

BBA 46903

LA PHOTOOXYDATION DU CYTOCHROME *b*-559, EN PRESENCE DE CARBONYLCYANURE-*p*-TRIFLUOROMÉTHOXYPHENYLHYDRAZONE ET DE 2,5-DIBROMO-3-MÉTHYL-6-ISOPROPYL-*p*-BENZOQUINONE, OU DE *p*-BENZOQUINONE, 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, 1974)\*

SUMMARY

*Cytochrome b-559 photooxidation in the presence of carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazine and 2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-p-benzoquinone or p-benzoquinone in three non-photosynthetic mutants of Chlamydomonas reinhardtii*

Studies of absorbance changes related to the cytochrome *b*-559 photooxidation induced by FCCP, with and without addition of 3-*p*-chlorophenyl-1, 1-dimethylurea (CMU), DBMIB or *p*-benzoquinone, in whole cells and in chloroplast fragments of *Chlamydomonas reinhardtii*, were carried out. In addition to the wild type, three strains of non-photosynthetic mutants were used: *Fl* 5, which lacks P 700; *Fl* 9 and *Fl* 15, which are deficient in bound cytochrome *c*-553 and in cytochrome *b*-563.

In the presence of FCCP, whole cells and chloroplast fragments of the four strains showed a System II-dependent photooxidation of cytochrome *b*-559. This photooxidation was inhibited by CMU but it occurred again in presence of FCCP, CMU and DBMIB. In chloroplast fragments, cytochrome *b*-559 photooxidation was also inhibited by an excess of FCCP; it was recovered, likewise, by addition of DBMIB. In whole cells, the highest measured redox changes were: 1  $\mu$ mol oxidized cytochrome *b*-559 per 1 mmol chlorophyll, corresponding approximately to about one seventh (wild type, *Fl* 5) or one fifth (*Fl* 9, *Fl* 15) of the total amount of this cytochrome.

Another kind of cytochrome *b*-559 photooxidation, CMU-insensitive, also occurred in the mutants *Fl* 9 and *Fl* 15 and in the wild type, but not in the mutant *Fl* 5. This latter kind of photooxidation was observed with chloroplast fragments in the presence of FCCP and CMU and also with whole cells in the presence of FCCP,

---

Abbreviations: CCCP, carbonylcyanure *m*-chlorophénylhydrazine; CMU, 3-*p*-chlorophényl-1, 1-diméthylurée; DBMIB, 2,5-dibromo-3-méthyl-6-isopropyl-*p*-benzoquinone; DCIP, 2,6-dichlorophénolindophénol; FCCP, carbonylcyanure-*p*-trifluorométhoxyphénylhydrazine; P 700, chlorophylle *a* holochrome, pigment effecteur de la photoréaction I.

\* Publication retardée par les grèves de poste en France.

CMU and *p*-benzoquinone. These reactions can be attributed to the Photosystem I ; they do not require the intervention of the cytochrome *c*-553.

A high-potential form of cytochrome *b*-559, hydroquinone-reducible, was involved in these two kinds of photooxidation. In addition, a lower potential form, reducible only by ascorbate, appeared to be able to interfere also.

An interpretation is attempted, taking into consideration the various effects of FCCP and DBMIB, at different concentrations, on photosynthetic electron transport.

## INTRODUCTION

Le cytochrome *b*-559 présent dans les chloroplastes des végétaux possède la particularité d'exister sous plusieurs formes différant l'une de l'autre par leur potentiel d'oxydo-réduction. Le cytochrome *b*-559 à haut potentiel, réductible par l'hydroquinone, serait la forme prédominante dans les chloroplastes frais, les feuilles et les algues non traités par un inhibiteur. La valeur de son potentiel est voisine de 350 mV [1-5]. Mais cette forme n'est pas stable et, sous l'action de facteurs variés, elle se modifie donnant une ou plusieurs formes de cytochrome à bas potentiel réductibles par l'ascorbate [6-9]. Un cytochrome *b*-559, réductible uniquement par le  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  et dont le potentiel est voisin de zéro existe aussi dans les chloroplastes frais [1, 5, 10]. C'est en fonction de ces différents potentiels que les auteurs interprètent actuellement les photoréactions *in vivo* du cytochrome *b*-559.

Dans les feuilles et les algues entières ainsi que dans les chloroplastes non traités par un inhibiteur, on n'observe aucune photooxydation du cytochrome *b*-559.

Par contre, l'addition de CCCP ou de FCCP provoque à la lumière une oxydation très nette de ce cytochrome. Les premiers auteurs qui ont étudié la photooxydation du cytochrome *b*-559 en présence de CCCP ou de FCCP l'ont attribuée au Photosystème I [11, 12]. Cette thèse a été aussi soutenue par Cramer et al. [9] et Böhme et Cramer [13]. Ces derniers auteurs ont obtenu une inhibition de la photooxydation du cytochrome *b*-559 (en présence de FCCP) par la dibromothymoquinone (DBMIB), inhibiteur de la plastoquinone, qui interrompt le transfert d'électrons entre les deux photosystèmes, au niveau de ce transporteur. Ce résultat leur permet de conclure non seulement que le cytochrome *b*-559 est oxydé par le Photosystème I via la chaîne classique de transfert d'électrons, mais encore que le cytochrome oxydé est le cytochrome à bas potentiel ( $E \leq 100$  mV), lui seul pouvant donner des électrons à la plastoquinone dont le potentiel actuellement admis serait de 100 mV. Cramer et al. [9] ont de plus montré que dans les chloroplastes, la FCCP pouvait convertir la forme à haut potentiel du cytochrome *b*-559, réductible par l'hydroquinone, en une forme à bas potentiel, réductible par l'ascorbate. C'est cette diminution de potentiel qui expliquerait la stimulation de la photooxydation du cytochrome *b*-559 par la FCCP.

D'autres auteurs ont mis en évidence le rôle du Photosystème II dans la photooxydation du cytochrome *b*-559 en présence de CCCP ou de FCCP. Hiller et al. [14] constatent qu'après addition de CCCP le cytochrome *b*-559 est oxydé tout aussi bien en lumière rouge qu'en lumière rouge lointain contrairement au cytochrome *c*-553, et que la vitesse initiale de cette oxydation est ralentie par la CMU. Anderson et al.

[15] confirment et complètent le travail de Hiller et al. [14] et montrent que la DBMIB a peu d'effet sur l'oxydation provoquée par des radiations de  $\lambda = 655$  nm, mais inhibe complètement l'oxydation induite dans le rouge lointain. Pour ces auteurs la photooxydation du cytochrome *b*-559 en présence de CCCP ou de FCCP est dirigée soit par le Photosystème I soit par le Photosystème II et le Photosystème I associés. Ben-Hayyim [16, 17] confirme l'efficacité du Photosystème II dans la photooxydation du cytochrome *b*-559 en présence de FCCP et constate que c'est le cytochrome à haut potentiel qui est photooxydé.

Les travaux qui viennent d'être cités concernent principalement le cytochrome *b*-559 des chloroplastes de plantes supérieures; quelques-uns, cependant, se rapportent au cytochrome *b*-559 d'*Euglena* [2] et à celui de *Chlamydomonas* [10].

