

## QUENCHING DE LA CHLOROPHYLLE IN VIVO PAR LE *m*-DINITROBENZENE

ANNE-LISE ETIENNE, COLETTE LEMASSON et JEAN LAVOREL\*

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

(Reçu le 10 août, 1973)

### SUMMARY

The quenching of fluorescence and inhibition of photochemical activities by *m*-dinitrobenzene have been studied in unicellular algae and chloroplasts.

The complementary area  $S(=\int_0^\infty (\Delta\phi_M - \Delta\phi) dt)$  is decreased in the same fashion as the maximum amplitude of the variable fluorescence  $\Delta\phi_M$ , suggesting the invariance of  $S$  properly normalized by  $\Delta\phi_M$ . A photochemical type inhibition for all photochemical activities (oxygen evolution, Photoreaction II and I) is observed in a concentration range higher than that required to quench  $\Delta\phi_M$ . The ratio of the photochemical rate in limiting light to the  $O_2$  burst elicited by a flash is constant whatever the level of inhibition. The pattern of oscillation of  $O_2$  burst during a sequence of flashes is also unmodified, the amplitude only being decreased.

In order to explain these results, it is assumed that dinitrobenzene (DNB) has a quenching effect both on the center-chlorophyll and the collector-chlorophyll of the System II photosynthetic units; when the external quencher is only acting on the collector, the trapping efficiency for the center is unmodified, but, when the center is turned into its inactive form by the photochemical reaction, the fluorescence of the collector is quenched. It is shown that the rule of invariance of the normalized complementary area applies to this type of quenching; accordingly, the zero level of the System II fluorescence, within the constant part, (cf. Lavorel, J. et Joliot, P. (1972) *Biophys. J.* 12, 815-831) should lie close to the 0 level (dark-adapted state).

---

### INTRODUCTION

Après l'introduction par Teale [1] du quenching externe de fluorescence (par le *m*-dinitrobenzène (DNB) comme moyen d'étude de l'étape photophysique de la photosynthèse, il est apparu qu'il était possible d'introduire au sein des unités photosynthétiques des pièges artificiels susceptibles d'interférer avec les voies habituelles de désactivation de l'exciton: fluorescence, transfert, piégeage par les centres. Dans

---

Abréviations: DNB, *m*-dinitrobenzène; DPIP, 2,6-dichlorophénol indophénol; DCMU, 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée.

\* A qui on est prié d'adresser toute correspondance relative à cet article.

la batterie des moyens chimiques dont disposent actuellement les investigateurs pour sonder l'appareil photosynthétique, il est certainement intéressant et utile d'avoir des substances qui n'agissent qu'au niveau photophysique et photochimique. Cependant, peu d'auteurs se sont intéressés à ces substances et aux problèmes que posent leur utilisation [2-6].

Une des faiblesses de cette approche est qu'il est très difficile, de connaître la concentration de l'agent externe au voisinage de sa cible, d'où l'impossibilité de comparer quantitativement les propriétés de cet agent *in vivo* et *in vitro*. Il nous a semblé cependant que la comparaison des propriétés de quenching de fluorescence et d'inhibition des activités photochimiques *in vivo* devait permettre d'avancer dans la compréhension du mode d'action de tels agents externes, afin d'en permettre un emploi plus général. Le choix du DNB comme quencher externe se recommandait pour plusieurs raisons: constante de quenching élevée, solubilisation relativement facile dans les suspensions aqueuses, absence d'absorption importante dans le spectre visible, absence d'activité comme oxydant de Hill.

## MATERIEL ET METHODES

### *Matériel biologique*

L'algue *Chlorella pyrenoidosa* est cultivée comme décrit antérieurement [3]; les cellules sont mises en suspension dans un tampon phosphate 0.05 M, pH 6.5, KCl 0.1 M ou dans le milieu de culture. Les chloroplastes d'épinard sont extraits dans un tampon Tris-maléate 0.1 M, saccharose 0.4 M, pH 6.6, et conservés dans l'azote liquide en présence de glycérol à 10%; au moment de l'emploi, ils sont remis en suspension dans un tampon frais, additionné de sérum albumine à  $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ .

### *Méthodes*

La fluorescence a été étudiée selon une méthode déjà décrite (phosphoroscope-laser) [7]. L'intensité du faisceau laser permet de développer la phase photochimique ( $0 \rightarrow I$ ) en  $600 \mu\text{s}$  environ, ce qui permet de bien la distinguer de la phase thermique suivante ( $I \rightarrow P$ ) dont la durée est de l'ordre de 0.3 s. La vitesse de dégagement de l'oxygène est mesurée par la méthode ampérométrique avec modulation lumineuse [8]. La durée des éclairs (Strobotac, Général Radio) est de  $5 \mu\text{s}$  à 10% de la hauteur. Le protocole de mesure de phénomène de désactivation a été décrit antérieurement [9]. L'activité photochimique Système II est mesurée par la vitesse de réduction du 2,6-dichlorophénol indophénol (DPIP) [10]. Le spectrophotomètre (Cary 14) est équipé d'un dispositif permettant l'éclairement actinique de la cuve contenant la suspension de chloroplastes; le photomultiplicateur est protégé grâce à un jeu de filtres complémentaires (Balzers DT 1 et Schott OG4). Le mélange réactionnel contient l'équivalent de  $6.3 \cdot 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$  de chlorophyll. L'activité photochimique Système I est mesurée par la vitesse de transfert d'électrons en présence de 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée (DCMU) entre le DPIP réduit et le méthyl viologène [11]. L'absorption d'oxygène qui en résulte est mesurée ampérométriquement à l'aide d'une électrode de type Clark. Le mélange réactionnel contient l'équivalent de  $3.9 \cdot 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$  de chlorophylle. Le DNB est introduit dans les suspensions sous forme de solution dans l'éthanol; la concentration de celui-ci dans le mélange final n'excède pas 5%. Les mesures sont effectuées après au moins 10 min d'incubation.

