

INDÉPENDANCE DES FORMES SPECTRALES DE CHLOROPHYLLE *a* ET DES HOLOCHROMES CHLOROPHYLLIENS

S. ACKER et J. DURANTON

Département de Biologie, Commissariat à l'Energie Atomique, BP no. 2 Gif-sur-Yvette 91 190 (France)

(Received October 21st, 1974)

SUMMARY

*Independence of special forms of chlorophyll *a* and chlorophyll holochromes*

Zea mays L. seedlings were cultivated for 10 days with submission to 4 s illumination periods interspersed with dark periods varying in length from 30 min to 6 h depending on the lot analyzed. The results show that, for the case in which the dark periods were shorter than 1 h, the relative proportions of different spectroscopic chlorophyll forms (maxima at 662, 670, 677.5, and 684 nm) were constant. For longer durations of darkness between illuminations, the relative proportion of the form Ca_{670} increases, while that of Ca_{684} diminishes with the length of darkness; to a lesser extent, the relative proportion of Ca_{662} increases and a form Ca_{692} disappears. A scheme is proposed to explain the evolution of the relative proportions of the different spectral forms.

The different chlorophyll holochromes present in the chloroplasts were also analysed. If the dark period was longer than 1 h, chlorophyll was associated with peptide chains of molecular weights 21 000 and 29 000. If the dark period was shorter than 1 h chlorophyll was associated with four peptide chains of molecular weights 21 000, 25 000, 29 000 and 70 000.

The results taken together demonstrate that a given spectral chlorophyll *a* form cannot be associated with a definite chlorophyll holochrome.

INTRODUCTION

En décomposant la bande rouge du spectre d'absorption de chloroplastes ou de fragments de chloroplastes, French et col. [1] déterminent quatre "formes" principales de chlorophylle *a*, dont la position des sommets est à 661.6, 670, 677, 683.7 nm et qui se retrouvent chez les différentes plantes ou algues étudiées. Ces mêmes bandes, aux mêmes longueurs d'onde, ont été observées par d'autres méthodes: par l'étude des dérivées premières [2], des dérivées secondes [3], des dérivées quatrièmes [4]. Si l'existence de ces quatre formes spectrales semble bien établie, on ne

Abréviations: [3H]ALA, acide [3H] δ aminolevulique; Ca_{xxx} , forme spectroscopique de chlorophylle *a* dont le maximum se situe à xxx nm; F^n , plantules ayant reçu des éclairs de 4 s espacés de n h d'obscurité; V , échantillon cultivé dans des conditions normales d'éclairage.

sait pas encore à quoi elles correspondent du point de vue biologique. Certains auteurs pensent qu'elles sont liées à l'état d'aggrégation de la chlorophylle *a* [5, 6], d'autres qu'il s'agit dans chaque cas d'environnements lipoprotéiques différents [7, 8].

Il est intéressant par ailleurs de constater que la chlorophylle *a* est associée à quatre chaînes peptidiques différentes de masses moléculaires 21 000, 29 000, 25 000 et 70 000 [9]. Ce rapprochement pour la chlorophylle entre nombre de formes spectroscopiques et nombre de chaînes peptidiques associées est également possible pour la protochlorophylle qui présente deux formes dont les bandes sont à 636 et 650 nm [8], et deux chaînes peptidiques de masses moléculaires 21 000 et 29 000 auxquelles le pigment est associé [9].