Dans le présent travail, nous avons abordé cette question de la photooxydation du cytochrome *b*-559 en présence de FCCP et de DBMIB, en utilisant trois mutants de *Chlamydomonas reinhardtii*. L'un d'eux, *Fl 5*, ne possède pas de Photosystème I actif [20]. Les deux autres, *Fl 9* et *Fl 15*, sont déficients en cytochrome *c*-553 lié et en cytochrome *b*-563 [18, 20]. Dans ces deux derniers mutants, les Photosystèmes I et II sont fonctionnels mais la chaîne de transfert d'électrons qui relie les deux photosystèmes est interrompue au niveau du cytochrome *c*-553. Des cellules entières, d'une part, et des fragments de chloroplastes, d'autre part, ont été employés. Les résultats obtenus ont permis de mettre nettement en évidence, avec les quatre souches, une photooxydation du cytochrome *b*-559 par le Système II en présence de FCCP, photooxydation inhibée par la CMU et restaurée par la DBMIB. De plus, une photooxydation par le Système I a aussi été observée dans le cas des souches *Fl 9*, *Fl 15* et sauvage, avec des cellules placées en présence de FCCP, de CMU et de *p*-benzoquinone et avec des fragments de chloroplastes placés en présence de FCCP et de CMU.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les souches de *C. reinhardtii* qui font l'objet de ce travail, mutants *Fl 5*, *Fl 9* et *Fl 15*, isolés au laboratoire, et souche sauvage dont ils dérivent, ont déjà été décrites [18–20]. Chacune de ces souches est cultivée à la lumière, en milieu Tris/acétate/phosphate [21], comme indiqué précédemment [18, 19].

Pour la préparation des fragments de chloroplastes, les cellules, en suspension dans un tampon phosphate 0.01 M, KCl 0.02 M et  $\text{MgCl}_2$   $2.5 \cdot 10^{-3}$  M (pH 7.5), sont soumises à une compression (75 bars) suivie de décompression subite, dans une presse de French pneumatique [22] (YEDA Scientific Instruments, Israël). Deux centrifugations, 6 min à  $480 \times g$  puis 15 min à  $30\,000 \times g$ , permettent de séparer les fragments de chloroplastes qui sont repris dans du tampon frais. Les chlorophylles *a+b* sont dosées selon Mac Kinney [23] et Arnon [24].

La photoréduction du DCIP est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Cary 14, selon la méthode précédemment décrite [19].

La photooxydation du cytochrome *b*-559 est mesurée avec un spectrophotomètre Aminco-Chance à double faisceau. Les cellules entières (100  $\mu\text{g}$  de chlorophylles *a+b*/ml) sont mises en suspension dans un tampon phosphate 0.01 M (pH 7.5) additionné de 5 % de dextran T 80 pour empêcher la sédimentation. La préparation (2.5 ml) est éclairée latéralement par une lampe à Xénon. Sur le trajet de la lumière actinique sont placés un filtre interférentiel Balzers "K7" (bande passante à mi-trans-

mission: 690–730 nm, maximum à 711 nm) et un filtre anticalorique (Balzers, "calflex B<sub>1</sub>K<sub>1</sub>"). L'intensité de la lumière incidente est de  $2 \cdot 10^4$  ergs  $\cdot$  cm<sup>-2</sup>  $\cdot$  s<sup>-1</sup>. Le photomultiplicateur est protégé par un filtre bleu Corning 4-76. Le coefficient d'extinction utilisé pour le cytochrome *b*-559 est 20 cm<sup>2</sup>  $\cdot$  mol<sup>-1</sup> [25].

Les échanges d'O<sub>2</sub> sont mesurés ampérométriquement au moyen d'une électrode à membrane (Beckman) adaptée sur un montage de mesure construit au laboratoire [19]. Les cellules (40 µg de chlorophylles *a*+*b*/ml) sont en suspension dans 5 ml d'un mélange de tampon phosphate 0.01 M et de tampon carbonate/bicarbonate 0.05 M (pH 8). La préparation est éclairée par deux lampes de microscope équipées de filtres anticaloriques (filtres Balzers "calflex B<sub>1</sub>K<sub>1</sub>"). L'intensité lumineuse (lumière blanche) est de  $1.7 \cdot 10^6$  ergs  $\cdot$  cm<sup>-2</sup>  $\cdot$  s<sup>-1</sup>.

La DBMIB, qui a été utilisée, provient du laboratoire du Dr A. Trebst.

## RÉSULTATS

### La photooxydation du cytochrome *b*-559 dans les cellules de *C. reinhardtii*

En absence de toute addition, dans les cellules de la souche sauvage de *C. reinhardtii*, on observe, à la lumière, la photooxydation du cytochrome *c*-553, photooxydation non inhibée par la CMU (Fig. 1). La photooxydation du cytochrome *c*-553 n'a pas lieu chez les mutants. Dans les cellules non traitées par un inhibiteur ou traitées seulement par de la CMU, on n'observe, à la lumière, aucune variation d'absorbance à 559 nm, ni avec la souche sauvage ni avec les mutants (Figs 2a et 2b).

En présence de FCCP, dans les cellules de *Fl 5* (mutant dépourvu de P 700), on observe, à la lumière, une diminution d'absorbance (Fig. 2a) qui présente un maximum à 559 nm (Fig. 3). Cette variation correspond à une photooxydation du cytochrome *b*-559. Elle est suivie, à l'obscurité, d'une réduction rapide; elle est donc

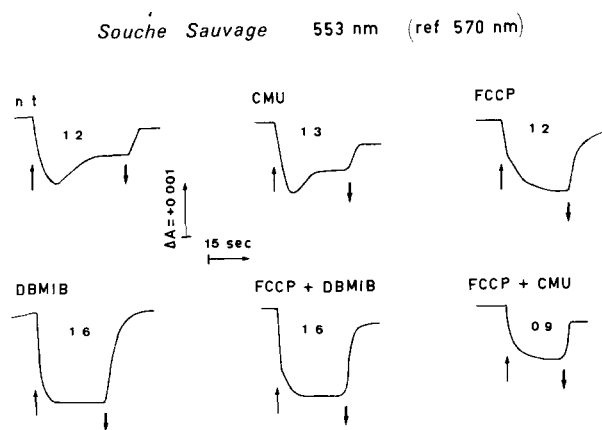


Fig. 1. Photooxydation du cytochrome *c*-553 dans les cellules de la souche sauvage de *C. reinhardtii*. La lumière actinique (690–730 nm à mi-transmission,  $2 \cdot 10^4$  ergs  $\cdot$  cm<sup>-2</sup>  $\cdot$  s<sup>-1</sup>) excite les deux photosystèmes. Les mesures sont effectuées à 553 nm (référence: 570 nm). Les cellules (100 µg de chlorophylles *a*+*b*/ml) sont en suspension dans un tampon phosphate 0.01 M (pH 7.5) additionné de 5 % de dextran T 80. Les chiffres indiquent la variation totale d'absorbance ( $\times 10^3$ ) pour 100 µg de chlorophylles *a*+*b*/ml. n.t., cellules non traitées par un inhibiteur; CMU,  $1.2 \cdot 10^{-4}$  M; FCCP,  $1.20 \cdot 10^{-4}$  M; DBMIB,  $4.8 \cdot 10^{-5}$  M  $\uparrow$ , lumière;  $\downarrow$ , obscurité.

