

BBA 47409

HETEROGENEITE DES VARIATIONS SPECTRALES PHOTOINDUITES VERS 700 nm OBSERVEES SUR LES MEMBRANES CHLOROPHYLLIENNES ET LES COMPLEXES CHLOROPHYLLE-PROTEINES ISOLEES DE DIVERS ORGANISMES PHOTOSYNTHETIQUES

J. HOARAU, R. REMY et J.-C. LECLERC

Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale dépendant de l'Université de Paris-Sud, associé C.N.R.S.
(LA No. 40), 91405 Orsay Cedex (France)

(Reçu le 4 avril, 1977)

SUMMARY

Heterogeneity of photoinduced spectral changes near 700 nm observed with chlorophyllous membranes and chlorophyll-protein complexes isolated from different photosynthesizing organisms

A heterogeneity of photoinduced spectral variations near 700 nm is observed at -196°C , by comparison of difference spectra obtained from several materials (two blue-green algae, *Spirulina* and *Fremyella*; a red alga *Porphyridium* and a higher plant, *Nicotiana tabacum*). The maximum of complexity is seen with *Spirulina* chlorophyllous membranes where three bands are detected at 718, 705 and 695 nm. These bands are recovered in relatively different amounts in two chlorophyll-protein complexes prepared after sodium dodecyl sulfate electrophoresis of *Spirulina* membranes.

The photoinduced changes near 700 nm with *Spirulina* membranes are reversible and seem to be synchronous and related to the bleaching of three different pigments. This spectral diversity for photosensizable pigments is comparable with the spectral heterogeneity of the major forms of the bulk chlorophyll. It is assumed that these pigments may play the same functional role. This assumption may be related to a possible heterogeneity of Photosystem I centres recently detected by Breton using linear dichroism method (Breton, J. (1977) Biochim. Biophys. Acta 459, 66–70).

INTRODUCTION

Les spectres de différence de l'absorbance obtenus à -196°C , sous l'effet d'agents d'oxydo-réduction ou sous l'effet de la lumière sur des fragments de chloroplastes, montrent, dans la région de la bande rouge de la chlorophylle *a* différents

Abréviations: Asc, acide ascorbique; CP I, complexe chlorophylle-proteine I = "P-700-chlorophyll *a*-protein"; CP II, complexe chlorophylle-proteine II = "Light-harvesting chlorophyll *a/b* protein"; FeCy, ferricyanure de potassium; RPE, résonance paramagnétique électronique; SDS, dodécyle sulfate de sodium.

signaux. Leur interprétation, en termes de changements d'état redox de centres photochimiques, est rendue difficile par la présence de deux types d'artefacts.

(1) Des variations de rendement de fluorescence de la chlorophylle *a*, sous l'effet des traitements précédents, se manifestent nettement à -196°C et gênent les mesures de l'absorbance au voisinage du maximum du spectre d'absorption [1].

(2) Des déplacements de bandes d'absorption peuvent se produire dans la chlorophylle antenne [2] et être dus à un effet électrochromique [3, 4] provoqué par une activité photochimique.

Il existe cependant un fait spectrophotométrique qui semble incontestable, c'est le blanchiment se produisant vers 700 nm sous l'action de la lumière ou celle du ferricyanure. Ce blanchiment est considéré depuis sa mise en évidence et son étude par Kok [5] comme une manifestation de l'oxydation d'un pigment particulier, le *P-700*, centre actif du Photosystème I. Cette opinion devenue classique a été renforcée par les résultats obtenus en RPE où un signal, ayant pour paramètres caractéristiques $g = 2.0023$ et $\Delta H = 7.5$ G, est détecté avec des extraits chloroplastiques d'Epinard. Ce signal a un potentiel redox de demi-variation comparable à celui du blanchiment optique se produisant vers 700 nm [6]. Katz [7] estime que ce signal de résonance attribué au radical $P^{+}-700$ peut provenir d'un complexe chlorophylle- H_2O -chlorophylle qui n'est viable qu'en milieu fortement hydrophobe. Dans cette hypothèse, ce complexe devrait avoir, in vivo, une caractéristique spectrale assez précise, peu dépendante du matériel végétal étudié. Nous avons pensé qu'une étude spectrophotométrique précise à -196°C de la photooxydation du *P-700* était nécessaire pour retenir ou non cette hypothèse. Cette étude a été menée: (1) d'une part sur des membranes chlorophylliennes extraites d'organismes différents: Deux cyanoschizophytes: *Spirulina platensis* (NORDST) Geitler fournie par l'Institut Français du Pétrole et *Fremyella diplosiphon* souche no. 7601 de l'algotherque de l'Institut Pasteur de Paris; une Bangiale: *Porphyridium* sp. Lewin souche No. 637 de l'algotherque de l'Université d'Indiana; une plante supérieure: *Nicotiana tabacum* L. var. Wisconsin. (2) d'autre part, sur des complexes chlorophylle-protéines, isolés de deux de ces organismes: *S. platensis* et *N. tabacum*.

