, *Fl* 9 et *Fl* 15.

Les résultats concernant l'analyse des fragments de chloroplastes, ainsi que celle des particules enrichies en P700, indiquent très nettement que les mutants *Fl* 9 et *Fl* 15 sont fortement déficients en cytochrome *b*-563; ils confirment, en outre, l'absence de cytochrome *c*-553 lié chez ces souches, qui avait été observée antérieurement⁶. Il est également confirmé que ces deux cytochromes, *b*-563 et *c*-553, ne sont pas indispensables au déroulement de certaines réactions caractéristiques de l'activité du système photochimique I *in vitro*, telles que la photooxydation de cytochrome *c* exogène.

Les particules préparées à partir du mutant *Fl* 5, contrairement à celles obtenues à partir des autres souches, ne présentent aucune des caractéristiques spectroscopiques et fonctionnelles du P700; de plus, ces particules apparaissent très pauvres en pigments chlorophylliens et ont un rapport chlorophylle *a*/chlorophylle *b* semblable à celui des fragments de chloroplastes. Ces faits, ainsi que les résultats obtenus auparavant qui montrent que la souche *Fl* 5 est incapable de toute réaction de type Système I^{1,5}, indiquent très nettement que le mutant *Fl* 5 ne possède pas de P700, holochrome chlorophyllien effecteur de la réaction photochimique I. On peut remarquer, à ce sujet, que *Fl* 5 diffère totalement du mutant 8 de *Scenedesmus*, chez lequel une culture prolongée à la lumière rétablit les activités photosynthétiques liées au P700³³; en effet, la souche *Fl* 5 a toujours été cultivée à la lumière depuis son isolement (réalisé en 1967).

Les relations possibles entre les déficiences, d'une part, et les anomalies de fonctionnement, d'autre part, qui sont présentées par chacun des mutants, ont été étudiées et discutées par ailleurs^{1,6}: dans chaque cas, l'existence d'un défaut de structure, affectant la membrane chloroplastique, paraît l'explication la plus probable. Les études, qui ont déjà été effectuées avec les mutants *Fl* 5, *Fl* 9 et *Fl* 15, ont permis de dégager des renseignements concernant le mécanisme de la photosynthèse et de faire quelques hypothèses de travail susceptibles de développements. Dans la même voie, des recherches sont encore nécessaires et vont être poursuivies.

RÉSUMÉ

Des analyses sont effectuées, afin de rechercher la présence de cytochrome *b*-563 et de P700 chez trois mutants non photosynthétiques (*Fl* 5, *Fl* 9, *Fl* 15) de

Chlamydomonas reinhardtii. Ces trois mutants présentent un certain nombre d'anomalies fonctionnelles (étudiées par ailleurs), qui indiquent que la chaîne de transport d'électrons est bloquée entre les deux réactions photochimiques. En outre, *Fl 5* n'est capable de réaliser aucune réaction de type Système I.

Les mutants *Fl 9* et *Fl 15* ont des teneurs en cytochrome *b-563* très faibles (moins de 19%) par rapport à celle de la souche sauvage (environ 0.27 mole/100 moles de chlorophylles *a+b*); la teneur du mutant *Fl 5*, par contre, est voisine (plus de 80%) de celle de la souche sauvage. De plus, les déficiences des mutants *Fl 9* et *Fl 15* en cytochrome *c-553* lié (dont ils ne présentent que des traces), déjà constatées antérieurement, sont confirmées; la teneur du mutant *Fl 5* en ce cytochrome représente environ les deux tiers de celle de la souche sauvage (0.20 mole/100 moles de chlorophylles *a+b*).