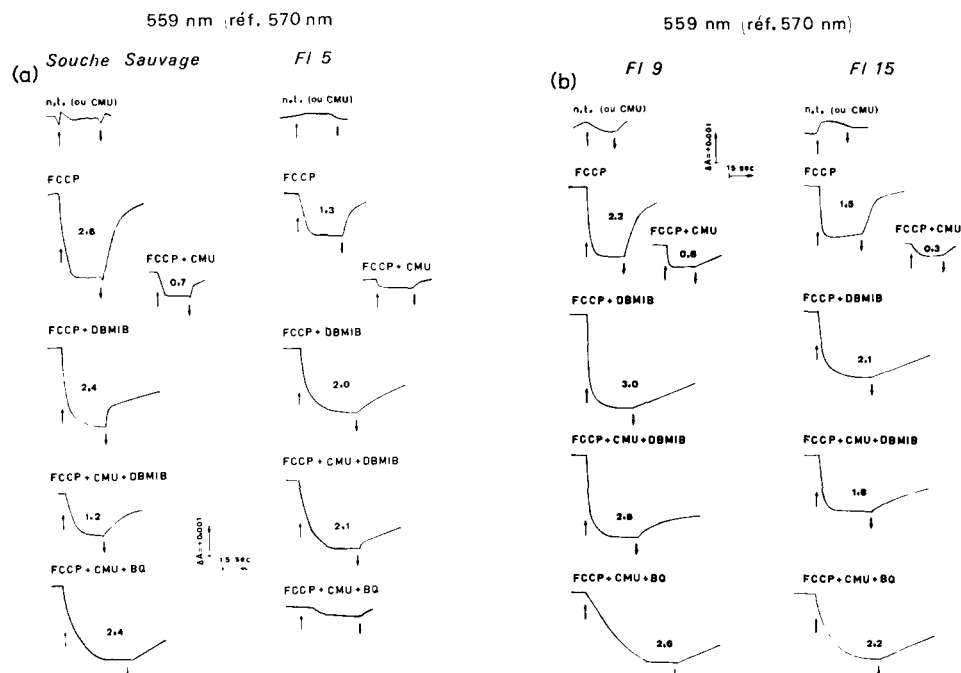


Fig. 2. (a) Photooxydation du cytochrome *b*-559 dans les cellules de la souche sauvage et du mutant *Fl 5* de *C. reinhardtii*. Les mesures sont faites à 559 nm (référence: 570 nm). Voir les autres conditions expérimentales dans la légende de la Fig. 1. BQ: *p*-benzoquinone ( $1.2 \cdot 10^{-4}$  M). (b) Photooxydation du cytochrome *b*-559 dans les cellules des mutants *Fl 9* et *Fl 15* de *C. reinhardtii*. Les conditions expérimentales sont les mêmes que pour la Fig. 2a.

réversible. Cette oxydation est supprimée par la CMU (Fig. 2a). Dans cette souche (*Fl 5*) ne possédant pas de Système I fonctionnel, le cytochrome *b*-559 est manifestement oxydé par le Photosystème II.

Une telle photooxydation du cytochrome *b*-559 en présence de FCCP, réversible, supprimée par la CMU, s'observe de même aussi bien dans les deux mutants *Fl 9* et *Fl 15*, chez lesquels la chaîne de transfert d'électrons est interrompue au niveau du cytochrome *c*-553, que dans la souche sauvage (Figs 2a et 2b). Le spectre de différence: lumière moins obscurité de la souche sauvage traitée par la FCCP, présente, outre le pic du cytochrome *b*-559 à 559 nm, un épaulement à 553 nm correspondant à la photooxydation du cytochrome *c*-553 (Fig. 3). La photooxydation du cytochrome *c*-553 n'est pas inhibée par la CMU, ni en absence ni en présence de FCCP (Fig. 1).

Avec les quatre souches, la variation maximum d'absorbance due au cytochrome *b*-559 est obtenue pour une concentration optimum de FCCP, voisine de  $1.2 \cdot 10^{-4}$  M, pour laquelle le dégagement photosynthétique d'O<sub>2</sub> dans la souche sauvage est inhibé de 44 % (Tableau I). Des concentrations plus élevées de FCCP inhibent de plus en plus le dégagement photosynthétique d'O<sub>2</sub>, mais ne font plus guère varier l'amplitude de la photooxydation du cytochrome *b*-559.

La variation maximum d'absorbance observée dans les quatre souches correspond à 1  $\mu$ mol de cytochrome *b*-559 oxydé pour 1 mmol de chlorophylles *a*+*b*. En se basant sur les teneurs en cytochrome *b*-559, qui ont été antérieurement détermi-

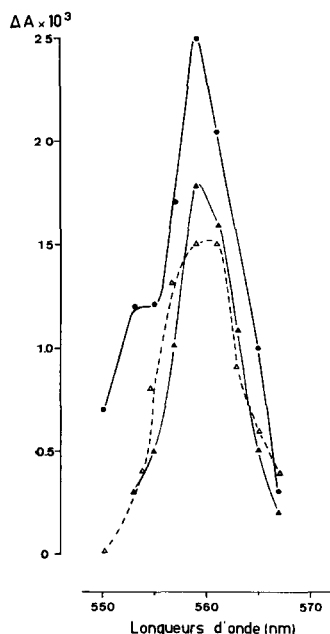


Fig. 3. Spectres de différence: lumière moins obscurité des variations d'absorbance obtenues par éclaircissement d'une suspension de cellules ( $100 \mu\text{g}$  de chlorophylles  $a+b/\text{ml}$ ) du mutant *Fl 5* et de la souche sauvage de *C. reinhardtii* traitées par de la FCCP  $1.20 \cdot 10^{-4}$  M.  $\blacktriangle-\blacktriangle$ , *Fl 5*,  $\lambda$  de référence: 570 nm;  $\triangle-\triangle$ , *Fl 5*,  $\lambda$  de référence: 542 nm;  $\bullet-\bullet$ , souche sauvage,  $\lambda$  de référence: 570 nm. Les autres conditions expérimentales sont les mêmes que pour la Fig. 1.

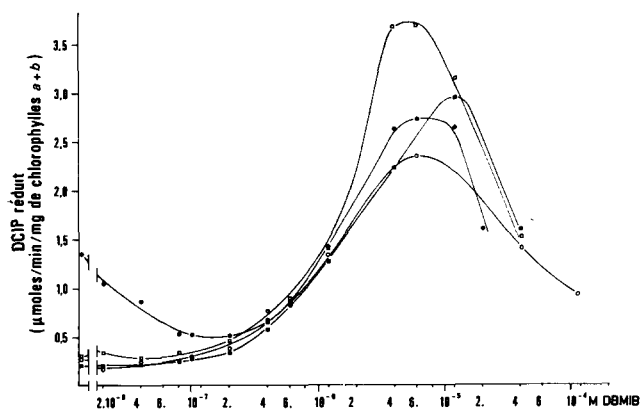


Fig. 4. Action de la DBMIB sur la photoréduction du DCIP par des fragments de chloroplastes de la souche sauvage et des mutants *Fl 5*, *Fl 9* et *Fl 15* de *C. reinhardtii*. Les fragments de chloroplastes ( $10 \mu\text{g}$  de chlorophylles  $a+b/\text{ml}$ ) sont mis en suspension dans le milieu: tampon phosphate 0.01 M, pH 7.5, KCl 0.02 M,  $\text{MgCl}_2$   $2.5 \cdot 10^{-3}$  M et DCIP:  $4.7 \cdot 10^{-5}$  M. Éclaircissement actinique: source infrarouge du spectrophotomètre, environ  $1 \cdot 10^6 \text{ ergs} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Mesure à 600 nm.  $\bullet$ , Souche sauvage;  $\square$ , *Fl 5*;  $\blacksquare$ , *Fl 9*;  $\circ$ , *Fl 15*.

TABLEAU I

PHOTOOXYDATION DU CYTOCHROME *b*-559 ET DÉGAGEMENT PHOTOSYNTHÉTIQUE D'O<sub>2</sub>, DANS LES CELLULES DE *C. REINHARDTI* EN PRÉSENCE DE FCCP A DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS

Pour le dégagement photosynthétique d'O<sub>2</sub>, les activités sont exprimées en % du témoin sans FCCP. Les cellules (40 µg de chlorophylles *a*+*b*/ml) sont mises en suspension dans un mélange de tampon phosphate 0.01 M et de tampon carbonate/bicarbonate 0.05 M (pH 8). Les échanges d'O<sub>2</sub> sont mesurés ampérométriquement; éclairage en lumière blanche:  $1.7 \cdot 10^6$  ergs · cm<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>.

Pour la photooxydation du cytochrome *b*-559, les cellules (100 µg de chlorophylles *a*+*b*/ml) sont mises en suspension dans un tampon phosphate 0.01 M (pH 7.5) additionné de 5 % de dextran T 80. Spectrophotomètre à double faisceau Aminco-Chance, mesure à 559 nm (référence: 570 nm); éclairage actinique: lampe à Xénon + filtre rouge sombre à bande large (690–730 nm),  $2.10^4$  ergs · cm<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>. n.d.: non déterminé.