MATERIEL ET METHODES

(A) *Préparation des extraits membranaires et des complexes chlorophylle-protéines.* Les extraits membranaires de *Porphyridium* et de *Fremyella* sont constitués par les surnageants $3000 \times g$ de suspensions de cellules préalablement éclatées par passage à la presse de French (1400 bars). Le milieu est, suivant le cas, un tampon phosphate de sodium 0.25 M (pH 7) ou un tampon Tris 0.1 M (pH 8.2). Les membranes chlorophylliennes de *Spirulina* et de *Nicotiana* sont isolées dans un tampon Tris 0.1 M (pH 8.2). Elles sont purifiées sur un gradient de saccharose en vue de l'isolement des complexes chlorophylle-protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyle sulfate de sodium [8, 9]. Cette technique permet de séparer, dans le cas des plantes supérieures, plusieurs bandes pigmentées dont deux complexes chlorophylle-protéines le CP I et le CP II qui ont respectivement des masses moléculaires de l'ordre de 130 000 et 30 000 [9, 10]. Dans le cas de *Spirulina*, l'électrophorèse sur gel révèle 3 bandes de type CP I désignées A, B et C dans la Fig. 5.

(B) *Mesures spectrophotométriques et irradiation lumineuse.* Les mesures de

l'absorbance à -196°C sont faites à l'aide d'un spectrophotomètre déjà décrit [10]. L'absorbance de l'échantillon est de 0.6 environ, sous 0.6 mm d'épaisseur, au maximum d'absorption. Des contrôles avec une lampe à raies au Neon assurent une reproductibilité de position en longueur d'onde de l'ordre de 0.07 \AA entre deux spectres successifs. Ce point est très important dans le cas de la technique monofaisceau.

L'irradiation des échantillons est réalisée de deux manières: (1) soit à -196°C dans la chambre de mesure spectrophotométrique, sous vide par un tube à décharges dans le Xenon. Par éclair, l'énergie reçue par l'échantillon est égale à 0.42 mJ. La durée d'un éclair est de l'ordre de 10^{-3} s . Dans le cas où la saturation de l'effet spectrophotométrique exige des répétitions d'éclairs, ces derniers sont donnés par séries à l'intérieur desquelles leur nombre augmente suivant une progression géométrique. Les temps, entre chaque série, sont de 8 min et entre deux éclairs à l'intérieur d'une série, de 1 s. (2) soit à l'extérieur de la chambre de mesure, pendant la congélation de l'échantillon en lumière blanche continue et sous atmosphère normale. La lumière provient d'une lampe à arc Philips de type CS I de 450 W, délivrant au niveau de l'échantillon une énergie lumineuse de 20 à 30 mW/cm^2 . La durée de la congélation est de 1 min environ.

Un spectre de différence complet est calculé de 730 nm à 660 nm entre un témoin à l'obscurité et l'échantillon irradié ou traité chimiquement.

(C) *Mesures de RPE*. Elles sont réalisées à 20°C avec un spectrophotomètre Varian. L'irradiation lumineuse de l'échantillon dans la cavité est faite au moyen d'une lampe au Xenon X BO de 150 W. L'énergie reçue au niveau de l'échantillon est de 5 mW/cm^2 environ.

RESULTATS

(A) *Caractérisation du P-700 dans le complexe CP I de Nicotiana par la spectrophotométrie et la RPE*

La présence de P-700, avec un coefficient d'enrichissement de 10 environ par référence aux lamelles intactes, a déjà été signalée dans le CP I de végétaux variés [11]. Une activité photochimique de type Photosystème I y a été aussi mise en évidence [12]. La Fig. 1 courbe A, représente le spectre de différence à -196°C : CP I + Asc 3 mM — CP I. Elle indique que le P-700, dont la bande d'absorption est centrée sur 698 nm, se trouve en partie oxydé dans le CP I. Les spectres de différence CP I + Asc 3 mM — CP I + FeCy 2.5 mM obtenus à 20°C et à -196°C sont qualitativement semblables (Fig. 1 courbes B et C). On doit noter que l'amplitude de la variation à 698 nm due au P-700 est multipliée par 3 à -196°C par rapport à sa valeur à 20°C . Le FeCy 2.5 mM oxyde complètement le P-700 et induit une augmentation relative de l'absorbance vers 687 nm (Fig. 1 courbe D). L'oxydation du P-700 par FeCy est bien réversée par addition d'acide ascorbique.