## RESULTATS

A. *Fluorescence*

1. *Constante de quenching.* Quel qu'en soit le type (dynamique, par recontre bimoléculaire, ou statique, par formation de complexe), le quenching dans les solutions obéit à la loi de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F_Q} = \frac{1}{1+KQ} \quad (1)$$

où  $F_Q$ ,  $F_0$  sont les intensités de fluorescence en présence, en absence de quencher,  $Q$  est la concentration du quencher,  $K$  la constante de quenching. Même dans les solutions, on constate une augmentation de  $K$  lorsque la concentration du pigment est assez élevée pour permettre un transfert de l'excitation électronique entre molécules [12]. Cette remarque permettait d'espérer que l'introduction d'un quencher externe au sein des unités photosynthétiques produise également une variation de  $K$  significative

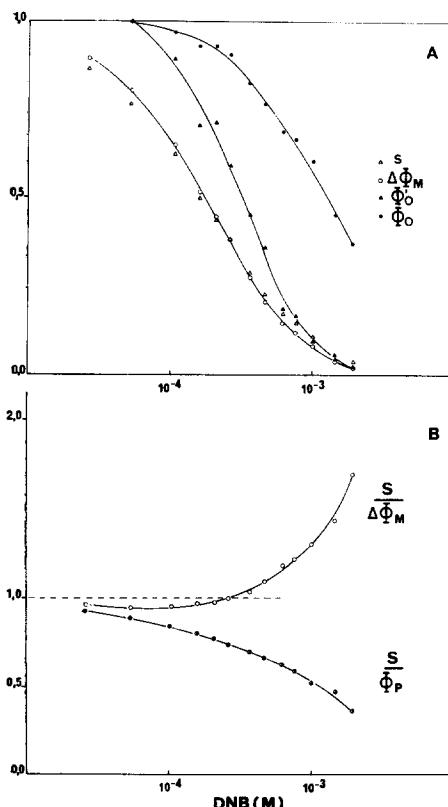


Fig. 1. Effet du DNB sur différents paramètres cinétiques de la fluorescence chez *C. pyrenoidosa*. Excitation: 633 nm, observation: 685  $\pm$  25 nm. Chlorophylle:  $25 \cdot 10^{-6}$  g  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>. (A) Fluorescence constante  $\Phi_0$ , fluorescence variable maximum  $\Delta\Phi_M$ , pente initiale  $\Phi'_0$  et aire complémentaire  $S$  (voir texte); toutes les quantités sont normalisées par rapport au témoin sans DBN. (B) Normalisation de l'aire complémentaire  $S$  par rapport à la fluorescence variable maximum  $\Delta\Phi_M$  ou par rapport à la fluorescence totale maximum  $\Phi_P$ .

du mouvement des excitons parmi les molécules de chlorophylle. Dans cet esprit, l'un de nous (Lavorel, J., résultats non publiés) entreprit dès 1965 l'étude du quenching de la fluorescence chlorophyllienne *in vivo* par la *p*-benzoquinone, puis par le DNB; il constata que le quenching de la partie variable ( $\Delta\phi_M$ ) était plus important (3-5-fois) que celui de la partie variable ( $\phi_0$ ) et que, pour le DNB,  $K(\Delta\phi_M)$  était environ 50-fois plus grand que pour la chlorophylle en solution [13]. Des résultats tout-à-fait semblables ont été obtenus pour le DNB et pour d'autres quenchers par Amesz et Fork [2].

L'interprétation de cette importante variation de  $K$  peut malheureusement être faussée par une distribution hétérogène du quencher entre les phases aqueuse et particulaire de l'échantillon, ce qui ne permet pas d'identifier la concentration globale du quencher à sa concentration locale, seule significative au regard de l'Eq. 1. Un effet de partage est considéré comme un facteur important par Papageorgiou et Argoudelis [6].

2. *Paramètres cinétiques de la fluorescence.* Plus récemment, nous avons mesuré l'effet de la concentration du DNB non seulement sur  $\phi_0$  et  $\Delta\phi_M$ , mais aussi sur la pente initiale de la fluorescence variable  $\phi'_0$  et sur l'aire complémentaire  $S = \int_0^\infty (\Delta\phi_M - \Delta\phi) dt$  (Fig. 1A). On voit que la courbe de  $S$  est assez voisine de celle de  $\Delta\phi_M$  et que la quantité  $\phi'_0$  se distingue des autres en ce que sa variation est beaucoup plus brutale. L'intérêt de la quantité  $\phi'_0$  est qu'on peut la formuler assez indépendamment du modèle d'unités photosynthétiques choisi. Celui de  $S$  est qu'on rattache classiquement cette quantité à la concentration  $q_0$  des centres Système II présents au début de l'illumination [14, 15].