Concentration de la FCCP (M)	Dégagement d'O <sub>2</sub> (%)	Photooxydation du cytochrome <i>b</i> -559 (µmol/mmol de chlorophylles <i>a</i> + <i>b</i> )	
	Souche sauvage	Souche sauvage	Mutant <i>Fl</i> 9
0	100	0	0
$5.90 \cdot 10^{-6}$	92	0.6	0.3
$1.20 \cdot 10^{-5}$	85	0.7	0.5
$5.90 \cdot 10^{-5}$	82	n.d.	0.5
$1.20 \cdot 10^{-4}$	56	0.9	0.5
$2.30 \cdot 10^{-4}$	38	1.0	0.9
$4.00 \cdot 10^{-4}$	27	n.d.	0.9
$6.00 \cdot 10^{-4}$	20	1.1	n.d.
$1.20 \cdot 10^{-3}$	16	0.9	n.d.

nées de façon approximative pour chacune des quatre souches [18], on peut calculer que cette variation d'absorbance correspond à un septième, dans les cas de la souche sauvage et du mutant *Fl* 5, et à un cinquième, dans les cas de *Fl* 9 et de *Fl* 15, du cytochrome *b*-559 contenu dans les algues. Les deux mutants *Fl* 9 et *Fl* 15 ont en effet une teneur en cytochrome *b*-559 plus faible que celle de la souche sauvage.

*Action de la DBMIB sur le transfert photosynthétique d'électrons chez les trois mutants et la souche sauvage de C. reinhardtii*

Il est bien connu que la DBMIB exerce deux effets différents sur le transfert photosynthétique d'électrons. A faible concentration la DBMIB inhibe la réaction de Hill en interrompant le transfert d'électrons entre les deux photosystèmes au niveau de la plastoquinone [26]. A des concentrations plus élevées, la DBMIB agit comme un transporteur d'électrons qui stimule les transferts d'électrons liés au fonctionnement du Photosystème II [27–29].

L'influence de la concentration de la DBMIB sur le transfert d'électrons dans *C. reinhardtii* a été étudiée avec des cellules entières, en mesurant le dégagement photosynthétique d'O<sub>2</sub>, et avec des fragments de chloroplastes, en mesurant la photo-réduction du DCIP.

Dans les fragments de chloroplastes (Fig. 4), l'inhibition partielle de la réaction de Hill par la DBMIB, aux faibles concentrations ( $2\text{--}10 \cdot 10^{-8}$  M), ne s'observe qu'avec la souche sauvage. Chez les mutants *Fl* 5, *Fl* 9, *Fl* 15, l'activité de photoréduction

du DCIP est initialement très faible et elle n'est pas diminuée par la DBMIB. L'absence d'effet de la DBMIB confirme que chez ces mutants la chaîne de transfert d'électrons est déjà interrompue entre les deux photosystèmes. A des concentrations plus élevées, jusqu'à environ  $10^{-5}$  M, la DBMIB stimule fortement la réaction de Hill et cette stimulation se produit avec les quatre souches: la DBMIB, jouant le rôle d'accepteur d'électrons, intervient alors dans la photoréduction du DCIP. La stimulation de la photoréduction du DCIP par la DBMIB est limitée à l'activité du Photosystème II, comme le confirme le parallélisme des courbes obtenues avec le mutant *Fl 5* (dépourvu de P 700) d'une part et les trois autres souches d'autre part. Il a, par ailleurs, été constaté que cette photoréduction en présence de DBMIB ( $7.2 \cdot 10^{-6}$  M) est inhibée par la CMU  $10^{-4}$  M, mais qu'elle est peu sensible à la FCCP  $8 \cdot 10^{-6}$  M. Au delà d'une concentration optimum de DBMIB ( $10^{-5}$  M), il y a de nouveau inhibition de la réaction de Hill. Une inhibition comparable a déjà été observée par de Kouchkovsky avec des chloroplastes d'épinard [29].

Dans les cellules entières de la souche sauvage (Fig. 5) le dégagement photosynthétique d' $O_2$  est inhibé par la DBMIB à faibles concentrations ( $4.8\text{--}7.2 \cdot 10^{-6}$  M). A des concentrations supérieures ( $4.8 \cdot 10^{-5}$  M) la DBMIB devient transporteur d'électrons et provoque à la lumière une réaction de Mehler, comme l'ont déjà mis en évidence Gould et al. [27] avec des chloroplastes d'épinard. Avec *C. reinhardtii*, cette réaction de Mehler est suivie, à l'obscurité, d'un dégagement d' $O_2$  faisant intervenir une catalase endogène.

Les cellules entières des trois mutants non photosynthétiques ne dégagent pas d' $O_2$  à la lumière [30]. Mais à fortes concentrations ( $4.8 \cdot 10^{-5}$  M), la DBMI By

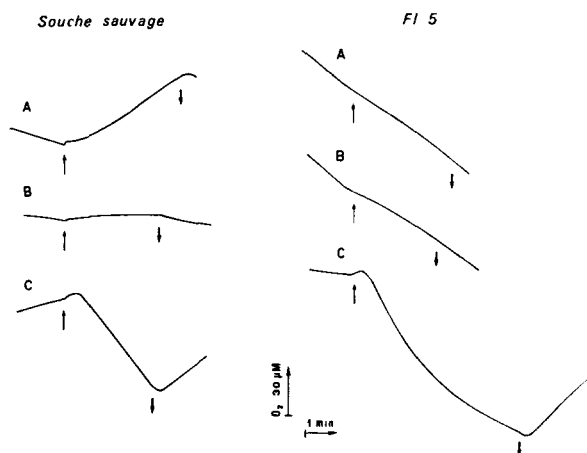


Fig. 5. Echanges d' $O_2$  dans les cellules de la souche sauvage et du mutant *Fl 5* de *C. reinhardtii*, en présence de DBMIB. Les cellules ( $40 \mu\text{g}$  de chlorophylles  $a+b/\text{ml}$ ) sont en suspension dans un mélange de tampon phosphate  $0.01$  M et de tampon carbonate/bicarbonate  $0.05$  M (pH 8). Mesure ampérométrique de l' $O_2$ , à  $25^\circ\text{C}$ ; lumière blanche ( $1.7 \cdot 10^6 \text{ ergs} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ). A : DBMIB = 0, photosynthèse normale avec la souche sauvage. B: DBMIB =  $7.2 \cdot 10^{-6}$  M, concentration inhibitrice du transfert d'électrons entre les deux photoréactions. C: DBMIB =  $4.8 \cdot 10^{-5}$  M, agissant comme transporteur d'électrons: réaction de Mehler avec absorption d' $O_2$  à la lumière et dégagement d' $O_2$  à l'obscurité.  $\uparrow$ , lumière;  $\downarrow$ , obscurité.



provoque, comme dans la souche sauvage, une réaction de Mehler, liée au fonctionnement du photosystème II et nettement observable avec *Fl 5* (Fig. 5C).

*Action de la DBMIB sur la photooxydation du cytochrome b-559 dans les cellules*

(a) *Photooxydation en présence de FCCP*. Aux faibles concentrations ( $\leq 7.2 \cdot 10^{-6}$  M) pour lesquelles la DBMIB est inhibiteur du dégagement d' $O_2$  la photooxydation du cytochrome *b-559* n'est pas diminuée d'une manière appréciable dans les cellules de la souche sauvage; elle n'est inhibée que pour des concentrations élevées de DBMIB ( $9.6 \cdot 10^{-5}$  M) (Tableau II). Cette dernière inhibition est observée aussi dans *Fl 15*, ainsi que dans *Fl 5* dont le Photosystème I n'est pas fonctionnel. Elle n'apparaît pas chez *Fl 9*. Aux concentrations inférieures à  $9.6 \cdot 10^{-5}$  M, la DBMIB stimule légèrement la photooxydation du cytochrome *b-559* dans les cellules des mutants (Tableau II) tout en diminuant considérablement (environ quatre fois) la vitesse de sa réduction à l'obscurité (cf. Figs 2a et 2b). La photooxydation du cytochrome *b-559* dans ce cas est reproductible après une période d'obscurité suffisante (2–3 min). La DBMIB ne ralentit pas la vitesse de réduction à l'obscurité du cytochrome *c-553*, qui a été préalablement photooxydé, dans les cellules de la souche sauvage (Fig. 1).