Des particules chloroplastiques, de type enrichies en système photochimique I, sont préparées à partir des quatre souches et sont étudiées. Celles des mutants *Fl 9* et *Fl 15* renferment environ 2 et celles de la souche sauvage environ 3 moles de P700/100 moles de chlorophylles *a+b*. Mais, par ailleurs, les particules du mutant *Fl 5* ne présentent aucune des caractéristiques spectroscopiques du P700, ni aucune activité de photooxydation de cytochrome *c*; leur rapport chlorophylle *a*/chlorophylle *b* est deux fois plus faible et leur rapport protéines globales/chlorophylles *a+b* est environ 8 fois plus élevé, que dans le cas des particules de souche sauvage. Ce mutant *Fl 5* est donc vraisemblablement dépourvu de P700.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient sincèrement Mademoiselle T. Taverny pour l'excellente aide technique qu'elle leur a apportée au cours de ce travail, aussi bien pour les cultures d'algues que pour les analyses.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Garnier, J. et Maroc, J. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 283, 100-114
- 2 Garnier, J., de Kouchkovsky, Y. et Lavorel, J. (1968) *Séanc. Soc. Biol. Fr.* 162, 365-368
- 3 Garnier, J. (1970) dans *Prediction and Measurement of Photosynthetic Productivity*, pp. 543-549, Pudoc, Wageningen
- 4 De Kouchkovsky, Y. (1969) dans *Progress in Photosynthesis Research* (Metzner, H., éd.), Vol. 2, pp. 959-970, H. Laupp, Jr., Tübingen
- 5 Garnier, J. et Maroc, J. (1972) *Proc. 2nd Int. Congr. on Photosynthesis Research*, Vol. 1, pp. 669-675, Dr W. Junk N.V. Publ., The Hague
- 6 Garnier, J. et Maroc, J. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 205, 205-219
- 7 Gorman, D. S. et Levine, R. P. (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 54, 1665-1669
- 8 Levine, R. P. et Gorman, D. S. (1966) *Plant Physiol.* 41, 1293-1300
- 9 MacKinney, G. (1941) *J. Biol. Chem.* 140, 315-322
- 10 Arnon, D. I. (1949) *Plant Physiol.* 24, 1-15
- 11 Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. et Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- 12 Hind, G. et Nakatani, H. Y. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 216, 223-225
- 13 Weikard, J. (1968) *Z. Naturforsch.* 23b, 235-238
- 14 Gorman, D. S. et Levine, R. P. (1966) *Plant Physiol.* 41, 1643-1647
- 15 Lundegårdh, H. (1962) *Physiol. Plant.* 15, 390-398
- 16 Vernon, L. P., Shaw, E. R. et Ke, B. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 4101-4109
- 17 Yamamoto, H. Y. et Vernon, L. P. (1969) *Biochemistry* 8, 4131-4137

- 18 Krinsky, N. I. et Levine, R. P. (1964) *Plant Physiol.* 39, 680–687
- 19 Davies, B. H. (1965) dans *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments* (Goodwin, T. W., éd.), pp. 489–532, Academic Press, London
- 20 Rieske, J. S. (1967) dans *Methods in Enzymology* (Colowick, S. P. et Kaplan, N. O., éd.), Vol. 10, pp. 488–493, Academic Press, New York
- 21 Plesničar, M. et Bendall, D. S. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 216, 192–199
- 22 Van Gelder, B. F. et Slater, E. C. (1962) *Biochim. Biophys. Acta* 58, 593–595
- 23 Katoh, S., Suga, I., Shiratori, I. et Takamiya, A. (1961) *Arch. Biochem. Biophys.* 94, 136–141
- 24 Levine, R. P. et Armstrong, J. (1972) *Plant Physiol.* 49, 661–662
- 25 Boardman, N. K. et Anderson, J. M. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 143, 187–203
- 26 Nelson, N. et Neumann, J. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 1817–1824
- 27 Kok, B. (1961) *Biochim. Biophys. Acta* 48, 527–533
- 28 Hiyama, T. et Ke, B. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 267, 160–171
- 29 Ogawa, T. et Vernon, L. P. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 197, 292–301
- 30 Vernon, L. P., Ke, B. et Shaw, E. R. (1967) *Biochemistry* 6, 2210–2220
- 31 Vernon, L. P., Ke, B., Mollenhauer, H. H. et Shaw, E. R. (1969) dans *Progress in Photosynthesis Research* (Metzner, H. éd.), Vol. 1, pp. 137–148, T. H. Laupp, Jr., Tübingen
- 32 Kok, B., Rurainski, H. J. et Harmon, E. A. (1964) *Plant Physiol.* 39, 513–520
- 33 Gee, R., Saltman, P. et Weaver, E. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 189, 106–115
- 34 Shibata, K., Benson, A. A. et Calvin, M. (1954) *Biochim. Biophys. Acta* 15, 461–470
- 35 Hiyama, T., Nishimura, M. et Chance, B. (1969) *Plant Physiol.* 44, 527–534