### B. Activités photochimiques

Que la cible du DNB soit la chlorophylle des centres ou celle des collecteurs,

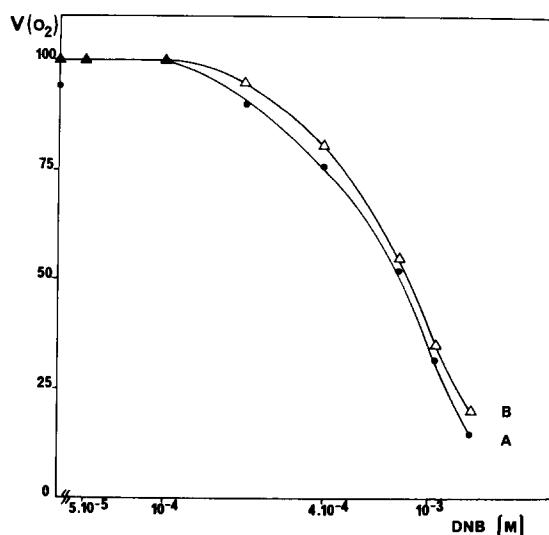


Fig. 2. Effet du DNB sur la vitesse stationnaire de dégagement d' $O_2$  chez *C. pyrenoidosa*. (A) Éclairage à 700 nm, 3500 ergs  $\cdot$  cm $^{-2}$   $\cdot$  s $^{-1}$ ; (B) éclairage à 650 nm, 1600 ergs  $\cdot$  cm $^{-2}$   $\cdot$  s $^{-1}$ . Ces intensités lumineuses ont été ajustées pour donner la même vitesse (= 100) avant l'addition de DNB.

TABLEAU I

Effet du DNB sur la vitesse d'émission d'oxygène en faible lumière  $V$  et sur la quantité d'oxygène émise après un flash E chez *Chlorella*. Les quantités sont normalisées par rapport au témoin sans DNB.

DNB (M)	$5 \cdot 10^{-5}$	$10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-4}$	$7.8 \cdot 10^{-4}$	$1.1 \cdot 10^{-3}$
$V$ à 700 nm	1.0	0.96	0.925	0.645	0.30	—
E à 700 nm	1.0	0.96	0.885	0.60	0.265	—
$V$ à 700 nm	1.0	1.02	1.035	1.07	1.12	—
E à 675 nm	0.955	1.0	1.1	1.1	1.17	1.19

dans les deux cas on prévoit une inhibition de l'activité photochimique, mais sa nature et son intensité peuvent être différentes, selon l'hypothèse choisie.

1. *Emission d'oxygène en photosynthèse normale.* L'effet du DNB sur la vitesse d'émission d'oxygène en lumière limitante est indiqué sur la Fig. 2. L'inhibition n'apparaît qu'à partir de  $10^{-4}$  M environ (la demi-inhibition a lieu vers  $10^{-3}$  M), donc dans un domaine de concentrations nettement plus élevées que celui qui affecte  $\Delta\phi_M$  (cf. Fig. 1A). On remarque que l'inhibition est sensiblement la même en excitant à 650 nm et à 700 nm. La Photoréaction II étant fortement limitante dans cette dernière condition, on peut conclure de ce résultat soit que l'inhibition porte exclusivement sur la Photoréaction II, à condition que les chaînes ne puissent pas coopérer par échange d'électrons, soit que les deux photoréactions sont à peu près également inhibées. La suite de cette étude confirme la seconde conclusion.

Un fait très significatif révélé par le Tableau I est l'invariance du rapport de la vitesse d'émission  $V$  à la concentration des centres Système II photoactifs E (mesurée par la quantité d' $O_2$  produite par un éclair court et saturant). Ceci montre clairement que, du point de vue de l'activité photochimique, tout se passe comme si le DNB

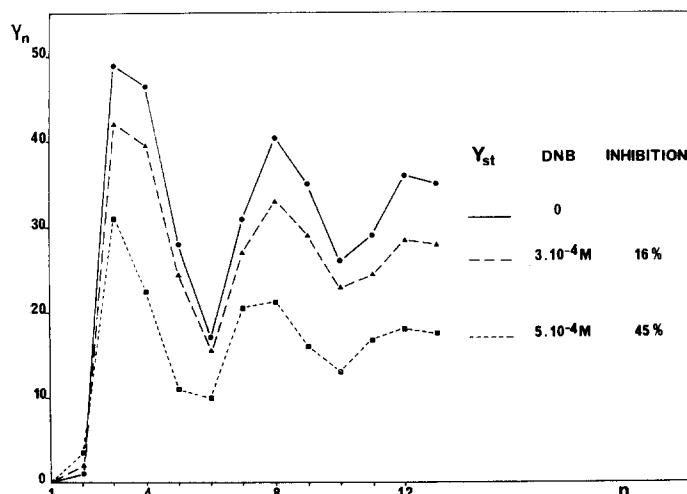


Fig. 3. Effet du DNB sur les quantités d'oxygène ( $Y_n$ ) émises chez *C. pyrenoidosa* au cours d'une séquence d'éclairs espacés de 300 ms.  $n$  est le numéro de l'éclair. Les algues sont maintenues à l'obscurité 5 min avant la mesure. L'inhibition est calculée sur la valeur stationnaire de  $Y_n$ .

agissait par "tout ou rien" sur les centres, ceux qui ne sont pas atteints gardant une activité normale. Cet effet rappelle celui du traitement par les ultraviolets [16]. L'hypothèse précédente est confirmée par l'examen de l'émission d'oxygène produite par une séquence d'éclairs, en absence ou en présence de DNB (Fig. 3). L'effet principal du DNB est de réduire l'amplitude des oscillations, qui par ailleurs conservent un aspect classique (cf. réfs 17 et 18). Là encore, le DNB agit comme le traitement par les ultraviolets [18]. Sous l'action du DNB, il apparaît toutefois une certaine modification du rapport  $Y_3/Y_4$ , ce qui a priori indiquerait un déplacement du rapport  $S_1/S_0$  initial. (Ces expériences ont été effectuées successivement: il est donc possible que la variation de  $S_1/S_0$  s'explique en partie par une durée de désactivation insuffisante (5 min) d'un essai au suivant.)