(b) *Photooxydation en présence de FCCP et de CMU*. Nous avons vu précédemment (Figs 2a et 2b) que la photooxydation du cytochrome *b-559* en présence de FCCP

TABLEAU II

ACTION DE LA DBMIB ET DE LA *p*-BENZOQUINONE SUR LA PHOTOOXYDATION DU CYTOCHROME *b-559* DANS DES CELLULES DE *C. REINHARDTI* (SOUCHE SAUVAGE ET MUTANTS *Fl 5*, *Fl 9* ET *Fl 15*), PLACÉES EN PRÉSENCE DE FCCP

Pour chaque souche, les quantités de cytochrome *b-559* photooxydé sont exprimées en % de la quantité photooxydée en présence de FCCP seul. Les cellules ( $100 \mu\text{g}$  de chlorophylles *a+b/ml*) sont en suspension dans un tampon phosphate 0.01 M (pH 7.5) additionné de 5 % de dextran T 80. Tous les lots sont traités par la FCCP  $1.20 \cdot 10^{-4}$  M. Spectrophotomètre à double faisceau Aminco-Chance, mesure à 559 nm (référence 570 nm); éclairage actinique: lampe à Xénon + filtre à bande large (690–730 nm),  $2 \cdot 10^4$  ergs  $\cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . CMU:  $1.2 \cdot 10^{-4}$  M. n.d.: non déterminé.

Concentration (M)	Photooxydation du cytochrome <i>b-559</i>							
	Souche sauvage		Mutants					
			<i>Fl 5</i>		<i>Fl 9</i>		<i>Fl 15</i>	
	—	CMU	—	CMU	—	CMU	—	CMU
<b>DBMIB</b>								
0	100	33	100	21	100	30	100	20
$7.20 \cdot 10^{-6}$	83	n.d.	128	21	130	30	n.d.	n.d.
$1.44 \cdot 10^{-5}$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	120	62
$4.80 \cdot 10^{-5}$	72	66	150	150	130	125	140	120
$9.60 \cdot 10^{-5}$	22	33	15	0	135	115	46	46
<b><i>p</i>-Benzoquinone</b>								
0	100	33	100	21	100	30	100	20
$0.12 \cdot 10^{-3}$	116	133	71	0	n.d.	n.d.	80	140
$0.24 \cdot 10^{-3}$	61	66	50	0	108	108	93	150

est en partie supprimée par la CMU. Cette photooxydation est rétablie par la DBMIB à une concentration ( $4.8 \cdot 10^{-5}$  M) pour laquelle la DBMIB agit comme transporteur d'électrons. La restauration est plus ou moins importante; elle apparaît moins nettement pour la souche sauvage que pour les mutants; elle est reproductible après une période d'obscurité plus ou moins longue (2–3 min). Elle s'observe très bien dans *Fl 5* et semble donc liée uniquement au fonctionnement du Photosystème II.

*Action de la p-benzoquinone sur la photooxydation du cytochrome b-559 en présence de FCCP et CMU*

On a comparé l'action de la DBMIB à celle de la *p*-benzoquinone, autre accepteur d'électrons liposoluble différant de la DBMIB par sa plus grande sensibilité à la CMU. La photoréduction de la *p*-benzoquinone par le Photosystème II est inhibée par la CMU alors que la photoréduction de la DBMIB par le Photosystème II résiste partiellement à la CMU [27, 29].

En présence de FCCP et de CMU, la *p*-benzoquinone restaure la photooxydation du cytochrome *b*-559 dans *Fl 9*, *Fl 15* et la souche sauvage. Cette restauration ne se produit pas dans *Fl 5*, dépourvu de P 700. La *p*-benzoquinone, coupée du Photosystème II par la CMU, ne réagit plus qu'avec le Photosystème I. Dans les trois

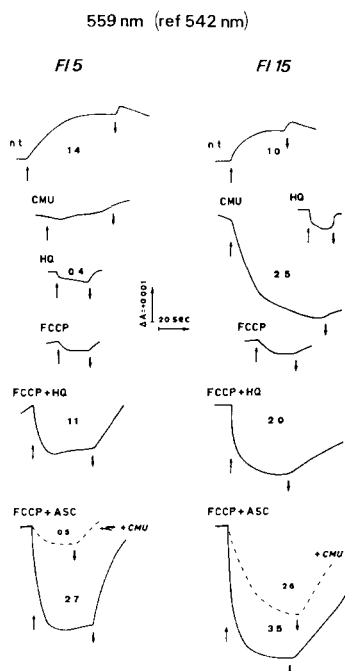


Fig. 6. Photoréduction et photooxydation du cytochrome *b*-559 dans des fragments chloroplastiques des mutants *Fl 5* et *Fl 15* de *C. reinhardtii*. Les mesures sont faites à 559 nm (référence: 542 nm). Les fragments de chloroplastes ( $100 \mu\text{g}$  de chlorophylles *a*+*b*/ml) sont en suspension dans un tampon phosphate 0.01 M (pH 7.5). n.t., fragments de chloroplastes non traités par un inhibiteur; CMU,  $1.2 \cdot 10^{-4}$  M; FCCP,  $9.6 \cdot 10^{-6}$  M; DBMIB,  $7.2 \cdot 10^{-6}$  M; HQ, hydroquinone  $1.2 \cdot 10^{-3}$  M; ASC, ascorbate de sodium  $1.2 \cdot 10^{-3}$  M. Les autres conditions expérimentales sont semblables à celles qui sont indiquées dans la légende de la Fig. 1.

souches où le Photosystème I est fonctionnel, il s'établit alors à la lumière, via la *p*-benzoquinone, une oxydation du cytochrome *b*-559 par le Photosystème I; cette photooxydation ne fait pas intervenir le cytochrome *c*-553 lié, absent chez *Fl* 9 et *Fl* 15 (Tableau II, Figs 2a et 2b).

*Photooxydation du cytochrome b-559 dans des fragments de chloroplastes obtenus à partir de Chlamydomonas*

Dans des fragments de chloroplastes non traités, on observe avec toutes les souches une photoréduction du cytochrome *b*-559 qui n'a pas lieu en présence d'hydroquinone. Ce serait donc le cytochrome à haut potentiel, réductible par l'hydroquinone, qui serait photoréduit (Fig. 6). La CMU supprime cette photoréduction; il se produit alors dans les fragments de chloroplastes de *Fl* 9, de *Fl* 15 et de la souche sauvage, mais non dans ceux de *Fl* 5, une photooxydation du cytochrome *b*-559 que l'on peut attribuer au Photosystème I.