La mesure RPE à 20°C confirme nettement l'existence d'un P-700 partiellement oxydé dans le CP I à l'obscurité (Fig. 2 courbe A 1). Elle révèle aussi un signal photo-induit, ayant les mêmes caractéristiques spectrales que celui observé à l'obscurité (Fig. 2 courbe A 2). Ce signal réverse lentement à l'obscurité en l'absence de donneurs d'électrons (Fig. 2 courbes B2 L et O). Le FeCy induit à l'obscurité un signal de même amplitude (Fig. 2 courbe A 3) que celui observé sans aucune addition à la lumière

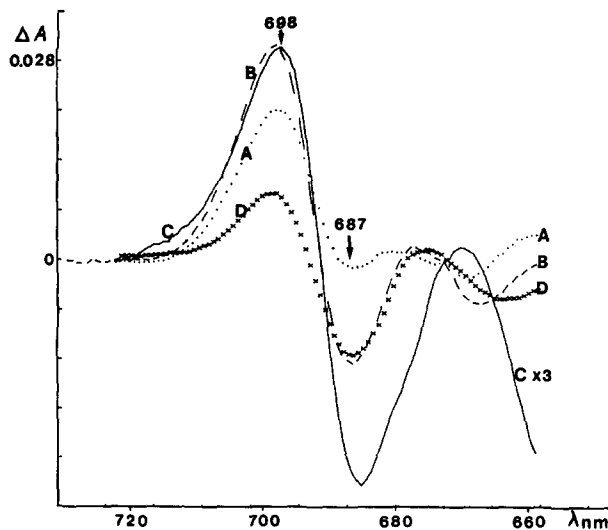


Fig. 1. Spectres de différence optique obtenus avec le CP I de *Nicotiana*. Courbe A: (CP I+Asc 3 mM)–CP I (–196 °C). Courbe B: (CP I+Asc 3 mM)–(CP I+FeCy 2,5 mM) (–196 °C). Courbe C: (CP I+Asc 3 mM)–(CP I+FeCy 2,5 mM) (20 °C). Courbe D: différence entre courbe B et courbe A.

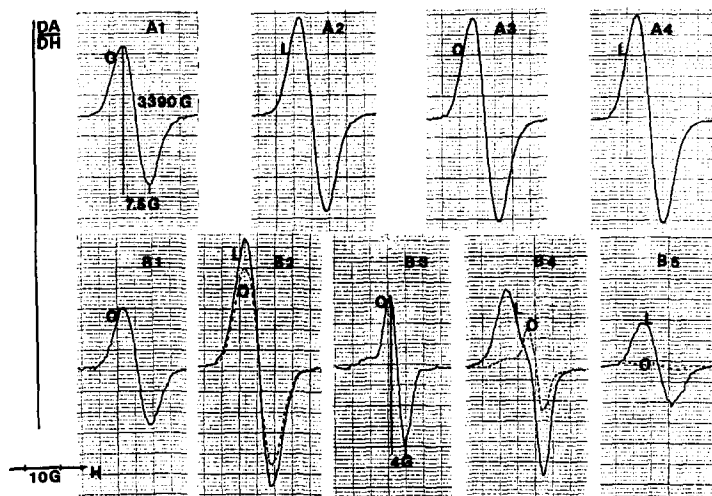


Fig. 2. Spectres RPE obtenus à 20 °C avec le CP I de *Nicotiana*. Les séries A et B représentent deux extraits différents de CP I. Série A, 180 μg chlorophylle/ml. Série B, 220 μg chlorophylle/ml. Courbe A 1: CP I à l'obscurité montrant un signal de largeur 7,5 G dû à la chlorophylle. Courbe A 2: Echantillon précédent illuminé en lumière blanche ($E = 5 \cdot 10^{-3} \text{ W/cm}^2$). Courbe A 3: CP I+FeCy 2,5 mM à l'obscurité (O). Courbe A 4: CP I illuminé en présence de FeCy 2,5 mM (L). Courbe B 1: CP I à l'obscurité. Courbes B 2: CP I à la lumière (L)–CP I à l'obscurité 2 min après la lumière (O). Courbe B 3: CP I+Asc 1 mM à l'obscurité 2 min après la lumière (O) montrant essentiellement un signal étroit 4 G, dû à l'acide ascorbique. Courbes B 4: CP I+Asc à la lumière (L) et remis ensuite à l'obscurité (O). Le signal dû à l'acide ascorbique décroît lentement, témoignant d'une consommation du réducteur dans le milieu. Courbe B 5: l'acide ascorbique est totalement consommé (O). Le signal résiduel photoinduit de largeur 7.5 G est dû à la chlorophylle.

(Fig. 2 courbe A 2). Par ailleurs, le signal observé à l'obscurité en présence de FeCy n'est pas stimulé par la lumière (comparer les courbes A 3 et A 4).

L'addition d'acide ascorbique seul au milieu fait disparaître le signal *P*-700 à l'obscurité (Fig. 2 courbe B 3). Ce dernier réapparaît à la lumière et son amplitude est alors environ 1/3 de celle que l'on obtient en absence de réducteur (Fig. 2 courbe B 5(L) comparée à B 2 (L)).