2. *Activités Système II et Système I.* En lumière limitante, la vitesse de réduction du DPIP par les chloroplastes est inhibée à partir de  $10^{-4}$  M de DNB environ (Fig. 4, Courbe A); par contre, en lumière saturante, l'inhibition est beaucoup moins marquée et atteint seulement 10% pour  $2 \cdot 10^{-3}$  M de DNB (Fig. 4, Courbe B). L'effet de l'intensité lumineuse souligne donc bien le caractère photochimique de l'inhibition.

La réduction du méthyl viologène par les chloroplastes en présence de DCMU et de DPIP et en lumière lumineuse est également inhibée par le DNB (Fig. 4, Courbe C). La sensibilité de la Photoréaction I est un peu plus faible que celle de la Photoréaction II, mais elles restent du même ordre de grandeur. La même remarque s'applique pour l'activité photosynthétique globale (Tableau I), bien qu'il s'agisse de matériaux biologiques différents.

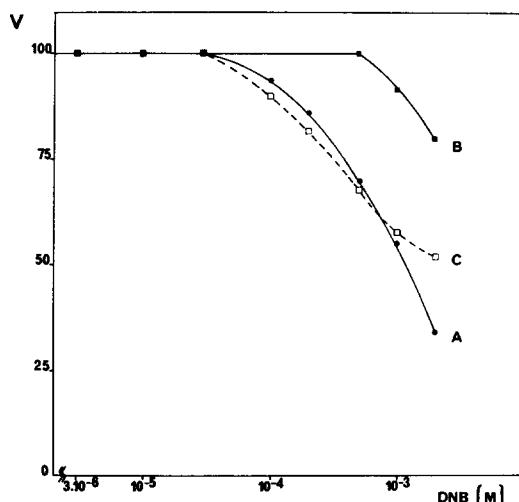


Fig. 4. Action du DNB sur les activités photochimiques Système II et Système I de chloroplastes. (A) Vitesse de réduction du DPIP en lumière limitante; activité du témoin:  $1.5 \mu\text{moles de DPIP}/\text{min per mg}$  ( $= 100$ ). (B) Vitesse de réduction du DPIP en lumière saturante; activité du témoin:  $4.7 \mu\text{moles de DPIP}/\text{min per mg}$  ( $= 100$ ). (C) Vitesse d'absorption d'oxygène en présence de méthyl viologène et du Système DPIP+ascorbate+DCMU. Intensité lumineuse limitante; activité du témoin:  $2.4 \text{ équivalent}/\text{min per mg}$  ( $= 100$ ).

## DISCUSSION

## 1. Action sur les centres ou sur les collecteurs

Dans ces deux hypothèses, on peut aisément prévoir un quenching de fluorescence et une inhibition photochimique. L'examen détaillé de nos résultats montre pourtant qu'aucune d'entre elles ne peut être retenue exclusivement de l'autre.

(a) Si le quenching porte uniquement sur le collecteur, les pièges artificiels agiront "en amont", en compétition avec tout autre mode de désactivation, en particulier la fluorescence et la capture photochimique par les pièges. La diminution constatée pour E (Tableau I) ne peut alors s'expliquer que par un effet de non-saturation apparente des éclairs: une fraction importante des excitons seraient désactivés dans les collecteurs par le DNB et il en résulterait une sous-estimation du dosage de E. On devrait reconnaître cette non-saturation par une déformation caractéristique des émissions d'oxygène en séquence d'éclairs, déformation qui tendrait à atténuer l'amplitude des oscillations et à diminuer la rapport  $Y_3/Y_4$  (une partie des centres dans l'état  $S_1$  initialement se trouvant encore révélé en  $Y_4$ , au quatrième éclair). Or on a vu (Fig. 3) que le diagramme se déformait plutôt dans le sens contraire en présence de DNB et que les oscillations n'étaient pas spécialement amorties. Cette première hypothèse n'est donc pas acceptable\*.

(b) Si le quenching porte uniquement sur les centres, la diminution de E en découle directement; les centres ainsi "bloqués" sont transformés en pièges perma-

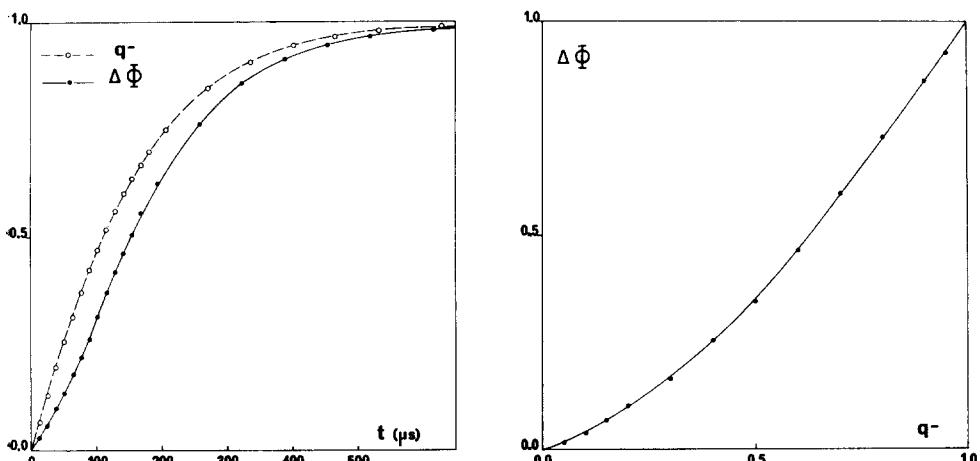


Fig. 5. Evolution de la fluorescence au cours de la croissance photochimique chez *C. pyrenoidosa*. A gauche: cinétique de la fluorescence variable et de  $q^-$  calculé par la relation de l'aire complémentaire  $\int_0^t (1 - \Delta\Phi/\Delta\Phi_M) dt$ . A droite: relation  $\Delta\Phi = f(q^-)$  à partir des points du diagramme de gauche. Les conditions sont identiques à celles de la Fig. 2 (témoin sans DNB). Voir aussi Fig. 6.