Nous avons voulu savoir si cette situation était fortuite ou bien si à une forme spectroscopique donnée correspondait une chaîne peptidique particulière associée à la chlorophylle dans le chloroplaste. Nous basant sur les résultats de Guignery et col. [9] montrant l'existence de deux voies régulant la biosynthèse des holochromes chlorophylliens, nous avons essayé de faire synthétiser la chlorophylle uniquement sur les chaînes peptidiques de masses moléculaires 21 000 et 29 000 afin de voir si la bande rouge du spectre d'absorption ne serait plus alors composée que de deux des formes définies par French et col. [1]. Pour cela nous avons fait pousser des plantules de maïs sous éclairage intermittent: des éclairs séparés de périodes obscures de durée déterminée sont donnés afin de transformer toute la protochlorophylle présente en chlorophylle, sans que la voie de synthèse par laquelle la chlorophylle est associée aux chaînes peptidiques 25 000 et 70 000 soit mise en place; les temps d'obscurité entre les éclairs sont choisis suffisamment longs pour que la synthèse de nouvelle protochlorophylle soit maximale. Au cours de ces expériences nous avons suivi d'une part la formation des holochromes chlorophylliens et d'autre part l'évolution des formes spectroscopiques de la chlorophylle.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le matériel utilisé est le *Zea mays* L. variété INRA 260. Les plantules sont cultivées sur vermiculite à 24 °C en présence d'un éclairage intermittent. Des éclairs de 4 s de lumière blanche (18 000 lux) espacés suivant les expériences par des périodes obscures de 6, 4, 2, 1 h et 30 min, sont fournis pendant toute la durée de croissance et d'expérimentation.

Au bout de dix jours les plantules qui sont au stade de trois feuilles sont séparées des racines au-dessus du coléoptile à l'aide d'une lame de rasoir. La partie excisée est placée dans un tube contenant 20 µl d'une solution d'acide δ-[³H]amino-lévulique, de radioactivité spécifique 33 Ci/mmol, jusqu'à incorporation complète de la solution, ce qui représente une radioactivité de 30 µCi par plantule. Après absorption complète de la radioactivité, les plantules sont placées 15 h sur eau distillée.

Les structures plastidiales sont isolées comme cela a déjà été indiqué [9], en suivant la méthode de Machold [10] légèrement modifiée. Les complexes pigment-lipoprotéiques sont finalement solubilisés totalement par la solution suivante: réactif de Cleland, 77 mg; dodécylsulfate de sodium, 100 mg; Tris, 1 M (pH 6.8) 0.4 ml; glycérol, 0.5 ml; bleu de bromophénol à 0.2 %, 150 µl; eau distillée pour compléter à 5 ml. Une centrifugation à 25 000×*g* pendant 30 min donne un surnageant limpide contenant tous les constituants membranaires. Le culot blanc est exempt de pigments et de substances azotées.

L'électrophorèse des constituants membranaires est faite sur gel de polyacrylamide-dodécylsulfate de sodium selon Laemmli [11] et Blattler et col. [12]. La composition du gel inférieur est de 15 % d'acrylamide, 0.87 % de bisacrylamide, 1.5 M Tris · HCl, pH 8.7; la longueur du gel est de 7 cm, le diamètre de 6 mm. La composition du gel supérieur est de 5 % en acrylamide, 0.26 % en bisacrylamide, 1 M Tris · HCl, pH 6.8. La migration dure 1.5 h avec un courant de 10 mA, puis 2.5 h avec un courant de 15 mA (pour 8 tubes). Les gels sont découpés immédiatement en disques de 1 mm d'épaisseur avec un appareil Joyce and Loebl pour déterminer la radioactivité, ou bien ils sont colorés avec du bleu de Commassie pour localiser les bandes protéiques.

Pour mesurer la distribution de la radioactivité dans les gels d'électrophorèse, les rondelles découpées sont placées dans des fioles de comptage, puis dissoutes une nuit à 40 °C en présence de 0.5 ml d'eau oxygénée à 50 volumes; après addition du liquide scintillant Bray, les comptages sont effectués à l'aide d'un appareil Intertechnique.

La localisation des bandes protéiques sur les gels après coloration au bleu de Coomassie est obtenu par l'emploi d'un spectrophotomètre Vernon.

Les spectres de suspensions plastidiales à basse température (77 °K) sont établis au moyen d'un spectrophotomètre Perkin-Elmer (modèle 356), équipé d'un accumulateur de données Intertechnique 400 canaux. Pour ces expériences les plantules sont broyées au mortier en présence de sable de Fontainebleau et d'une solution tampon phosphate 0.1 M, pH 7.4, contenant $2 \cdot 10^{-3}$ M de MgSO₄ et du saccharose 0.5 M. Le broyat est filtré sur gaze, centrifugé à $250 \times g$ 4 min. Le surnageant obtenu est ensuite centrifugé à $3000 \times g$ pendant 10 min. Le culot recueilli est remis en suspension dans le même tampon auquel on a ajouté 2 volumes de glycérol.