(B) Etude de la photooxydation par éclairs à -196°C du *P*-700 dans le CP I de *Nicotiana*

La Fig. 3 A montre la série des spectres de différence (obscurité-lumière) obtenus par l'effet cumulatif des éclairs sur un échantillon préalablement réduit par l'acide ascorbique. Un blanchiment progressif se manifeste vers 698 nm et il a un caractère nettement limité indiquant la présence de pigments photoactifs en quantité finie. La bande d'absorption est dissymétrique. Il a été vérifié que l'amplitude des différences d'absorption est stable sur une durée de 2 h au moins. Le *P*-700 photooxydé dans ces conditions correspond à la partie irréversible signalée par d'autres auteurs (voir Ke et al. [13]). La photooxydation du *P*-700 se produit d'une manière similaire, lorsqu'on remplace l'acide ascorbique par l'hydrosulfite ou lorsqu'on rajoute du méthylviologène à la concentration de $5 \cdot 10^{-4}$ M au milieu. On doit noter que l'amplitude de la photooxydation par éclairs est d'environ 1/3 de celle de la chimioxydation en présence de FeCy 2.5 mM. La photooxydation totale n'est obtenue qu'en irradiant fortement l'échantillon, à l'extérieur de la chambre de mesure, en l'absence d'acide ascorbique, pendant la congélation. L'irradiation par éclairs du CP II, sous vide, ne donne naissance à aucune variation de l'absorbance (Fig. 3 courbe B).

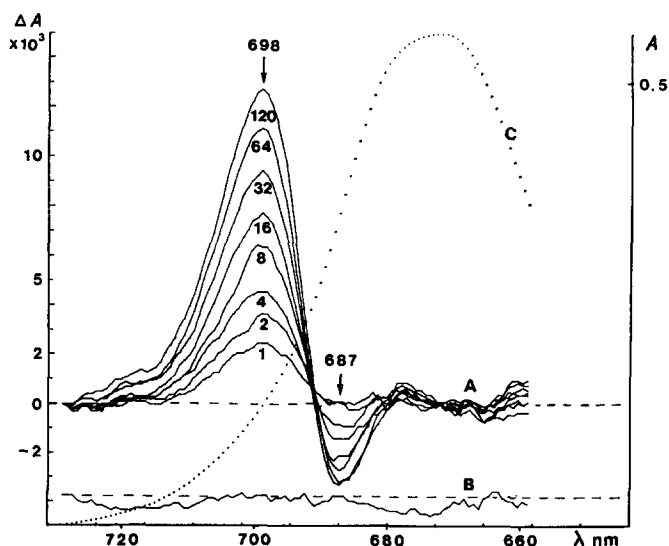


Fig. 3. Courbe A: spectre de différence optique obtenus à -196°C sur le CP I de *Nicotiana*, entre témoin obscurité (Asc 3 mM) et un échantillon semblable irradié par éclairs. Le nombre d'éclairs reçus est indiqué sur chaque courbe. Courbe B: spectre de différence optique obtenu à -196°C sur le CP II de *Nicotiana* entre témoin obscurité (Asc 3 mM) et un échantillon ayant reçu 40 éclairs. Courbe C: spectre d'absorption du CP I à -196°C .

(C) Comparaison des variations à 700 nm photoinduites sur des extraits membranaires de divers organismes chlorophylliens

L'irradiation par éclairs d'extraits chloroplastiques de *Nicotiana* et d'extraits membranaires, d'algue et de cyanoschizophytes montre une très nette hétérogénéité spectrale du blanchiment se produisant aux environs de 700 nm (Fig. 4). Les maximums d'absorption se situent à 703 nm pour *Nicotiana* (courbe D), 705 nm pour *Porphyridium* (courbe C) et *Spirulina* (courbe B), 708 nm pour *Fremyella* (courbe A). Alors qu'une seule bande, d'aspect dissymétrique, est visible nettement sur *Porphyridium* et *Nicotiana*, on en distingue trois avec *Fremyella* et *Spirulina*. Dans le cas de *Spirulina* leurs positions spectrales sont 718, 705 et 695 nm. La comparaison des maximums d'absorption du P-700 du CP I et du P-700 des membranes chloroplastiques de *Nicotiana* indique un écart de 4 à 5 nm (Fig. 3 A, Fig. 4 D).