\* Une des motivations de cette étude (plus particulièrement de l'émission d' $O_2$  en séquence d'éclairs) fut de vérifier l'hypothèse [3] selon laquelle les excitons, produisant par "recombinaison" la luminescence, pouvaient être piégés à distance et, de la sorte, modifier de manière appréciable la distribution des états S des centres Système II. La suppression de cet effet hypothétique par le DNB agissant au niveau des collecteurs devait se reconnaître par un moindre amortissement des oscillations d' $O_2$  au cours d'une séquence d'éclairs. Cet effet, s'il existe, est imperceptible (cf. Fig. 3).

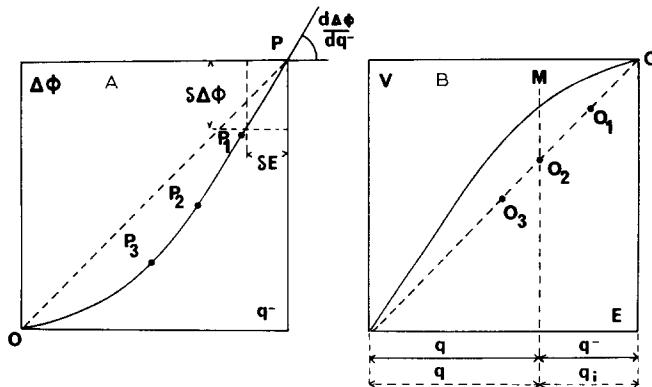


Fig. 6. Schéma des relations  $\Delta\Phi = f(q^-)$  et  $V = f(E)$ . Au Point P, sur le diagramme  $\Delta\Phi = f(q^-)$  (Courbe A) une variation  $\delta E$ , équivalente au déplacement indiqué sur l'axe de  $q^-$ , entraîne une variation  $\delta\Delta\Phi$  dont l'amplitude dépend de la pente en P. Les Points  $O_1$ ,  $O_2$  et  $O_3$  sur le diagramme  $V = f(E)$  (Courbe B) correspondent à une accumulation des centres sous forme de pièges permanents  $q_i$ ; la distribution  $q/q_i$  correspond au Point M, la distribution  $q/q_i$  au Point  $O_2$ . Les Points  $P_1$ ,  $P_2$  et  $P_3$  sur le diagramme  $\Delta\Phi = f(q^-)$  correspondent aux Points  $O_1$ ,  $O_2$  et  $O_3$ .

nents, incapables de subir la transformation photochimique, mais encore capables de capturer les excitons. Il en résultera un quenching de fluorescence de même nature que celui qu'exercent les centres lorsqu'ils sont dans l'état "ouvert", photoactif. Dans ce cas, on peut prévoir à partir de la connaissance de la relation  $\Delta\phi = f(q^-)$  la variation de  $\Delta\phi_M$  qu'entraînerait une variation de  $E$  équivalente au blocage des centres (cf. Fig. 6A); elle serait, pour les faibles concentrations de DNB, c'est-à-dire au voisinage du point P:

$$\delta\Delta\phi = \left( -\frac{d\Delta\phi}{dq^-} \right)_P \cdot \delta E \quad (2)$$

D'après le diagramme réel  $\Delta\phi = f(q^-)$  (Fig. 5), la pente en P est d'environ 1/0.7 et, par conséquent, si le seuil d'effet du quencher sur  $V$  (ou aussi bien sur  $E$ ) est d'environ  $10^{-4}$  M (cf. Fig. 2), le seuil équivalent pour  $\Delta\phi_M$  serait de  $7 \cdot 10^{-5}$  M. Or ce seuil est plutôt de l'ordre  $10^{-5}$  M (cf. Fig. 1A). Même compte tenu des écarts quantitatifs constatés au cours de ce travail, la différence entre ces deux valeurs est trop considérable pour être acceptable. On est donc pareillement conduit à rejeter cette seconde hypothèse\*.

## 2. Hypothèse du quenching uniforme

On peut chercher à décrire schématiquement l'action du DNB comme si elle s'exerçait en deux temps, en produisant des unités de deux sortes: par concentrations croissantes, on aurait d'abord des unités où seul le collecteur serait atteint, puis des unités où, de plus, le centre serait bloqué à l'état de piège permanent. Cette progression

\* Le rejet de cette hypothèse exclusive résulte aussi de l'observation (non publiée) que le mutant ac. 115 de *Chlamydomonas*, connu d'après ses propriétés de fluorescence et de luminescence [19] pour être déficient en centres Système II, présente un quenching de fluorescence par le DNB tout à fait comparable à celui qui est décrit ici pour *C. pyrenoidosa*.

s'expliquerait, selon l'idée simple d'une affinité uniforme du DNB, par le rapport élevé du nombre de molécules de chlorophylle du collecteur à celle du centre ou, au contraire, par une affinité différente pour chacun des deux sites. Notre ignorance des concentrations locales ne permet pas de trancher.