Pour le dosage des chlorophylles, les plantules sont broyées en présence d'acétone à 90 % et du NH₄OH 10 mM. Les spectres sont alors enregistrés par un spectrophotomètre Bausch and Lomb. Les quantités de chlorophylle sont déterminées selon Mackinney [13].

RÉSULTATS

(1) *Etude des spectres à basse température*

Les expériences ont été faites sur différents lots de plantules ayant été soumis à six types d'éclairement: F⁶, F⁴, F², F¹, F[‡], et pour comparaison à des conditions normales d'éclairement: V.

Les quantités de chlorophylle pour chaque échantillon sont données dans le Tableau I. On constate qu'elles sont proportionnelles aux durées d'illumination.

Les spectres d'absorption des chloroplastes ont été effectués à 77 °K. Les spectres obtenus sont représentés Fig. 1. On constate de grandes modifications suivant la durée de la période obscure. Plus celle-ci est grande plus le maximum d'absorption est déplacé vers les petites longueurs d'onde.

Nous avons choisi de décomposer la bande rouge du spectre en gaussiennes pures dont les sommets sont à 662, 670, 677.5 et 684 nm [1]. Une meilleure superposition du spectre expérimental et du spectre calculé est obtenue en faisant intervenir une autre gaussienne dont le sommet se situe à 692 nm [1], ceci pour les échantillons ayant subi les durées d'obscurité les plus courtes.

TABLEAU I

QUANTITÉ DE CHLOROPHYLLE CHEZ LES PLANTULES DE 10 JOURS SUIVANT LES CONDITIONS D'ÉCLAIREMENT

F^n , échantillons soumis à des durées d'éclairage de 4 s séparées par n h d'obscurité. V, conditions normales d'éclairage.

	F^6	F^4	F^2	F^1	$F^{\frac{1}{2}}$	V
$\mu\text{g de chlorophylle}$ g de substance fraîche	15	15	20	70	105	1000

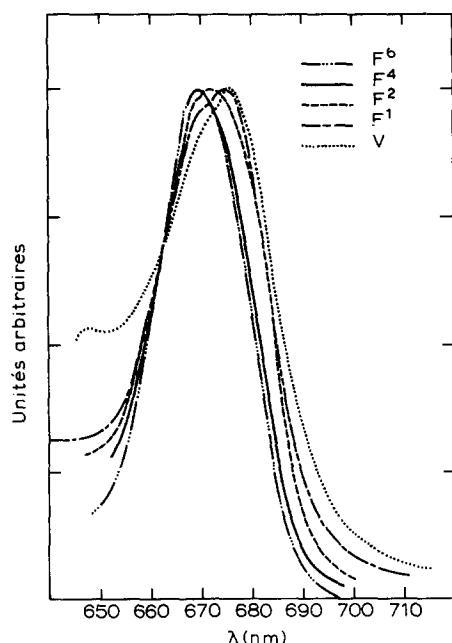


Fig. 1. Spectres d'absorption des chloroplastes suivant les conditions d'éclairage des plantules. Les spectres ont été effectués à 77 °K et normalisés à leur sommet. Pour les conditions expérimentales voir la légende du Tableau I.

Dans la décomposition graphique que nous avons faite, nous avons considéré la position de ces formes comme fixe, ne faisant varier que les largeurs de raies et les intensités. Dans toutes les expériences les largeurs de raie observées sont de 11, 10, 10, 10, et 13 nm respectivement pour les bandes ayant leur sommet à 662, 670, 677.5, 684 et 692 nm.