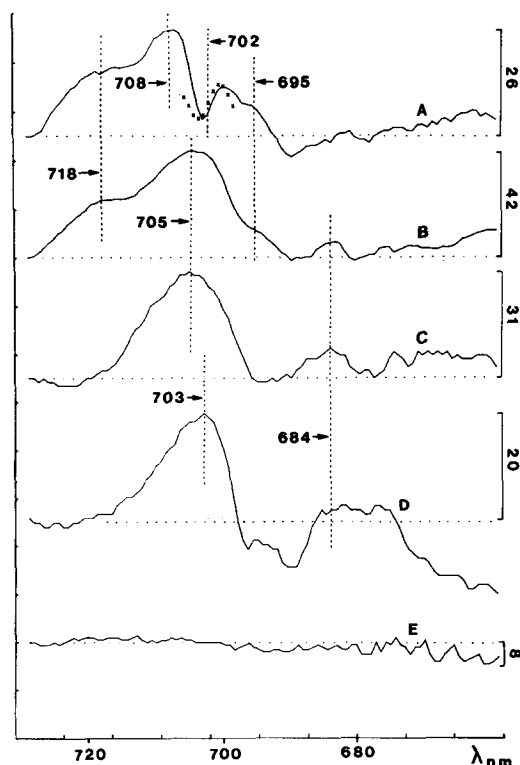


Fig. 4: Spectres de différence optique à -196°C entre témoin obscurité et un échantillon ayant reçu un éclair. Courbe A: membranes chlorophylliennes de *Fremyella* dans un tampon phosphate 0,25 M (pH 7) + Asc 3 mM. La dérivée première du spectre d'absorption, incluant un déplacement de 0,5 Å vers les grandes longueurs d'onde, a été superposée (courbe en croix) au spectre de différence vers 702 nm. Courbe B: membranes de *Spirulina* dans un tampon Tris 0,1 M (pH 8,5) + Asc 3 mM. Courbe C: membranes de *Porphyridium* dans un tampon Tris 0,1 M (pH 8,5) + Asc 3 mM. Courbe D: membranes de *Nicotiana* dans un tampon Tris 0,1 M (pH 8,5) + Asc 3 mM. Courbe E: membranes de *Spirulina* dans un tampon Tris 0,1 M (pH 8,5) + FeCy 2,5 mM. Les valeurs numériques indiquées à droite sont données en 10^{-4} de l'absorbance et représentent l'amplitude maximum des variations.

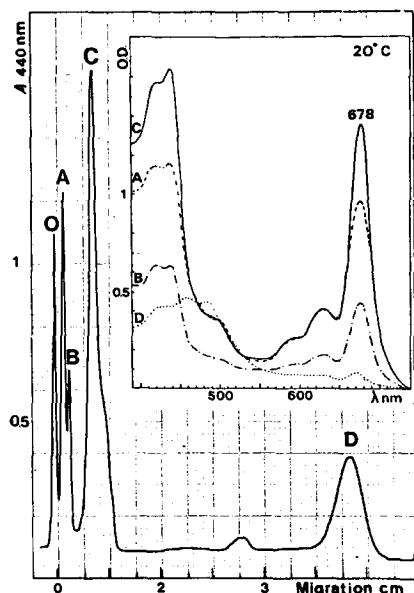


Fig. 5. Profils densitométriques de fractions séparées sur gel de polyacrylamide en présence de SDS et obtenues à partir de lamelles de *S. platensis*. A, B et C sont des complexes chlorophylle-protéines de masse moléculaire $> 100\,000$; D est une bande migrant en front d'électrophorèse très riche en caroténoïdes, ainsi qu'en témoignent les spectres d'absorption à $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ réalisés in situ sur les gels.

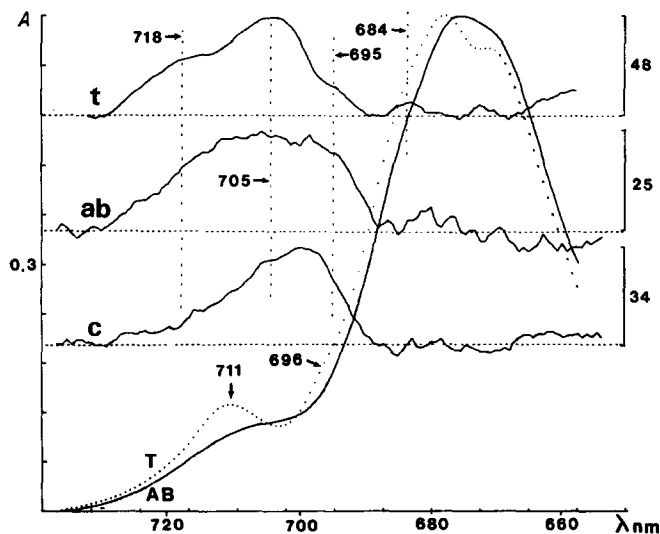


Fig. 6. Comparaison des variations photoinduites à $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ obtenues sur les lamelles de *Spirulina* et les fractions électrophorétiques A, B et C mentionnées dans la Fig. 5. Courbe T: spectre d'absorption à $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ des lamelles. Courbe AB: spectre d'absorption à $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ des fractions A et B réunies. Courbe t: spectre de différence lamelles, Asc 3 mM — lamelles irradiées par 1 éclair. Courbe ab: spectre de différence fraction AB, Asc 3 mM — fraction AB irradiée par 40 éclairs. Courbe c: spectre de différence fraction C, Asc 3 mM — fraction C irradiée par 40 éclairs. Les valeurs numériques indiquées à droite sont données en 10^{-4} de l'absorbance et représentent l'amplitude maximum des variations.