Dans le premier type de quenching, on peut approximativement adopter un schéma de quenching dynamique pour discuter l'effet du quencher selon que l'unité est ouverte (photoactive) ou fermée (fluorescente), soit:

$$\text{Unité ouverte: } \Phi_0 = \frac{k_F}{k_F + k_p q_0 + k_Q} \quad (3)$$

$$\text{Unité fermée: } \Phi_p = \frac{k_F}{k_F + k_Q} \quad (4)$$

où  $k_F$  et  $k_Q$  sont des constantes d'ordre 1 de désactivation de l'exciton par fluorescence ou par quenching externe,  $k_p$  la constante d'ordre 2 de l'interaction centre-exciton et  $q_0$  la concentration maximum des centres photoactifs. On voit que même si les unités fermées subissent un quenching important ( $k_Q \gg k_F$ ), l'effet sur les unités ouvertes sera négligeable pourvu que  $k_p q_0 \gg k_Q$ . On peut ainsi expliquer l'apparence d'un mécanisme par tout ou rien où des unités sont encore fonctionnelles sur le plan photochimique lorsqu'elles sont ouvertes tout en subissant un quenching de fluorescence important lorsqu'elles sont fermées.

Il est important de remarquer que la non-décroissance du rapport  $V/E$  (Tableau I) implique que le quenching de l'unité ouverte selon l'Eq. 3 intervient toujours de façon négligeable dans l'inhibition photochimique, sinon ceci entraînerait une diminution de  $V$  sans variation de  $E$ . Il est probable que, dans le domaine de concentration où ce quenching pourrait se produire, c'est le blocage des unités qui devient l'effet prépondérant.

Pour le second type de quenching, on doit faire apparaître la fraction des centres bloquée par association avec le DNB, soit (dans l'état 0)  $q_0/(1+KQ)$  où  $K$  est la constante d'association entre le DNB et les centres et  $Q$  la concentration du DNB. L'expression complète du quenching et de l'inhibition photochimique comprendrait l'Eq. 3 complétée par celle du rendement photochimique:

$$\text{Unité ouverte: } \rho_0 = \frac{k_p q_0}{k_F + k_p q_0 + k_Q} \cdot \frac{1}{1+KQ} \quad (5)$$

qui se réduirait à  $\rho_0 \cong 1/(1+KQ)$  dans le domaine de concentration où le blocage serait prépondérant. D'après les données du Tableau I,  $K \cong 2 \cdot 10^3 \cdot M^{-1}$ ; d'après celles de la Fig. 2,  $K \cong 1.2 \cdot 10^3 \cdot M^{-1}$ .

L'hypothèse du quenching uniforme permet également d'interpréter le comportement de  $\Phi'_0$ . Dans un modèle d'unités photosynthétiques individualisées (connectées ou non), cette quantité s'exprime simplement par:

$$\Phi'_0 = k^* \cdot q_0 \cdot \varphi(1) \quad (6)$$

où  $k^*$  est une constante photochimique d'ordre 1 englobant notamment le rendement quantique de l'acte photochimique et l'absorption lumineuse (on suppose pour

simplifier que les centres ouverts sont des pièges absolus) et  $\varphi(1)$  le rendement de fluorescence d'une unité fermée entourée d'unités ouvertes (auxquelles elle peut éventuellement transférer des excitons).  $\varphi(1)$  n'est pas directement accessible à la mesure, mais nous admettrons que son quenching peut être décrit selon une équation de Type 4. La variation relative de  $\Phi'_0$  est alors donnée par:

$$\frac{1}{(1+k_1Q)(1+KQ)} = \frac{1}{1+(k_1+K)Q+k_1KQ^2} \quad (7)$$

où  $k_1$  est la constante de Stern–Volmer pour  $\varphi(1)$ . Cette équation rend qualitativement bien compte de la brusque décroissance de  $\Phi'_0$  en fonction de  $\log(\text{DNB})$  (Fig. 1A). En correspondance avec  $\varphi(1)$ , on peut définir  $\varphi(\infty)$ , rendement de fluorescence de l'unité fermée complètement entourée d'autres unités fermées. C'est, en bonne approximation,  $\Delta\Phi_M$  et la Fig. 1A montre que la constante de quenching  $k_\infty \cong 6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ . Maintenant, à partir du diagramme  $\Phi = f(q^-)$  (Fig. 5), on peut estimer le rapport  $k_\infty/k_1$  en l'identifiant au rapport des pentes en P et O, si l'on considère que ces pentes donnent la variation de fluorescence par unité de quenching. D'après le rapport des pentes, on peut conclure que  $k_1 \cong 1.5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ . En substituant les valeurs de  $k_1$  et la concentration de demi-effet pour  $\Phi'_0$  dans l'Eq. 7 on trouve que  $K \cong 1 \cdot 10^3 \cdot \text{M}^{-1}$ , valeur d'un ordre de grandeur assez proche de ce qui a été indiqué plus haut.