L'importance relative de chaque bande est exprimée en pourcentage de la surface de la gaussienne considérée par rapport à la somme des surfaces des gaussiennes constitutives du spectre. Les résultats obtenus (Tableau II) sont illustrés par la Fig. 2. Pour des durées d'obscurité entre les éclairs inférieures à 1 h les proportions relatives de chaque forme ne varient plus. Pour des durées d'obscurité variant de 6 h jusqu'à 2 h, on constate par contre que la proportion de la forme Ca_{670} diminue

TABLEAU II

POURCENTAGE DES DIFFÉRENTES FORMES SPECTROSCOPIQUES SUIVANT LES CONDITIONS D'ÉCLAIREMENT

L'importance relative de chaque bande est exprimée en pour cent de la surface de la gaussienne considérée par rapport à la somme des surfaces des gaussiennes constitutives du spectre. Pour les conditions expérimentales voir la légende du Tableau I. L'erreur relative sur chaque pic va de 1% pour les pics les plus importants à 10% pour les plus petits pics.

	662	670	677	684	692
F ⁶	29	37	27	7	—
F ⁴	29	36	26.5	8.4	—
F ²	23.4	32	27.6	15	3
F ¹	23	27	27	17	5
F ^{1/2}	23	27.5	27.5	18	4
V	23.5	25.5	27	17.5	6

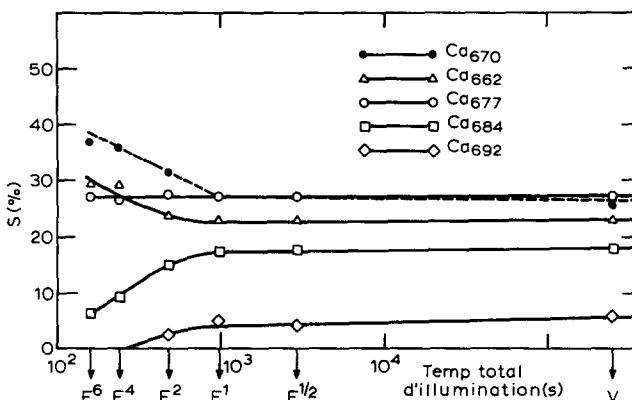
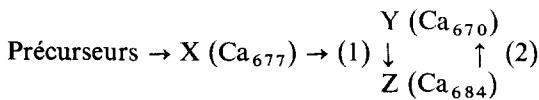


Fig. 2. Evolution des formes spectroscopiques en fonction de la durée d'éclairage. En abscisse le temps est exprimé en seconde (durée totale de l'éclairage à laquelle ont été soumises les plantules). En ordonnée sont portés les pourcentages des formes spectroscopiques. Pour les conditions expérimentales voir la légende du Tableau I.

alors que celle de Ca₆₈₄ augmente. Dans une moindre mesure la proportion de Ca₆₆₂ diminue dans le même temps alors que la forme Ca₆₉₂ apparaît. Dans tous les cas la forme Ca₆₇₇ reste constante. Ces résultats amènent à penser en particulier que les formes Ca₆₇₀ et Ca₆₈₄ sont en équilibre *in vivo*, Ca₆₇₀ $\xrightleftharpoons[(2)]{(1)}$ Ca₆₈₄, cet équilibre étant gouverné par la lumière. En effet lorsque le temps d'obscurité entre les éclairs diminue l'équilibre se déplace en faveur de Ca₆₈₄, ce qui implique que la réaction (1) est favorisée par la lumière et qu'elle est beaucoup plus rapide que la réaction (2) qui se fait à l'obscurité. Une deuxième constatation peut être faite à partir de ces résultats: le pic Ca₆₇₇ a toujours proportionnellement la même valeur, 27 % de la chlorophylle *a* totale. Cette constante tend à faire penser que cette forme est une forme de transition lors du verdissement bien que la valeur 27 % soit une quantité forte pour un état transitoire.

