

BBA 46556

ETUDE CINETIQUE DE LA SYNTHESE D'ATP *IN VIVO* EN LUMIERE MONO- ET BICHROMATIQUE CHEZ *ZEA MAYS*: EFFET ANTAGONISTE ROUGE-ROUGE LOINTAIN

J. P. MICHEL et P. THIBAULT

Commissariat à l'Energie Atomique, Département de Biologie, Service de Radioagronomie, CEN-Cadarache, BP 1-13 115 Saint-Paul-Lez-Durance (France)

SUMMARY

A kinetic study of in vivo ATP synthesis during mono- or bichromatic illumination of Zea mays: Red-far red antagonist effect

The induction phenomenon of photosynthesis can be studied with detached *Zea mays* leaves using a cyclic experimental procedure.

1. In anaerobic conditions, photosynthetic oxygen is evolved but only after a variable lag time which depends on the wavelength of illumination (it is the activation process of oxygen release).

2. During the lag time, net ATP synthesis reaches a constant level for 1 min and then increases again during oxygen evolution.

3. The antagonist effect between red and far red light, exhibited by oxygen release, also is manifested by net ATP synthesis. Photophosphorylation is partly inhibited by bichromatic light of (650+740) nm compared with respective monochromatic light of 650 and 740 nm.

4. These results are discussed in terms of the opposing effects of Photosystems I and II during inhibition of non-cyclic electron flow or in terms of consequence of phenomenon controlled by the phytochrome system, taking account of the action spectra of the activation of oxygen release.

INTRODUCTION

Un végétal placé dans une atmosphère ne contenant pas d'oxygène et de gaz carbonique est capable dans certaines conditions de libérer transitoirement de l'oxygène photosynthétique. La quantité recueillie, trop importante pour résulter de la saturation de la chaîne des transporteurs, ne peut s'expliquer que par une exportation d'électrons. Il est bien admis qu' *in vivo* les électrons récupérés sont utilisés pour la réduction du gaz carbonique qui de ce fait devient indispensable à l'émission d'une quantité importante d'oxygène. Privée des éléments exogènes nécessaires à la photosynthèse, la feuille utilise sous lumière des réserves internes de CO₂ que l'on doit reconstituer pour obtenir un nouveau dégagement d'oxygène dans les conditions précitées^{1,2}.

Warburg et Krippahl³ ont étudié intensivement sur chlorelles ce genre de photosynthèse transitoire et introduit ainsi la notion de "capacité en oxygène photosynthétique". L'adaptation aux feuilles aériennes de leur protocole opératoire a permis

de généraliser certains de leurs résultats et en particulier de montrer que chez le maïs, après 10 min d'anoxie, la cinétique d'émission d'oxygène débute toujours par une phase de latence ou période d'induction dont la durée dépend de la longueur d'onde de l'éclaircissement. Cet effet résulte d'un processus appelé "activation du dégagement d'oxygène"^{4,5}, sur lequel on a pu observer un antagonisme entre les lumières rouge et rouge lointaine^{6,7}.

Notre objectif est de connaître la signification du processus d'activation dont on peut penser qu'il reflète les modalités d'utilisation du réservoir de CO₂ associé à la capacité en oxygène photosynthétique.

Nous avons déjà émis l'hypothèse que la phase d'induction pouvait résulter d'une inhibition directe du fonctionnement de la chaîne des transporteurs d'électrons laquelle, pour des raisons de structure, serait temporairement inapte à remplir sa fonction à la fin d'une période d'obscurité sous azote. Il est également possible d'envisager une inhibition indirecte par saturation des transporteurs d'électrons due à l'impossibilité pour le CO₂ interne d'accéder au site de réduction photochimique⁸.

Dans l'état actuel de nos connaissances il est difficile d'aller plus avant dans le choix d'une hypothèse sans analyser, parallèlement aux cinétiques d'émissions d'oxygène, l'un des processus couplé au transfert d'électrons et susceptible de gouverner l'utilisation du gaz carbonique, à savoir la synthèse d'ATP.

MATERIEL ET METHODES

Une feuille de maïs (*Zea mays*), prélevée sur des plants adultes (2 à 3 mois) cultivés en serre, est découpée dans le sens longitudinal en quatre fragments d'environ 250 mg que l'on dispose dans une cellule thermorégulée à 25 °C. Cette dernière peut être balayée en circuit ouvert par des mélanges gazeux provenant de bouteilles sous pression. Lorsqu'il s'agit d'azote pur le courant gazeux est orienté vers un analyseur ampérométrique de traces d'oxygène (Elcoflux, Hartmann et Braun).