(D) Séparation par électrophorèse de fractions chlorophylle-protéine de *Spirulina*

Modification des proportions relatives des variations de l'absorbance photo-induites à 718, 705 et 695 nm.

Trois bandes A, B et C, représentant des complexes chlorophylle-protéines de masse moléculaire élevée ($\geq 100\,000$) analogues au CP I de plantes supérieures sont séparées sur gel de polyacrylamide, par électrophorèse en présence de SDS (Fig. 5). Les spectres d'absorption réalisés à 20 °C in situ sur le gel montrent que ces trois complexes chlorophylle-protéine ne semblent pas présenter de différences spectrales fondamentales. La bande D, de couleur jaune, migrant en front d'électrophorèse est essentiellement constituée de caroténoïdes avec des traces de chlorophylle. Les deux premières bandes très rapprochées ont été réunies lors de l'élution hors du gel; par contre la bande C a été élue séparément. Les spectres d'absorption à -196 °C, dans le rouge, des fractions éluées A+B d'une part et C d'autre part, sont assez similaires (sur la Fig. 6, seul le spectre de A+B est présenté). De la similitude des spectres on peut déduire une composition voisine en formes majeures de chlorophylle *a* (Fig. 6 courbe A B). En ce qui concerne les variations photoinduites une différence notable entre les deux fractions est observée. La fraction A+B donne un spectre à large bande où les trois composantes spectrales à 718, 705 et 695 nm ont la même importance quantitative (Fig. 6 courbe AB). Pour la fraction C, la composante à 718 nm est pratiquement absente (Fig. 6 courbe C).

DISCUSSION

Efficacité de la lumière lors de la photooxydation du P-700

La détermination des niveaux de saturation lumineuse de la photooxydation du P-700 montre une très nette différence d'efficacité de la lumière à l'égard des membranes chlorophylliennes d'une part et des complexes chlorophylle-protéine préparés par électrophorèse en présence de SDS d'autre part. Dans le cas du CP I de *Nicotiana*, la recherche du modèle mathématique décrivant la réaction de photooxydation a conduit à retenir une hypothèse différente de celle de Satoh et al. [14]. La réaction de photooxydation serait la résultante de plusieurs réactions d'ordre 1.

$$\frac{d(y_1 + y_2 + \dots + y_n)}{dN} = \sum k_1(y_{M1} - y_1), k_2(y_{M2} - y_2) \dots, k_n(y_{Mn} - y_n).$$

Où $y_M = \sum y_{Mn}$ = quantité maximale de P-700; $\sum y_1, y_2 \dots y_n$, quantité de P-700 photooxydé au point *N*; *N*, nombre d'éclairs; $k_1, k_2 \dots k_n$, représentent des constantes distinctes liées chacune au rendement quantique d'une des réactions. Le problème a été traité simplement en supposant que *k*, le coefficient global, varie en fonction inverse de *y*, ce qui implique que les réactions à *k* élevé imposent leur vitesse au début de l'irradiation. On aboutit à l'équation différentielle $dy/dN = k/y (y_M - y)$ qui après intégration donne

$$N = \frac{1}{k} \left(y_M \text{Log} \left(\frac{y_M}{y_M - y} \right) - y \right).$$

Ce modèle (Fig. 7 courbe A) traduit bien la pente pratiquement infinie de la courbe expérimentale au voisinage de 0 et ensuite son aplatissement rapide. Il permet de

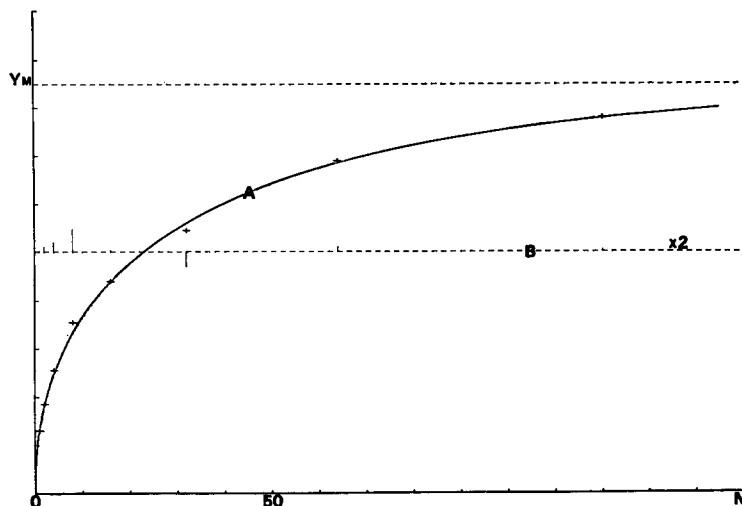


Fig. 7. Courbe A: modèle théorique d'ordre 1 basé sur l'équation

$$N = \frac{1}{k} \left(y_M \operatorname{Log} \left(\frac{y_M}{y_M - y} \right) - y \right)$$

obtenue par intégration de l'équation

$$\frac{dy}{dN} = \frac{k}{y} (y_M - y),$$

appliqué à un échantillon infiniment mince. Les barres verticales de part et d'autre de la ligne pointillée B représentent les écarts absolus entre les points observés et calculés.