### 3. Mécanisme moléculaire du quenching

Selon que la durée de la rencontre entre le quencher et la molécule fluorescente est petite ou grande devant la durée de vie  $\tau$  de l'état excité, on distingue un quenching de type dynamique (avec diminution concomitante de  $\tau$  et de  $\Phi$ ) ou statique ( $\tau$  invariant); de plus, le type statique lui-même peut revêtir un caractère dynamique dans les systèmes à excitons mobiles. Le fait observé dans ce laboratoire par Moya [20] que  $\tau$  et  $\Phi$  diminuent parallèlement *in vivo* sous l'effet du DNB confirme donc l'idée générale du mouvement d'exciton dans l'unité photosynthétique, mais ne permet pas de se prononcer sur le type d'interaction entre le quencher et la chlorophylle du collecteur. Le cas des centres bloqués est moins ambigu et semble plutôt relever du mécanisme statique (ce qui a été implicitement admis plus haut en définissant  $K$ ). En effet, un quenching dynamique sur les centres produirait aussi une non-saturation apparente des éclairs (un centre bloqué au moment d'un éclair pourrait ne plus l'être lors de l'éclair suivant). Or, on l'a vu (cf. Fig. 3), nous ne constatons pas un tel effet. On doit donc admettre que la durée de vie des centres est très grande\*.

### 4. Invariance de l'aire complémentaire normalisée et zéro (ou origine) de la fluorescence Système II

L'utilisation de l'aire complémentaire  $S = \int_0^\infty (\Phi_M - \Phi) dt$  comme mesure quantitative relative du substrat de la réaction photochimique  $q_0$  (cf. réfs 14 et 15) pose quel-

\* L'action du DNB ne se réduit certainement pas à un simple effet de quenching. A faible concentration, il supprime spécifiquement la phase thermique (I  $\rightarrow$  P) de l'induction de fluorescence [5]. Nous avons constaté (observations non publiées) que le DNB ralentissait la désactivation, ainsi que le déclin de la fluorescence variable et de la luminescence après un éclair. Ces trois effets sont certainement en corrélation étroite, mais on ne voit pas a priori leur rapport avec le quenching de fluorescence.

ques problèmes lorsqu'on est en présence d'un quenching additionnel. La relation de l'aire complémentaire ( $S = q_0$ ) se déduit d'une loi de conservation de l'énergie qu'on peut écrire sous forme générale:

$$\frac{dq^-}{dt} = \alpha I(1 - \beta\Phi) \quad (8)$$

où  $\alpha$  est la fraction active de l'absorption lumineuse et  $\beta$  le rapport de la somme des rendement de toutes les désactivations au rendement de fluorescence. Si  $\beta$  est une constante, on a nécessairement  $\beta = \Phi_M^{-1}$  et, après intégration de l'Eq. 8, on voit que l'aire complémentaire normalisée par  $\Phi_M$  ( $\Phi_M^{-1} \int_0^\infty (\Phi_M - \Phi) dt$ ) mesure  $q_0$ , au facteur  $\alpha I$  près. Cette propriété reste vraie même en cas d'un quenching externe, pourvu qu'il n'affecte ni  $q_0$  ni  $\alpha$ , ce qui est vrai pour le quenching de collecteur envisagé plus haut. Dans le cas d'un blocage des centres,  $q_0$  et  $\alpha$  seront modifiés exactement dans la même proportion. Donc, dans les deux cas, l'aire complémentaire normalisée est invariante. Cette propriété, qui n'avait pas encore été signalée, peut sembler paradoxale, spécialement dans le cas des centres bloqués, mais elle a été vérifiée par simulation sur un modèle d'unités connectées [21]. L'invariance n'est plus établie si l'on abandonne l'hypothèse  $\beta = \text{constante}$  ni, évidemment, si l'on considère une disparition physique des centres, hypothèse distincte de celle du blocage.

La règle d'invariance permet de mieux localiser le zéro véritable de la fluorescence Système II [4]. A ce point de vue, le niveau 0 correspond à une fluorescence résiduelle initiale d'origine Système II,  $\Phi_{0II}$  et la normalisation de  $S$  devrait se faire à l'aide de  $\Phi_{0II} + \Delta\Phi_M$ . Nous avons noté que les courbes de  $S$  et de  $\Delta\Phi_M$  étaient assez voisines (cf. Fig. 1A), ce qui indiquerait que  $\Phi_{0II}$  est assez petit; autrement dit, le zéro de la fluorescence Système II serait situé un peu en-dessous du niveau 0 (cf. réf. 22 pour une conclusion analogue). Sur la Fig. 1B, on a porté les résultats de deux normalisations extrêmes (par  $\Delta\Phi_M$  ou par  $\Phi_p$ ): le sens et l'importance des déviations par rapport à la règle d'invariance confirment bien notre conclusion.

On peut donc penser que la plus grande partie de la fluorescence constante est d'origine Système I [4]. Le fait que les zones de quenching de  $\Phi_0$  et d'inhibition de la Photoréaction I soient assez voisines n'est pas contraire à cette hypothèse. Ce point n'est pas sans intérêt pour ce qui concerne le problème, encore non résolu, de l'état électronique excité de la chlorophylle (singulet ou triplet?) participant à la Photoréaction I.