La lumière est fournie par un monochromateur solaire à haut flux dans le visible⁹.

Le protocole opératoire consiste en premier lieu à éclairer les fragments de feuille sous azote jusqu'à ce que la vitesse d'émission d'oxygène soit quasiment nulle. La quantité dégagée représente la capacité en oxygène et traduit l'épuisement des réserves internes en CO₂ disponible. Celles-ci sont en partie reconstituées au cours de l'étape ultérieure où les fragments sont mis à l'obscurité en présence d'un mélange air *plus* 1% CO₂ pendant 5 min; dans la phase suivante ils sont à nouveau balayés par de l'azote d'abord à l'obscurité 10 min puis à la lumière 15 min.

A condition d'utiliser des mélanges gazeux saturés en vapeur d'eau il est possible d'effectuer des cycles de ce genre avec une bonne reproductibilité pendant quelques heures.

Les résultats présentés concernent à la fois les cinétiques d'émission d'oxygène et les variations du niveau interne d'ATP observées pour des éclairements de longueur d'onde variable.

La mesure du taux d'ATP nécessitant un protocole destructif, l'étude des échanges gazeux s'effectue lors des premiers cycles obscurité-lumière sur l'ensemble des fragments, après quoi ceux-ci peuvent être prélevés tour à tour au cours des cycles ultérieurs. Ils sont alors fixés et broyés très finement dans l'azote liquide. La poudre est aussitôt reprise dans la formamide. Les composés phosphorylés sont séparés par

électrophorèse haute tension (1500 V) à basse température (0 °C) sur papier Whatman 3MM imbibé d'un tampon: pyridine-acide acétique-eau (1:10:89, v/v/v) de pH 3.5. Après élution de la bande contenant l'ATP celui-ci est dosé par voie enzymatique au moyen du système phosphoglycérate kinase (EC 2.7.2.3) et glycéraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase (EC 1.2.1.9)¹⁰.

RESULTATS

Le protocole opératoire adopté permet de déterminer sur les mêmes fragments de feuille les cinétiques de dégagement d'oxygène et de synthèse nette d'ATP. D'une feuille à l'autre les résultats sont suffisamment reproductibles pour être comparés directement; après les 10 min d'obscurité sous azote le niveau d'ATP est voisin de 10 nmoles par mg de chlorophylle.

(I) Expériences en lumière monochromatique

On compare les résultats obtenus respectivement sous les éclairements isoquantiques ($N = 7.35 \cdot 10^{19}$ photons·s⁻¹·m⁻²) λ 650 nm et 740 nm. Dans le premier cas, pendant la phase d'induction du dégagement d'oxygène ou phase d'activation (Courbe 1, Fig. 1), la quantité d'ATP (Courbe 1, Fig. 2) croît au cours de la première minute pour rester ensuite quasi stationnaire. Puis parallèlement à l'apparition de l'oxygène on assiste à une nouvelle synthèse qui donne un niveau maximum vers 3 min. Par contre sous λ 740 nm, l'émission d'oxygène est très faible (Courbe 2, Fig. 1) alors que la cinétique d'apparition de l'ATP est apparemment monophasique, l'état stationnaire étant atteint au bout de 1.5 à 2 min (Courbe 2, Fig. 2).