calculer avec une précision suffisante y_M et k à partir des points expérimentaux. On peut ainsi déterminer dans différentes conditions d'extraction de pigments, l'efficacité moyenne des éclairs et apprécier ainsi la qualité des transferts d'énergie des complexes collecteurs de photons aux centres photochimiques. La valeur ici déterminée, pour un échantillon de CP I dont l'absorbance de chlorophylle *a* est égale à 0.6 à 680 nm, est de 10 à 15 éclairs de $420 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ pour photooxyder la moitié du *P*-700. Cette valeur correspond à une exigence très forte par rapport aux membranes chlorophylliennes où le niveau apparent de photooxydation du *P*-700 est obtenue avec une quantité de lumière inférieure à cell d'un seul éclair. Ikegami [15] signale aussi une faible efficacité photochimique dans des particules très enrichies en *P*-700 préparées par une autre méthode. Il est important de noter que le modèle retenu implique une variation d'efficacité de la lumière le long de la courbe expérimentale. Cette variation traduit une hétérogénéité de relation dans le couplage énergétique entre pigments collecteurs et pigments actifs. On peut admettre que certains complexes moléculaires *P*-700 sont bien couplés suivant le schéma de Katz [7], à une chaîne de chlorophylle dimère type $(\text{chl}_2)_n$, longue, formant une bonne section de capture de l'énergie. D'autres complexes *P*-700, au contraire, seraient pratiquement isolés; tous les cas intermédiaires représentés par des antennes plus ou moins longues seraient réalisés.

Une autre hypothèse implique une limitation de la photooxydation par la compétition entre la stabilisation des charges et une réaction inverse importante. A -196°C une réaction inverse existe bien dans des lamelles chloroplastiques intactes

[13]. Mais dans notre cas il faudrait de plus supposer que cette réaction inverse subit une réduction progressive de son amplitude, ce qui conduirait à la stabilisation graduelle à l'état oxydé de tout le *P*-700 photooxydable.

On doit par ailleurs souligner que la quantité y_M de *P*-700 photooxydable déterminée par le calcul est notablement inférieure à la valeur maximale obtenue en présence de FeCy ou par irradiation forte pendant la congélation en l'absence de réducteur. L'amplitude du blanchiement optique obtenue dans ces deux dernières conditions expérimentales doit être corrélée aux maximums de variation de signal RPE à 20 °C des Figs. 2 A₂ et 2 A₃. Par contre, l'amplitude du blanchiement optique obtenue par éclairs sous vide, devrait être corrélée au signal RPE à 20 °C obtenu en présence d'acide ascorbique (Figs. 2, B 5L). Selon Evans et al. [16] sur la base de mesures RPE à 18 °K une différence de comportement, du point de vue de la photooxydation, de la chlorophylle antenne, est observée lorsque le potentiel redox du milieu varie de +200 mV à +500 mV. Ces valeurs correspondent à nos conditions expérimentales respectivement en présence d'acide ascorbique et de FeCy. Ces auteurs signalent, en effet, l'apparition pour un potentiel redox élevé du milieu (> 475 mV) d'un très fort signal RPE photoinduit ne provenant pas, selon eux, du *P*-700. Le signal RPE chimioinduit à $E \geq +500$ mV serait 100 fois plus élevé que le signal dû au centre réactionnel *P*-700 dont E_m à pH 8 serait égal à +360 mV. Un artefact de cette importance ne peut être retenu, à propos de nos expériences, car le rapport de la variation maximum de l'absorbance en présence d'acide ascorbique (Fig. 3A) n'est que de 2 à 3. De plus, la variation obtenue en présence de FeCy est parfaitement réversible.

L'hypothèse de Malkin et al. [17] d'une déconnexion de *P*-700 de son accepteur primaire dans le CP I préparé par le SDS explique facilement la faiblesse relative des variations optiques ou paramagnétiques en présence d'acide ascorbique. Il y aurait deux types d'accepteurs, l'un serait l'"iron sulfur protein" [17] l'autre serait l'oxygène susceptible dans nos expériences de réagir avec le *P*-700 en l'absence d'acide ascorbique.