##### 5. Remarque sur les relations $\Delta\Phi = f(q^-)$ et $V = f(E)$ (cf. réf. 23)

Ce type de relations est extrêmement important dans la discussion des effets de quenching. Toutefois, leur maniement est délicat, comme on va le montrer dans le cas simple du quenching par blocage des centres. La caractéristique  $V = f(E)$  (ou  $f(q)$ ) (Fig. 6B) est normalement décrite lorsque les centres se répartissent entre les formes  $q$  et  $q^-$ ; ceci peut être réalisé de différentes façons, en particulier en mesurant  $V$  en faible lumière en présence de DCMU [16]. Par contre, en cas de blocage des centres (à l'état de pièges permanents) on ne décrit plus cette caractéristique: le point représentatif doit se déplacer sur la diagonale principale (Points 0<sub>1</sub>, 0<sub>2</sub>, 0<sub>3</sub> sur la Fig. 6B), pour autant que  $V$  est bien mesurée en faible lumière (à 700 nm). En effet,  $V$  et  $q$  sont exactement modifiés dans les mêmes proportions ( $V/E = \text{constante}$ ). On notera d'ailleurs que la signification des abscisses n'est pas la même pour un

Point M sur la caractéristique et un point correspondant O<sub>2</sub> sur la diagonale (Fig. 6B): on passe de l'un à l'autre en remplaçant  $q^-$  (concentration des unités fermées) par  $q_i$  (concentration des unités bloquées). Par contre, on doit observer que aux Points O<sub>1</sub>, O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub> correspondent sur  $\Delta\Phi = f(q^-)$  les Points P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> et P<sub>3</sub> en fin d'évolution photochimique (Fig. 6A) qui, eux sont bien situés sur la caractéristique [21]; d'ailleurs, pour tous ces points, la significacion du point représentatif sur les abscisses n'est pas modifiée, pour autant que  $q$  et  $q_i$  jouent bien le même rôle. Enfin, il importe de voir que la quantité  $q^-$  portée en abscisses sur la Fig. 6A représente le substrat photochimique transformé et non pas la mesure quantique donnée par l'aire complémentaire normalisée: ces deux quantités ne sont équivalentes que dans le cas normal, en absence de quenching externe sur les centres (par exemple, Fig. 5).

#### RESUME

On a étudié le quenching de la fluorescence et l'inhibition des activités photochimiques d'algues unicellaires et de chloroplastes par le DNB.

L'aire complémentaire  $S(= \int_0^\infty (\Delta\Phi_M - \Delta\Phi) dt)$  est atténuée de la même manière que l'amplitude maximum de la partie variable  $\Delta\Phi_M$ , ce qui suggère une propriété d'invariance de  $S$  proprement normalisé par  $\Delta\Phi_M$ . Une inhibition de caractère photochimique de toutes les activités photochimiques (photosynthèse globale, Photoréactions II et I) se produit dans une même zone de concentration, plus élevée que celle du quenching de  $\Delta\Phi_M$ . Le rapport de la vitesse photochimique en faible lumière à la quantité d'oxygène émise après un éclair demeure invariant, quelque soit le taux d'inhibition. De même, les oscillations de l'émission d'oxygène au cours d'une séquence d'éclairs conservent la même allure, seule l'amplitude est diminuée.

Ces résultats conduisent à postuler que le quenching par le DNB s'exerce à la fois sur la chlorophylle des centres et sur celle des collecteurs des unités photosynthétiques Système II; lorsque le collecteur seul est atteint, l'efficacité de piégeage du centre n'est pas modifiée, par contre la fluorescence est atténuée lorsque le centre a été photochimiquement transformé. On montre que la règle de l'invariance de l'aire complémentaire normalisée s'applique à ce type de quenching; il en résulte que le niveau d'origine au sein de la partie constante, de la fluorescence Système II (cf. réf. 4) se situerait très près du niveau 0 (état adapté à l'obscurité).

#### REFERENCES

- 1 Teale, F. W. (1960) *Biochim. Biophys. Acta* 42, 69-75
- 2 Amesz, J. et Fork, D. C. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 143, 97-107
- 3 Lavorel, J. (1969) in *Progress in Photosynthesis Research* (Metzner, H., ed.), Vol. II, pp. 883-898, H. Laupp, Tübingen
- 4 Lavorel, J. et Joliot, P. (1972) *Biophys. J.* 12, 815-831
- 5 Etienne, A. L. et Lavergne, J. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 283, 268-278
- 6 Papageorgiou, G. et Argoudelis, C. (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* 156, 134-142
- 7 Lavorel, J. (1971) *Photochem. Photobiol.* 14, 261-275
- 8 Joliot, P. et Joliot, A. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 153, 625-634
- 9 Lemasson, C. et Barbieri, G. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 245, 386-397
- 10 Sauer, K. et Park, R. B. (1965) *Biochemistry* 4, 2791-2798
- 11 Avron, M. et Ben-Hayyim, G. (1969) in *Progress in Photosynthesis Research* (Metzner, H., ed.), Vol. III, pp. 1185-1196, H. Laupp, Tübingen

- 12 Lavorel, J. (1958) *J. Chim. Phys.* 55, 911-915
- 13 Livingstone, R. et Ke, C. L. (1950) *J. Am. Chem. Soc.* 72, 909-915
- 14 Malkin, S. et Kok, B. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 126, 413-432
- 15 Murata, N., Nishimura, M. et Takamiya, A. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 120, 23-33
- 16 Joliot, P., Bennoun, P. et Joliot, A. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 305, 317-328
- 17 Joliot, P., Barbieri, G. et Chabaud, R. (1969) *Photochem. Photobiol.* 10, 309-329
- 18 Kok, B., Forbush, B. et Mac Gloin, M. (1970) *Photochem. Photobiol.* 11, 457-475
- 19 Lavorel, J. et Levine, R. P. (1968) *Plant Physiol.* 43, 1049-1055
- 20 Moya, I. (1973) *Thèse de 3e Cycle, Orsay*
- 21 Lavorel, J. (1973) *Physiol. Vég., sous presse*
- 22 Clayton, R. K. (1969) *Biophys. J.* 9, 60-76
- 23 Joliot, A. et Joliot, P. (1964) *C. R. Acad. Sci. Paris* 258, 4622-4625