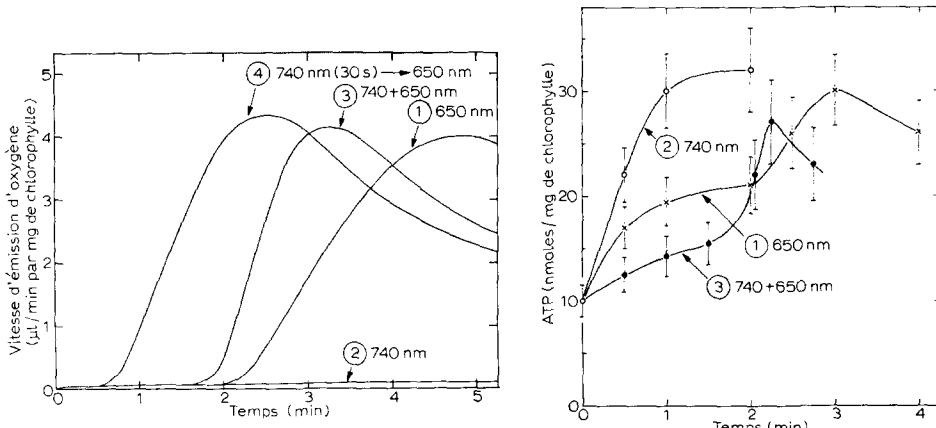


Fig. 1. Cinétiques d'émission d'oxygène obtenues sous éclairements: monochromatiques λ 650 nm (Courbe 1), λ 740 nm (Courbe 2), λ 650 nm précédé par 30 s de lumière rouge lointain λ 740 nm (Courbe 4); bichromatique λ (740+650) nm (Courbe 3). Dans chaque cas la feuille de *Z. mays*, balayée à 25 °C, par un courant d'azote pur, est éclairée après une période d'obscurité de 10 min. Le nombre de photons incidents utilisés pour chaque longueur d'onde est identique $N = 7.35 \cdot 10^{19}$ photons·s⁻¹·m⁻².

Fig. 2. Variations du niveau d'ATP *in vivo* sous λ 650 nm (Courbe 1), λ 740 nm (Courbe 2) et λ (740+650) nm (Courbe 3). Les conditions expérimentales sont identiques à celles décrites dans la légende de la Fig. 1. Chaque point représente le résultat moyen de six expériences dont le coefficient de variabilité maximum est de 15%.

Il faut rappeler que λ 740 nm est la longueur d'onde la plus efficace dans le processus d'activation: avec l'énergie utilisée, il suffit de prééclairer pendant 30 s pour que le dégagement d'oxygène soit immédiat sous un éclairement $h\nu_{II}$ ultérieur (Courbe 4, Fig. 1)^{5,6}.

(2) *Expériences en lumière bichromatique*

Le même type d'expérience est renouvelé en lumière bichromatique. On superpose au rouge lointain λ 740 nm un éclairement λ 650 nm. Le nombre de photons incidents est toujours identique pour chaque longueur d'onde de sorte que le flux lumineux résultant est le double de celui utilisé dans les expériences précédentes.

Au niveau du dégagement d'oxygène (Courbe 3, Fig. 1) on observe une phase d'induction dont la durée, voisine de 1.5 min, est très supérieure au temps d'activation sous λ 740 nm seule (30 s). Au cours de cette induction le niveau d'ATP (Courbe 3, Fig. 2) reste inférieur à celui mesuré dans les mêmes conditions sous λ 740 ou 650 nm; il ne s'accroît qu'avec l'apparition de l'oxygène, d'une manière qui semble plus rapide que sous l'éclairement monochromatique λ 650 nm.

Au début de l'éclairement la lumière rouge annule donc les effets du rouge lointain: l'effet antagoniste entre ces deux lumières, déjà observé sur le processus d'activation du dégagement d'oxygène⁷ et sur le bilan global des réactions de phosphorylations qui lui sont associées¹¹ se retrouve par conséquent sur la synthèse nette d'ATP.

La concentration d'ATP *in vivo* est à chaque instant le résultat global des réactions de synthèse et de consommation. Dans nos conditions expérimentales, en l'absence d'oxygène, on peut supposer sans grande erreur que l'estérification du phosphate minéral au sein de la feuille découle en majeure partie d'un processus de photophosphorylation. La quantité d'orthophosphate disparu pendant un temps donné permet alors d'estimer par défaut, compte tenu d'une éventuelle activité phosphatasique, la quantité d'ATP réellement formé pendant le même temps. On rappelle qu'au cours des 30 premières secondes d'illumination cette quantité est voisine respectivement de 250, 120 et 60 nmoles par mg de chlorophylle pour les éclairements λ 740, 650 et $(740+650)$ nm¹¹. En lumière bichromatique les phosphorylations sont donc fortement diminuées. Il faut signaler au surplus que le rapport de la quantité de phosphate estérifié à celle d'ATP mesurée est le même, voisin de 25, pour les trois éclairements. Cette dernière information tend à montrer que le métabolisme du phosphate en aval de l'ATP ne dépend pas de la nature de l'éclairement et que par conséquent en lumière bichromatique λ $(740+650)$ nm c'est bien la synthèse d'ATP qui est inhibée.