En présence de FCCP, il n'y a plus photoréduction mais photooxydation du cytochrome *b*-559; celle-ci ne s'observe qu'en présence d'un réducteur: hydroquinone ou ascorbate (Fig. 6). Cette exigence de l'addition d'un réducteur n'existe ni avec les cellules entières ni avec les chloroplastes d'épinard (traités également par la FCCP). Avec les fragments de chloroplastes de *Fl* 5 placés en présence de FCCP et d'ascorbate ou d'hydroquinone, on observe une photooxydation du cytochrome *b*-559, inhibée par la CMU, plus importante en présence d'ascorbate qu'en présence

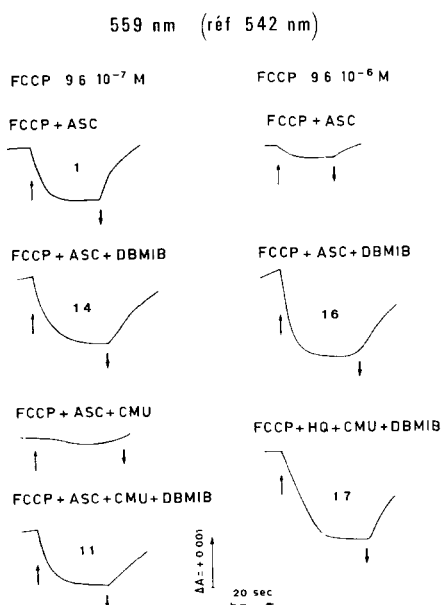


Fig. 7. Restauration par la DBMIB de la photooxydation du cytochrome *b*-559, dans les fragments de chloroplastes du mutant *Fl* 9 de *C. reinhardtii*. Les fragments de chloroplastes sont préparés après traitement des cellules aux ultra-sons pendant 45 s. La photooxydation du cytochrome *b*-559 est inhibée soit par la CMU ( $1.2 \cdot 10^{-4}$  M) dans le cas d'une concentration optimum de FCCP:  $9.6 \cdot 10^{-7}$  M, soit par la FCCP en concentration élevée:  $9.6 \cdot 10^{-6}$  M. Les autres conditions expérimentales sont les mêmes que pour la Fig. 6.

d'hydroquinone. Ce mutant étant dépourvu de P 700, il s'agit donc d'une oxydation par le Système II. Mais dans les fragments de chloroplastes de la souche sauvage et des mutants *Fl 9* et *Fl 15* (dépourvus de cytochrome *c-553* lié), l'oxydation du cytochrome *b-559* n'est que partiellement inhibée par la CMU (cf. le cas de *Fl 15*, Fig. 6). Avec ces trois souches, en effet, on observe, en présence de FCCP et de CMU, une photooxydation du cytochrome *b-559* par le Système I, photooxydation indépendante du cytochrome *c-553*, plus importante en présence d'ascorbate qu'en présence d'hydroquinone. Cette oxydation rappelle celle qui a été observée dans les cellules de la souche sauvage et des mutants *Fl 9* et *Fl 15*, placés en présence de FCCP, de CMU et de *p*-benzoquinone.

Ce type de photooxydation par le Système I ne se retrouve pas dans toutes les préparations chloroplastiques. La Fig. 7 illustre par exemple, le cas de fragments de chloroplastes obtenus par traitement aux ultrasons de cellules du mutant *Fl 9*. Dans ces fragments de chloroplastes, le cytochrome *b-559* est oxydé en présence d'une concentration optimum de FCCP qui est dix fois plus faible que celle utilisée précédemment (Fig. 6). La photooxydation est inhibée par la CMU et est restaurée par la DBMIB à une concentration ( $7.2 \cdot 10^{-6}$  M) pour laquelle la DBMIB se comporte comme un transporteur d'électrons avec les fragments de chloroplastes (cf. Fig. 4). On se trouve donc devant une photooxydation par le Système II comparable à celle observée dans les cellules; le même genre de photooxydation par le Système II a aussi été constaté avec des préparations chloroplastiques similaires de *Fl 5*, de *Fl 15* et de la souche sauvage.

TABLEAU III

PHOTOOXYDATION DU CYTOCHROME *b-559* ET PHOTORÉDUCTION DU DCIP PAR DES FRAGMENTS DE CHLOROPLASTES DU MUTANT *Fl 9* DE *C. REINHARDTI*, EN PRÉSENCE DE FCCP A DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS

Les résultats sont exprimés en % des activités les plus fortes obtenues en absence de DBMIB: en présence d'ascorbate et de FCCP  $0.96 \mu\text{M}$ , dans le cas de la photooxydation du cytochrome *b-559* d'une part, en l'absence de FCCP dans le cas de la photoréduction du DCIP d'autre part. Les fragments de chloroplastes (préparés par traitement aux ultra-sons) sont mis en suspension dans un tampon phosphate  $0.01$  M, KCl  $0.02$  M et  $\text{MgCl}_2$   $2.5 \cdot 10^{-3}$  M (pH 7.5). Pour la photooxydation du cytochrome *b-559*:  $100 \mu\text{g}$  de chlorophylles *a+b/ml*; spectrophotomètre à double faisceau Aminco-Chance, mesure à  $559$  nm (référence:  $542$  nm); éclairage actinique: lampe à Xénon + filtre rouge sombre à bande large ( $690\text{--}730$  nm),  $2.10^4$  ergs  $\cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Pour la photoréduction du DCIP:  $10 \mu\text{g}$  de chlorophylles *a+b/ml*; spectrophotomètre Cary 14, mesure à  $600$  nm; éclairage actinique: source infrarouge du spectrophotomètre, environ  $1.10^6$  ergs  $\cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Concentration des réactifs: ascorbate de sodium (Asc):  $1.2 \cdot 10^{-3}$  M; DCIP:  $4.7 \cdot 10^{-5}$  M; DBMIB:  $7.2 \cdot 10^{-6}$  M n.d.: non déterminé.

Concentration de la FCCP ( $\mu\text{M}$ )	Photooxydation du cytochrome <i>b-559</i>		Photoréduction du DCIP
	Asc.	Asc. + DBMIB	
0	0	0	100
0.19	60	77	81.4
0.96	100	140	78.2
1.90	68	180	73
9.6	0	155	37.6
120	n.d.	n.d.	22

Lorsqu'on augmente la concentration de la FCCP au-delà de la concentration optimum, le transfert d'électrons et la photooxydation du cytochrome *b*-559 sont alors inhibés par la FCCP elle-même (Tableau III et Fig. 7). Mais dans ce cas, l'inhibition de la photooxydation du cytochrome *b*-559 par la FCCP peut être levée avec de la DBMIB  $7.2 \cdot 10^{-6}$  M. La CMU n'empêche pas la restauration, qui se fait aussi bien en présence d'hydroquinone qu'en présence d'ascorbate: c'est donc vraisemblablement le cytochrome *b*-559 à haut potentiel qui est photooxydé. Cette inhibition par la FCCP, levée par la DBMIB, a été observée avec les quatre souches; elle peut être rapprochée de l'inhibition par la CMU, observée dans les cellules et dans les fragments de chloroplastes et levée elle aussi par la DBMIB.

## DISCUSSION

Lorsque l'on ajoute de la FCCP à des cellules de la souche sauvage et de chacun des trois mutants *Fl* 5, *Fl* 9 et *Fl* 15, une photooxydation du cytochrome *b*-559 par le Photosystème II est observée. Cette photooxydation est supprimée par la CMU; elle est rétablie par la DBMIB en forte concentration. La restauration par la DBMIB est liée au fonctionnement du photosystème II, comme le prouvent les résultats obtenus avec le mutant *Fl* 5.

Avec les fragments de chloroplastes des quatre souches, en présence de FCCP et d'un réducteur, on observe de même une photooxydation du cytochrome *b*-559 par le Photosystème II, photooxydation également inhibée par la CMU et restaurée par la DBMIB. Dans les fragments de chloroplastes, on observe, en outre, une inhibition de la photooxydation du cytochrome *b*-559 par la FCCP en trop forte concentration. Cette inhibition est levée elle aussi par la DBMIB. Il y a donc similitude entre l'inhibition par la CMU et l'inhibition par la FCCP. L'inhibition par la FCCP est certainement en rapport avec la possibilité de plusieurs sites d'action pour ce type d'inhibiteurs, ainsi que l'a récemment montré Homann [31] dans le cas de la CCCP. Selon cet auteur, la CCCP, outre son action du côté oxydant du Système II, pourrait inhiber aussi, comme la CMU, le transfert d'électrons entre Q, le premier accepteur de la Photoréaction II, et le second accepteur, le pool A, assimilé à la plastoquinone par de nombreux auteurs. Cette inhibition par la FCCP existe probablement aussi dans les cellules et c'est vraisemblablement sa levée par la DBMIB qui est responsable de la stimulation de la photooxydation du cytochrome *b*-559, en absence de CMU, observée avec les cellules de mutants traitées par la FCCP (Tableau II et Figs 2a et 2b).