Ces observations sont résumées dans le Schéma I:

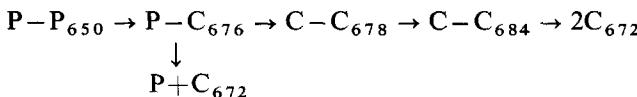
Schéma I



Dans ce schéma X représente l'environnement de la chlorophylle absorbant à 677.5 nm (Ca_{677}), Y celui caractérisé par l'absorption de la chlorophylle à 670 nm (Ca_{670}) et Z celui où l'absorption de la chlorophylle est à 684 nm (Ca_{684}). Sous l'action de la lumière Y se transforme rapidement en Z. Par contre la réaction inverse est lente à l'obscurité. L'état final est un mélange entre les formes Ca_{670} et Ca_{684} dans les proportions définies par l'état d'équilibre atteint suivant l'éclairement de la feuille. Les expériences ne nous donnent aucune précision sur le passage de X vers l'équilibre $\text{Y} \rightleftharpoons \text{Z}$. En particulier on ne sait pas si Y est une forme intermédiaire entre X et Z, si Z est une forme entre X et Y ou bien encore si X peut se transformer indistinctement dans les deux formes.

Le Schéma I amène à faire deux rapprochements avec les différentes descriptions montrant les étapes de la phototransformation de la protochlorophylle en chlorophylle [8, 14-16]. Examinons par exemple le Schéma II qui résulte des travaux de Mathis et Sauer [15], d'autres schémas proposés en différant très peu.

Schéma II



(P et C représentent pour les auteurs la protochlorophylle et la chlorophylle respectivement. Les espèces dimériques sont indiquées par P-P, P-C, C-C et les indices correspondant aux longueurs d'onde des maxima d'absorption).

Les longueurs d'onde des différentes étapes du Schéma II sont très proches de celles observées par la décomposition des spectres analysés dans le présent travail.

Un autre point de rapprochement est le passage dans les Schémas I et II par une absorption intermédiaire à 677 nm. Les travaux quantitatifs de Virgin et French [8] étudiant lui aussi la phototransformation de la protochlorophylle en chlorophylle montrent l'existence d'une forme Ca_{677} intermédiaire qui représente constamment 26 % de la chlorophylle lors du verdissement. Cette valeur est très voisine de celle que nous avons obtenue (27 %). Bien que les études décrites dans cet article et celles ayant trait à la phototransformation de la protochlorophylle en chlorophylle s'intéressent à des phénomènes très différents, les rapprochements effectués plus haut permettent de penser que les environnements de la chlorophylle sont les mêmes pour Ca_{677} et C-C₆₇₈, pour Ca_{670} et C₆₇₂, Ca_{684} et C-C₆₈₄.

(2) *Chaînes peptidiques auxquelles est associée la chlorophylle*

Parallèlement à l'étude des spectres nous avons recherché par électrophorèse sur gel d'acrylamide dodécylsulfate de sodium les bandes auxquelles est associée la chlorophylle synthétisée. Le pigment a été marqué au ³H en faisant métaboliser aux plantules de l'acide δ -[³H]aminolévulique. Pour les expériences F⁶, F⁴, F² la