DISCUSSION

D'autres auteurs ont observé dans diverses conditions et sur des organismes photosynthétiques variés des effets d'inhibition semblables à ceux que l'on vient de décrire et que l'on peut qualifier d'effets Emerson négatifs.

Au niveau du dégagement d'oxygène on rappelle les travaux d'Emerson lui-même¹², puis ceux de Rabinowitch et coll.^{13,14}: ces derniers constatent que la photosynthèse stationnaire des chlorelles sous lumière rouge est en partie inhibée par l'apport de lumière rouge lointain. Plus récemment Adler¹⁵ met en évidence un effet Emerson négatif au cours de la période d'induction de la photosynthèse de l'algue verte unicellulaire *Ankistrodesmus braunii*. Aucun de ces effets antagonistes n'est pris en compte dans les théories classiques et il est à priori difficile de savoir, compte tenu

des conditions expérimentales très différentes, s'ils résultent d'un même mécanisme.

Au niveau de la synthèse d'ATP on peut citer les travaux de Tagawa *et al.*¹⁶ qui montrent, sur des chloroplastes brisés et privés d'oxygène, que les photophosphorylations cycliques observées sous λ 708 nm en l'absence de NADP⁺ sont inhibées lorsque l'on ajoute une lumière rouge λ 663 nm. Toutefois cette inhibition n'est pas instantanée et n'apparaît qu'après 4 min au cours desquelles la quantité d'ATP produit est supérieure à celle mesurée sous λ 708 nm seule. Par contre l'inhibition est immédiate si l'éclairement bichromatique est précédé d'une illumination λ 663 nm suffisamment longue. L'interprétation donnée par ces auteurs est fondée sur les effets opposés des systèmes photochimiques vis à vis des processus d'oxydo-réduction de la chaîne des transporteurs d'électrons dont une fraction doit rester partiellement oxydée pour que les photophosphorylations cycliques puissent fonctionner normalement. Au cours de l'éclairement bichromatique il arrive un moment où celles-ci sont inhibées car la lumière λ 663 nm entraîne un flux non-cyclique d'électrons, qui en l'absence de NADP⁺, provoque la réduction totale de la chaîne des transporteurs.

Plus récemment Yin *et al.*¹⁷ ont également montré, en étudiant l'effet de synergie d'Emerson, que la synthèse d'ATP chez des cellules isolées de patates douces est inhibée en lumière bichromatique (708 + 640) nm, uniquement sous anoxie, par rapport aux lumières monochromatiques respectives. Ces auteurs ne donnent ni indications cinétiques ni explication sur ce phénomène.

Nos résultats montrent qu'il est également possible de mettre en évidence, sur organisme intact placé en anoxie et tant que l'oxygène de photosynthèse n'apparaît pas, un effet antagoniste entre les lumières rouge et rouge lointain sur la synthèse d'ATP. Or les effets précédemment cités ont été observés en l'absence d'accepteur d'électrons ce qui fait qu'en aucun cas l'oxygène n'aurait pu se dégager. L'analogie entre les deux situations, *in vitro* et *in vivo*, nous incite à défendre la thèse qui envisage le temps de latence de l'émission d'oxygène chez le maïs comme la conséquence d'un manque d'accepteur d'électrons au site de réduction. Cette explication est également donnée par Walker *et al.*¹⁸ et plus récemment Schürmann *et al.*¹⁹ pour rendre compte des phases d'induction sur chloroplastes: certains intermédiaires du cycle de Calvin sont absents au moment de l'éclairement, la fixation du CO₂ n'est pas possible et le pouvoir réducteur formé n'est pas utilisé. Finalement nous acceptons, sans démonstration directe, que les phénomènes observés *in vivo* sont liés au fait que le CO₂ des réserves internes, pour une raison qui reste à préciser, ne peut pas momentanément servir d'accepteur d'électrons. Dans cette optique le temps de latence mesuré sur le dégagement d'oxygène se trouve imposé par la vitesse du processus conduisant à l'utilisation du NADPH.