Le schéma de la Fig. 8 propose une interprétation de la photooxydation du cytochrome *b*-559 en présence de FCCP, qui tient compte de l'action de la DBMIB et des deux sites d'inhibition de la FCCP. Le premier de ces sites se placerait du côté du système d'oxydation de l'eau: la FCCP inhibe le dégagement photosynthétique d'O<sub>2</sub> et les transferts d'électrons (réactions de Hill) associés [32]. Cependant la photooxydation du cytochrome *b*-559 s'observe très bien même lorsque ce transfert d'électrons n'est que partiellement inhibé par la FCCP (Tableaux I et III); des faits similaires ont été constatés par Anderson et al. [15], avec des chloroplastes d'épinard et de pois. Il suffit donc que le transfert des électrons provenant de l'eau soit un peu perturbé pour que la photooxydation du cytochrome *b*-559 se produise.

Le deuxième site d'inhibition de la FCCP se situerait près du site d'inhibition

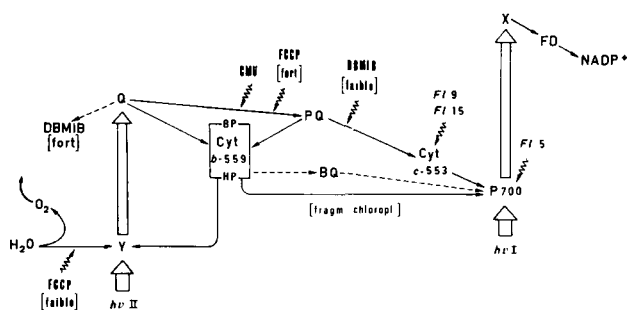


Fig. 8. Schéma résumant les diverses voies possibles pour la photooxydation du cytochrome *b*-559. Les flèches blanches symbolisent les deux réactions photochimiques. Les flèches noires en traits pleins indiquent les transferts d'électrons possibles en l'absence de transporteurs exogènes, celles en traits discontinus les transferts probables en présence de transporteurs exogènes. Les flèches ondulés signalent les sites d'action des différents inhibiteurs ou les déficiences des mutants. Ce schéma simplifié de la photosynthèse tient compte des différences de potentiels d'oxydoréduction probables entre les divers transporteurs. Y, Q, donneur et accepteur primaires de la Photoréaction II; X, accepteur primaire de la Photoréaction I; Cyt, cytochrome; HP, haut potentiel (réductible par l'hydroquinone); BP, bas potentiel (réductible par l'ascorbate); PQ, plastoquinone; BQ, *p*-benzoquinone; FD, ferrédoxine; fragm. chloropl., fragments de chloroplastes.

de la CMU, du côté réducteur du Système II. Selon Homann [31], l'inhibition par la FCCP serait plus faible que celle due à la CMU.

D'après de Kouchkovsky [29], le site d'action de la DBMIB en forte concentration se placerait très près de Q, l'accepteur primaire du Photosystème II. En effectuant des mesures cinétiques du jet d'O<sub>2</sub>, cet auteur a constaté que la DBMIB inhibe la réduction du pool de la plastoquinone, en prenant à son compte les électrons venant de Q réduit.

L'examen des cinétiques des variations d'absorbance à 559 nm en présence de FCCP, que nous avons mesurées, ne montre pas de différence significative entre les divers lots pour ce qui concerne les vitesses d'oxydation du cytochrome *b*-559 à l'illumination. Par contre, les vitesses de réduction après l'extinction de la lumière ne sont pas les mêmes pour tous les lots: cette réduction à l'obscurité est relativement rapide en présence de FCCP seule; elle est nettement plus lente en présence de DBMIB et en présence de DBMIB et de CMU (Figs 2a et 2b). On peut donc penser que la photooxydation du cytochrome *b*-559 se réalise suivant un transfert cyclique d'électrons autour du Photosystème II, faisant intervenir Q, le premier accepteur, et la plastoquinone dont la DBMIB est un analogue. Le transfert d'électrons de H<sub>2</sub>O vers Q étant plus ou moins inhibé par la FCCP, le cytochrome *b*-559 donnerait des électrons à Q dans une photoréaction faisant intervenir Y, le premier donneur d'électrons du Photosystème II. Dans ces conditions, le cytochrome *b*-559 recevrait ensuite des électrons de la plastoquinone qui jouerait le rôle de pool réducteur, la réaction étant relativement rapide à l'obscurité. La CMU, bloquant la réoxydation de Q réduit par la plastoquinone, ne permettrait plus qu'une oxydation partielle du cytochrome *b*-559, limitée à un seul turn-over de Y. Et si, comme cela a été observé pour des chloroplastes de plantes supérieures [16, 17], une faible réduction de cytochrome *b*-559 peut cependant se produire en présence de FCCP et de CMU, il y aurait alors réduction progressive et annulation du signal correspondant à la forme

oxydée du cytochrome *b*-559. Mais, en se substituant à la plastoquinone comme accepteur des électrons de Q réduit, la DBMIB (à forte concentration) déplacerait de nouveau l'équilibre dans le sens de l'oxydation du cytochrome *b*-559, d'où restauration des variations d'absorbance photoinduites. La DBMIB pourrait aussi, éventuellement, oxyder directement le cytochrome *b*-559 mais cette oxydation ne concernerait que la forme à bas potentiel de ce cytochrome. En effet, la DBMIB, qui est réductible par l'ascorbate et oxydable par le DCIP [33], a vraisemblablement un potentiel d'oxydo-réduction voisin de 100 mV. De plus, en piégeant les électrons de Q réduit, la DBMIB empêche la formation d'un pool de plastoquinone réduite, d'où le ralentissement de la réduction du cytochrome *b*-559 à l'obscurité en présence de DBMIB, avec ou sans CMU, qui a été constaté. Un tel mécanisme permet d'expliquer les phénomènes observés avec les cellules entières et avec les fragments de chloroplastes. Chez ceux-ci, cependant, le cytochrome *b*-559 apparaît plus facilement autooxydable, probablement à cause de la fragmentation des membranes chloroplastiques qui faciliterait l'accès de l'oxygène aux divers sites. Il en résulte: d'une part, l'observation d'une photoréduction du cytochrome *b*-559 dans les fragments de chloroplastes non traités, photoréduction qui disparaît sous l'action de la CMU, et, d'autre part, la nécessité d'ajouter un réducteur (hydroquinone ou ascorbate) aux préparations, pour pouvoir observer une photooxydation en présence de FCCP (Fig. 6).

Enfin, dans les fragments de chloroplastes des souches *Fl* 9, *Fl* 15 et sauvage, traitées par la FCCP et la CMU, il persiste une photooxydation du cytochrome *b*-559, inexistante chez le mutant *Fl* 5 et attribuable au Photosystème I. De plus cette photooxydation, qui est très ample chez *Fl* 9 et *Fl* 15, ne paraît pas faire intervenir le cytochrome *c*-553. Une telle photooxydation par le Système I, indépendante du cytochrome *c*-553, n'apparaît pas avec des cellules placées en présence de FCCP et de CMU seulement; par contre, elle se manifeste nettement si l'on ajoute un transporteur d'électrons exogène comme la *p*-benzoquinone (sauf dans le cas du mutant *Fl* 5 dépourvu de P 700). Des voies supplémentaires ont donc été ajoutées dans le schéma (Fig. 8), pour tenir compte de ces réactions dépendantes du Système I. La *p*-benzoquinone (dont le potentiel est proche de celui du cytochrome *b*-559 à haut potentiel) serait nécessaire pour permettre un transfert d'électrons efficace entre le cytochrome *b*-559 et le Système I. Un tel pont de transporteur exogène ne serait pas indispensable avec les fragments de chloroplastes, chez lesquels l'accessibilité des centres Système I aux électrons provenant du cytochrome *b*-559 pourrait être accrue du fait de la fragmentation des thylakoïdes. Mais lorsque le morcelage de ces derniers est trop poussé, entraînant vraisemblablement de trop grandes désorganisations ou pertes de transporteurs, tout transfert vers le Système I deviendrait impossible; ce qui est très probablement le cas avec les préparations obtenues par traitement des cellules aux ultrasons.