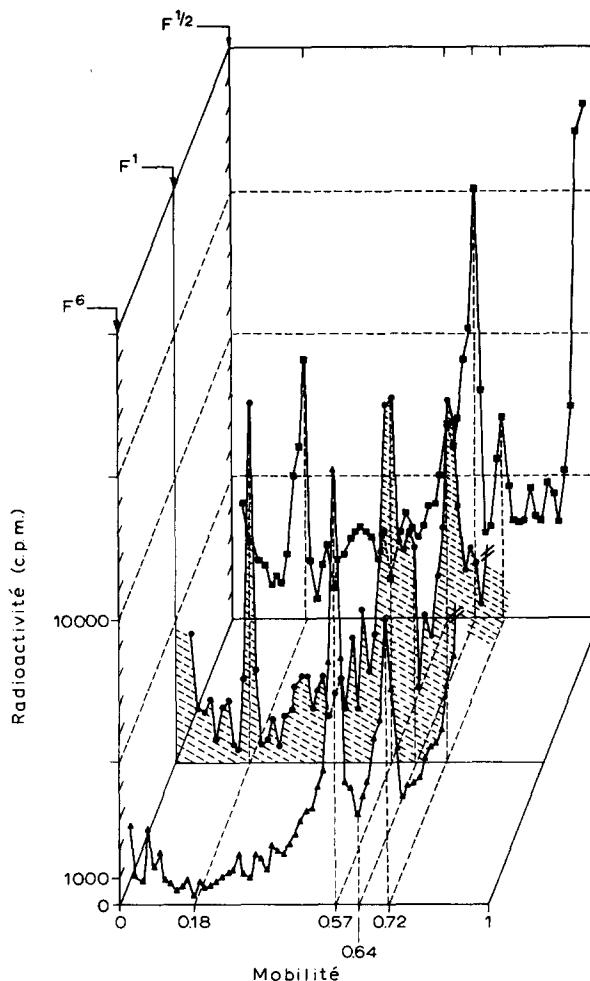


Fig. 3. Mise en évidence des holochromes chlorophylliens par électrophorèse sur gel d'acrylamide dodécylsulfate de sodium et marquage de la chlorophylle par l'acide δ -[3 H]aminolévulique. Pour les conditions expérimentales voir la légende du Tableau I.

Mobilité: 0.18	Masse moléculaire: 70 000
0.57	29 000
0.64	25 000
0.72	21 000

[3 H]chlorophylle est liée aux bandes protéiques de masses moléculaires 21 000 et 29 000 comme le montrent les résultats de la Fig. 3. Seulement deux holochromes chlorophylliens sont décelables bien que la chlorophylle *a* se présente sous quatre formes différentes (Tableau II). Il n'est donc pas possible d'associer à une forme spectrale particulière un holochrome donné. Lorsque la période obscure séparant les éclairs est d'une heure, F^1 , deux pics supplémentaires de radioactivité apparaissent, l'un important au niveau de la bande protéique de masse moléculaire 70 000, l'autre plus faible au niveau de la chaîne peptidique 25 000 (Fig. 3). A ces holochromes

Thornberg et Kung [17] associent respectivement les activités Photosystème I et Photosystème II. Contrairement à ce qui est observé lors du verdissement en lumière continue [9], la chlorophylle est d'abord associée à la chaîne peptidique 70 000 et ensuite sur la chaîne 25 000. Dans les expériences où les éclairs sont séparés seulement par 30 min d'obscurité, la radioactivité due à la [³H]chlorophylle est principalement associée aux chaînes peptidiques 70 000 et 25 000 bien qu'une faible quantité soit décelable sur les chaînes 21 000 et 29 000 (Fig. 3). C'est ce qui est observé chez des plantules ayant poussé dans des conditions normales d'éclairement.

CONCLUSION

De nombreux auteurs invoquent un changement de l'environnement lipoprotéique de la chlorophylle *a* pour expliquer les modifications spectroscopiques. Les résultats que nous avons obtenus montrent que la nature de la chaîne peptidique n'intervient pas directement.

En effet lorsque les plantules ont poussé dans les conditions F⁶, F⁴, F² la chlorophylle *a* est présente sous quatre formes spectroscopiques, alors que ce pigment n'est lié qu'à deux chaînes peptidiques de masses moléculaires 21 000 et 29 000. Une même conclusion peut être tirée des expériences F¹ et F[‡] où le rapport entre les formes est constant alors que les quantités de radioactivité associées aux chaînes peptidiques de masses moléculaires 70 000 et 25 000 sont très différentes. Si à une forme spectroscopique on ne peut donc pas faire correspondre une protéine porteuse de chlorophylle *a*, cela ne veut pas dire cependant que l'environnement lipoprotéique de ce pigment ne joue pas un rôle dans les modifications de spectre, que ce soit par un changement de conformation ou par une modification au niveau lipidique par exemple.

Il est intéressant de remarquer d'autre part la concordance de trois faits: pour des temps d'obscurité inférieurs à 1 h entre les éclairs le réarrangement des formes est stabilisé, la chlorophylle est principalement associée aux chaînes peptidiques 70 000 et 25 000 et le taux de chlorophylle par gramme de substance fraîche augmente. Cela nous amène à penser qu'il existe deux voies de régulation de la synthèse de la chlorophylle: l'une qui se traduit par de la radioactivité associée aux chaînes peptidiques 21 000 et 29 000 et par un faible taux de chlorophylle synthétisée (c'est pendant ce type de régulation que les formes spectroscopiques varient le plus) l'autre voie se traduit par de la radioactivité associée aux chaînes peptidiques 70 000 et 25 000, un plus fort taux de chlorophylle et des spectres ne variant plus.