Si le métabolisme du CO₂ est limité, comme pour les chloroplastes, par la synthèse de certains intermédiaires phosphorylés du cycle de Calvin, la production d'ATP devient le processus fondamental dont dépend la durée de la phase d'induction. Ce point de vue implique qu'une quantité d'ATP, indépendante de la longueur d'onde, est utilisée pour passer de l'état initial (début de l'éclairement) à l'état correspondant à l'activation totale (début de l'émission de l'oxygène). Puisque nous avons montré qu'il existe une relation directe, quelle que soit la longueur d'onde, entre la quantité d'ATP réellement formé et le niveau mesuré, tout au moins dans le domaine de temps qui nous intéresse, l'hypothèse ci-dessus se traduit dans notre contexte expérimental par l'existence d'un seuil sur la concentration d'ATP en dessous duquel

l'émission d'oxygène n'est pas possible. Les résultats présentés sur la Fig. 2 peuvent grossièrement s'interpréter de cette manière, le seuil étant situé entre 17 et 20 nmoles d'ATP par mg de chlorophylle. Nous rappelons en effet que sous λ 740 nm, 30 s suffisent à provoquer l'activation totale. L'effet antagoniste observé ne serait ainsi qu'une manifestation des effets décrits par l'équipe d'Arnon dans la situation particulière où le flux non-cyclique d'électrons est bloqué. Toutefois il faut signaler que nous n'avons jamais enregistré la coopération transitoire entre les deux longueurs d'onde signalée par cette équipe mais au contraire une moindre phosphorylation dès les premières secondes d'éclairement bichromatique. Le mécanisme *in vivo* n'est donc pas aussi simple que sur chloroplastes et peut même être tout à fait différent.

C'est en partie pour cette raison qu'il nous semble encore utile d'envisager la deuxième hypothèse faisant intervenir un photorécepteur étranger aux deux photosystèmes classiques. Elles est essentiellement fondée sur les allures des spectres d'action, établis sur la phase d'induction du dégagement d'oxygène et déjà publiés⁷, qui sont très voisines de celles des spectres d'absorption du phytochrome. On voit en effet sur la Fig. 3 (Courbe 1) que seule la lumière rouge lointain aux environs de λ 740 nm est particulièrement efficace pour activer le dégagement d'oxygène tandis que l'effet antagoniste (inhibition partielle de l'action de λ 740 nm) est maximum entre 650 et 660 nm (Courbe 2). Une coïncidence aussi forte avec les spectres d'absorption du phytochrome mérite d'être soulignée et montre que l'explication fondée sur l'opposition des Systèmes I et II ne doit pas être présentée comme la seule possible. Toutefois il est prématûré d'envisager plus en détail un contrôle de ce genre de phénomène d'induction par le système phytochrome sans acquérir davantage d'informations.

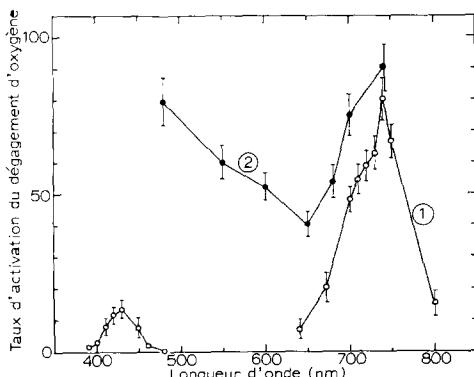


Fig. 3. Spectres d'action du processus d'activation du dégagement d'oxygène obtenus en lumières monochromatiques λ (Courbe 1) et bichromatiques (740 + λ) nm (Courbe 2). La feuille de *Z. mays*, balayée à 25 °C par un courant d'azote, est éclairée à la 10ème minute, d'abord par une lumière de longueur d'onde λ pendant 15 s, puis sous 480 nm pendant 10 min. Le nombre de photons pour chaque longueur d'onde est identique $N = 7.35 \cdot 10^{19}$ photons $\cdot s^{-1} \cdot m^{-2}$. On mesure à l'issue de chaque prééclairage le temps de latence résiduelle du dégagement d'oxygène sous λ 480 nm; par définition le taux d'activation est égal à 100 si la phase d'induction est supprimée, il est nul si la durée de l'induction est identique à celle mesurée après une prééclairage λ 480 nm. La variation du taux d'activation entre ces deux limites est représentée par la Courbe 1 qui permet ainsi de comparer relativement à λ 480 nm l'efficacité des différentes longueurs d'onde testées. Le même type d'analyse est répété pour des prééclairages bichromatiques (740 + λ) nm; les valeurs moyennes du taux d'activation sont reportées sur la Courbe 2. Le coefficient de variabilité maximum obtenu sur un grand nombre d'expériences est de 10%.