Les différents résultats obtenus avec les cellules et avec les fragments de chloroplastes ne donnent pas une idée très précise du potentiel du cytochrome *b*-559 qui est photooxydé en présence de FCCP. Dans tous les cas, avec les fragments de chloroplastes, du cytochrome à haut potentiel réductible par l'hydroquinone intervient. Mais très souvent l'amplitude des photooxydations est plus importante avec l'ascorbate qu'avec l'hydroquinone, sans d'ailleurs que cette augmentation, observée aussi avec le mutant *Fl* 5, soit forcément liée à une intervention du Photosystème I.

Compte tenu de ces incertitudes, la possibilité demeure donc qu'une partie du cytochrome *b*-559 photooxydé par le Système I corresponde à des molécules de cytochrome étroitement associées au centres Système I et n'appartienne pas au même pool que le cytochrome *b*-559 photooxydé par le Système II. Différents auteurs [20, 34, 35], en effet, ont constaté la présence de cytochrome *b*-559 à bas potentiel dans diverses préparations de particules subchloroplastiques de type Système I. Si ce travail a permis de préciser quelques points relatifs aux conditions de photooxydation du cytochrome *b*-559, ainsi que certains effets des inhibiteurs FCCP et DBMIB, de nombreuses questions restent encore à résoudre, notamment en ce qui concerne les réactions et les rôles du cytochrome *b*-559.

## RÉSUMÉ

La photooxydation du cytochrome *b*-559, induite par la FCCP dans des cellules et des fragments de chloroplastes de trois mutants non photosynthétiques de *C. reinhardtii*, sans et avec addition de CMU, DBMIB et *p*-benzoquinone, est étudiée spectroscopiquement. L'un des mutants, *Fl* 5, ne possède pas de P 700; les deux autres, *Fl* 9 et *Fl* 15, sont déficitaires en cytochrome *c*-553 lié et en cytochrome *b*-563.

Dans les cellules comme dans les fragments de chloroplastes des quatre souches traitées par la FCCP il se produit une photooxydation du cytochrome *b*-559, inhibée par la CMU, dépendante du Photosystème II. En présence de FCCP, de CMU et de DBMIB, cette photooxydation est restaurée. Dans les fragments de chloroplastes, la photooxydation du cytochrome *b*-559 peut également être inhibée par un excès de FCCP; dans ce cas aussi, l'addition de DBMIB rétablit la photooxydation. Les variations d'absorption maximum, mesurées dans les cellules, correspondent à 1  $\mu$ mol de cytochrome *b*-559 oxydé par mmole de chlorophylles *a*+*b*, soit approximativement un septième (souche sauvage, *Fl* 5) ou un cinquième (*Fl* 9, *Fl* 15) du contenu global en ce cytochrome.

Un autre type de photooxydation du cytochrome *b*-559, attribuable au Photosystème I, est observé avec des fragments de chloroplastes des souches *Fl* 9, *Fl* 15 et sauvage placés en présence de FCCP et de CMU, ainsi qu'avec des cellules des mêmes souches placées en présence de FCCP, de CMU et de *p*-benzoquinone. Ces réactions apparaissent indépendantes du cytochrome *c*-553. Elles n'ont pas lieu chez le mutant *Fl* 5.

Les deux types de photooxydations concernent un cytochrome *b*-559 à haut potentiel, réductible par l'hydroquinone. De plus, une forme à potentiel plus bas, réductible par l'ascorbate seulement, semble pouvoir participer aussi à ces réactions.

Un essai d'interprétation de ces résultats, tenant compte des effets de la FCCP et de la DBMIB sur les transferts photosynthétiques d'électrons, effets variables selon les concentrations, est proposé.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient sincèrement Madame T. Bennardo pour l'excellente aide technique qu'elle leur a apportée au cours de ce travail. Ils remercient également Monsieur Y. de Kouchkovsky pour ses conseils judicieux.



## RÉFÉRENCES

- 1 Bendall, D. S., (1968) *Biochem. J.* 109, 46p-47p
- 2 Ikegami, I., Katoh, S. et Takamiya, A. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 162, 604-606
- 3 Knaff, D. B. et Arnon, D. I. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 226, 400-408
- 4 Boardman, N. K., Anderson, J. M. et Hiller, R. G. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 234, 126-136
- 5 Erixon, K., Lozier, R. et Butler, W. L. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 267, 375-382
- 6 Wada, K. et Arnon, D. I. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 68, 3064-3068
- 7 Fan, H. N. et Cramer, W. A. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 216, 200-207
- 8 Hind, G. et Nakatani, H. Y. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 216, 223-225
- 9 Cramer, W. A., Fan, H. N. et Böhme, H. (1971) *Bioenergetics*, 2, 289-303
- 10 Epel, B. L. et Butler, W. L. (1972) *Biophys. J.* 12, 922-929
- 11 Cramer, W. A. et Butler, W. L. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 143, 332-339
- 12 Hind, G. (1968) *Photochem. Photobiol.* 7, 369-375
- 13 Böhme, H. et Cramer, W. A. (1971) *FEBS Lett.* 15, 349-351
- 14 Hiller, R. G., Anderson, J. M. et Boardman, N. K. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 245, 439-452
- 15 Anderson, J. M., Than-Nyunt, et Boardman, N. K. (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* 155, 436-444
- 16 Ben-Hayyim, G. (1972) *FEBS Lett.* 28, 145-148
- 17 Ben-Hayyim, G. (1974) *Eur. J. Biochem.* 41, 191-196
- 18 Garnier, J. et Maroc, J. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 205, 205-219
- 19 Garnier, J. et Maroc, J. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 283, 100-114
- 20 Maroc, J. et Garnier, J. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 292, 477-490
- 21 Gorman, D. S. et Levine, R. P. (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 54, 1665-1669
- 22 Shneyour, A. et Avron, M. (1970) *FEBS Lett.* 8, 164-166
- 23 MacKinney, G. (1941) *J. Biol. Chem.* 140, 315-322
- 24 Arnon, D. I. (1949) *Plant Physiol.* 24, 1-15
- 25 Lundegårdth, H. (1962) *Physiol. Plan.* 15, 390-398
- 26 Böhme, H., Reimer, S. et Trebst, A. (1971) *Z. Naturforsch.* 26b, 341-352
- 27 Gould, J. M. et Izawa, S. (1973) *Eur. J. Biochem.* 37, 185-192
- 28 Lozier, R. H. et Butler, W. L. (1972) *FEBS Lett.* 26, 161-164
- 29 de Kouchkovsky, Y. et de Kouchkovsky, F. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 368, 113-124
- 30 Garnier, J., de Kouchkovsky, Y. et Lavorel, J. (1968) *Séanc. Soc. Biol. Fr.* 162, 365-368
- 31 Homann, P. H. (1973) *Eur. J. Biochem.* 33, 247-252
- 32 de Kiewiet, D. Y., Hall, D. O. et Jenner, E. L. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 109, 284-292
- 33 de Kouchkovsky, Y. (1974) *C. R. Acad. Sci.* 278D, 667-670
- 34 Anderson, J. M. et Boardman, N. K. (1973) *FEBS Lett.* 32, 157-160
- 35 Knaff, D. B. et Malkin, R. (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* 159, 555-562