Une étude est en cours pour déterminer un rapport éventuel entre ces deux voies de régulations et la mise en place d'activités photochimiques de types Photosystème I et Photosystème II.

RÉSUMÉ

Des plantules de *Zea mays* L. ont été cultivées pendant dix jours en les soumettant à des éclairements de 4 s séparés par des périodes obscures variant de 6 h à 30 min suivant les lots analysés. Les résultats montrent que dans ces conditions pour des durées d'obscurité entre les éclairs inférieures à 1 h les proportions relatives des formes spectroscopiques de chlorophylle *a*, dont les maxima d'absorption sont à 662, 670, 677.5 et 684 nm, sont constantes. Pour des durées plus longues d'obscurité

entre les éclairs, la proportion relative de la forme Ca_{670} augmente alors que celle de Ca_{684} diminue avec la fréquence des éclairs; dans une moindre mesure la proportion relative de Ca_{662} augmente et celle d'une forme Ca_{692} disparaît. Un schéma est proposé expliquant à partir de ces données l'évolution des proportions relatives des différentes formes spectroscopiques. Dans le même temps l'analyse des différents holochromes chlorophylliens présents dans les chloroplastes a été effectuée. Pour des durées d'obscurité supérieures à 1 h, la chlorophylle est associée aux chaînes peptidiques de masses moléculaires 21 000 et 29 000. Pour des durées d'obscurité inférieures à 1 h, la chlorophylle est associée à quatre chaînes peptidiques dont les masses moléculaires sont de 21 000, 25 000, 29 000 et 70 000.

L'ensemble de ces résultats permet de montrer qu'à une forme spectroscopique donnée de chlorophylle *a* on ne peut pas associer un holochrome chlorophyllien déterminé.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Dr Y. de Kouchkovsky pour ses observations et les Drs P. Fallot et P. Fromageot pour l'intérêt qu'ils portent à ce travail. Nous remercions également le C.N.R.S. pour le support financier qu'il accorde au laboratoire (RCP 282) et le Phytotron (Gif-sur-Yvette) qui a mis à notre disposition des chambres climatisées.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 French, C. S., Brown, J. S. et Lawrence, M. C. (1972) *Plant Physiol.* 49, 421-429
- 2 Cramer, W. A. et Butler, W. L. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 153, 889-891
- 3 Gulayev, B. A. et Litvin, F. F. (1970) *Biofizika* 15, 4, 670-680
- 4 Butler, W. L. et Hopkins, D. W. (1970) *Photochem. Photobiol.* 12, 439-450
- 5 Krasnovsky, A. A. et Kosobutskaya, L. M. (1952) *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* 85, 117-180
- 6 Butler, W. L. (1966) dans *The Chlorophylls* (Vernon-Seely, ed.), pp. 343-379, Academic Press, New York
- 7 Boardman, N. K. (1966) dans *The Chlorophylls* (Vernon-Seely, ed.), pp. 437-479, Academic Press, New York
- 8 Virgin, H. I. et French, C. S. (1973) *Physiol. Plant.* 28, 350-357
- 9 Guignery, G., Luzzati, A. et Duranton, J. (1974) *Planta* 115, 227-243
- 10 Machold, O. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 238, 324-331
- 11 Laemmli, U. K. (1970) *Nature* 227, 680-685
- 12 Blattler, D. P., Garner, F., Van Shyke, K. et Bradley, A. (1972) *J. Chromatogr.* 64, 147-155
- 13 Mackinney, G. (1941) *J. Biol. Chem.* 140, 315-322
- 14 Litvin, F. F. et Belyaeva, O. B. (1971) *Photosynthetica* 5, 3, 200-209
- 15 Mathis, P. et Sauer, K. (1973) *Plant Physiol.* 51, 115-119
- 16 Thorne, S. W. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 226, 113-127
- 17 Thornber, J. P. et Kung, S. D. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 253, 285-289