Les spectres d'action sur la synthèse d'ATP, dont l'étude est actuellement en cours, montreront par exemple s'il y a parallélisme entre photophosphorylation et activation du dégagement d'oxygène quelle que soit la longueur d'onde. D'autre part de nouvelles techniques devront être mises en oeuvre pour obtenir des résultats plus directs sur le fonctionnement du Photosystème II et sur le flux d'électrons.

RESUME

Un protocole expérimental cyclique permet d'étudier sur feuilles détachées de *Zea mays* les phénomènes d'induction de la photosynthèse.

1. Sous courant d'azote pur l'oxygène de photosynthèse n'est émis qu'après un temps de latence dont la durée dépend de la longueur d'onde de l'éclairement (activation du dégagement d'oxygène).

2. Au cours du temps de latence la synthèse nette d'ATP atteint un plateau qui peut durer une minute avant de repartir lorsque l'oxygène apparaît.

3. L'effet antagoniste entre les lumières rouge et rouge lointain mis en évidence sur le dégagement d'oxygène se retrouve au niveau de la synthèse nette d'ATP. Les photophosphorylations sont partiellement inhibées au cours d'un éclairement bichromatique (650 + 740) nm par rapport aux lumières monochromatiques respectives 650 et 740 nm.

4. Ces résultats sont interprétés comme pouvant être, soit la manifestation des effets opposés des Systèmes photochimiques I et II dans la situation particulière où le flux non-cyclique d'électrons est bloqué, soit la conséquence de phénomènes contrôlés par le système phytochrome compte tenu des spectres d'action de l'activation du dégagement d'oxygène.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Guérin de Montgareuil, P., André, M. et Seimandi, N. (1967) *C. R. Acad. Sci. Paris* 264, 485-488
- 2 Thibault, P. (1971) *C. R. Acad. Sci. Paris* 272, 1361-1364
- 3 Warburg, O. et Krippahl, G. (1963) *Z. Physiol. Chem. Dtsch.* 232, 225-243
- 4 André, M., Guérin de Montgareuil, P. et Seimandi, N. (1967) *C. R. Acad. Sci. Paris* 265, 540-543
- 5 Thibault, P., André, M. et Guérin de Montgareuil, P. (1968) *C. R. Acad. Sci. Paris* 267, 2140-2143
- 6 Thibault, P. (1969) *C. R. Acad. Sci. Paris* 259, 1758-1761
- 7 Thibault, P. (1970) *C. R. Acad. Sci. Paris*, 270, 1980-1983
- 8 Thibault, P. et Michel, J. P. (1972) dans *Proc. 2nd Int. Congr. on Photosynthesis Research, Stresa, 1971* (Forti, G., Avron, M. et Melandri, A., eds), Vol. 1, pp. 599-609, Dr W. Junk N.V. Publishers, La Hague
- 9 André, M. (1966) dans *Currents in Photosynthesis*, pp. 304-312, A. Donker, Rotterdam
- 10 Adam, H. (1965) dans *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U., ed.), pp. 539-543 Academic Press, New York
- 11 Michel, J. P. et Thibault, P. (1970) *C. R. Acad. Sci. Paris* 271, 976-979
- 12 Emerson, R. et Rabinowitch, E. (1960) *Plant Physiol.* 35, 477-485
- 13 Rabinowitch, E., Govindjee et Thomas, J. B. (1960) *Science*, 132, 422
- 14 Govindjee, Rabinowitch, E. et Thomas, J. B. (1960) *Biophys. J.* 1, 91-97
- 15 Adler, K. (1968) *Photosynthetica*, 2, 17-23
- 16 Tagawa, K., Tsujimoto H. Y. et Arnon, D. I. (1963) *Nature* 199, 1247-1252
- 17 Yin, H. C., Fan, I. J., Schen, G. M., Li, T. Y. et Shen, Y. K. (1965) *Sci. Sin.* 14, 1184-1192
- 18 Walker, D. A., Cockburn, W. et Baldry, C. W. (1967) *Nature* 216, 597-599
- 19 Schürmann, P., Buchanan, B. B. et Arnon, D. I. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 267, 111-124