Problème des variations d'absorption synchrones de l'activité du P-700

On observe nettement, avec le CP I de *Nicotiana* une augmentation relative de l'absorbance vers 687 nm (Fig. 3A). Ames et De Grooth [3] signalent, au cours de mesures cinétiques à -40 °C sur des chloroplastes d'Epinard, que les changements d'absorption à 702 nm présentent deux phases: une phase rapide qui se produit dès l'installation de la lumière, correspondant au blanchiement du *P*-700, suivie d'une phase lente de plusieurs secondes correspondant à une augmentation de l'absorbance. La phase lente, serait la conséquence, selon ces auteurs, d'un effet électrochromique se traduisant par un léger déplacement vers les grandes longueurs d'onde du spectre d'absorption. Ce déplacement n'intéresserait sélectivement qu'une ou plusieurs formes de chlorophylle *a* dont les maximums d'absorption se situent au delà de 680 nm. En tenant compte de l'observation d'Ames et De Grooth [3] faite sur des lamelles chloroplastiques intactes d'épinard on peut admettre que, dans le CP I se produisent des effets de champs localisés créés par la séparation de charges P^+-700 A^- . En se basant sur les données de la dérivée première, on peut estimer que la variation à 687 nm correspond à un déplacement du spectre d'absorption de 1 Å vers les grandes longueurs d'onde. Aucune variation d'absorbance n'est décelée, dans les

mêmes conditions expérimentales, avec la fraction chlorophylle-protéine *a/b* CP II [9, 11] (Fig. 3B) où aucune activité photochimique n'a encore été signalée. L'hypothèse du champ local complète celle proposée par Lozier et Butler [1] et reprise par Ke et al. [13] concernant une forme de chlorophylle *a* située à 690 nm, sensible à l'état redox du *P-700*. Elle implique que cette forme de chlorophylle *a* doit être proche des centres *P-700* et posséder une orientation préférentielle dans la structure membranaire [4]. Dans le CP I une telle orientation préférentielle doit aussi exister pour quelques formes de chlorophylle *a* grande longueur d'onde. Avec les fragments membranaires, un déplacement faible du spectre d'absorption au delà de 680 nm a été détecté dans tous les cas d'irradiation à -196°C . Avec *Fremyella* on observe nettement une variation de l'absorbance photoinduite à 702 nm correspondant à un déplacement de 0.5 Å vers les grandes longueurs d'onde de la bande d'absorption d'une chlorophylle non photochimique située à 702 nm (Fig. 4A).

Hétérogénéité des variations photoinduites vers 700 nm

L'hétérogénéité des "variations vers 700 nm" photoinduites pose le problème de la définition exacte du *P-700*. En général les spectres de différence révélant l'existence du *P-700* montrent un certain nombre de variations synchrones qui ont conduit certains auteurs à admettre que l'oxydation du pigment photosensible ne correspond pas à un simple blanchiment à 700 nm comme l'admet Kok [5]. Murata et Takamiya [18] considèrent que le blanchiment à 682 nm observé sur *Anacystis nidulans* à 20°C révèle à cette longueur d'onde une bande satellite du *P-700*. Cette hypothèse est reprise par Van Gorkom et al. [19] qui de plus font intervenir le déplacement spectral d'une bande d'absorption centrée à 690 nm. Ce déplacement est en accord avec l'existence d'une variation positive de l'absorbance décalée vers le bleu par rapport à la variation négative vers 700 nm. Cette interprétation se complique du fait que l'on ne peut faire spectroscopiquement la différence entre le faible déplacement d'une grande bande d'absorption et le fort déplacement d'une petite bande d'absorption. En ce qui nous concerne, nous avons opté pour l'hypothèse simple de Kok [5] en admettant que certaines variations peuvent être une conséquence de l'activité *P-700*. D'après nos résultats, il ressort qu'on ne peut attribuer au *P-700*, une longueur d'onde définie correspondant à une bande spectrale précise. On peut penser que l'écart important de 4 à 5 nm observé entre les membranes chlorophylliennes et le CP I de *Nicotiana* est la conséquence de l'effet combiné du SDS et de l'électrophorèse. Il est maintenant bien établi que les détergents provoquent un décalage vers le bleu du maximum du spectre d'absorption de fragments de chloroplastes [20]. Ce décalage s'explique par une interconversion de formes majeures de chlorophylle *a*. Les formes grandes longueurs d'onde se dégradent au profit des formes courtes longueurs d'onde qui ont une structure probablement moins complexe. Cette explication pourrait être reprise à propos des complexes chlorophylliens photosensibles. En fait la bande d'absorption du *P-700* dans le CP I de *Nicotiana* apparaît dissymétrique (Fig. 3A). Cette dissymétrie signifie probablement que deux formes γ coexistent (*P-705* et *P-695*). L'hypothèse de l'existence de plusieurs complexes chlorophylliens photosensibles est renforcée par la comparaison de membranes chlorophylliennes d'origines différentes (Fig. 4). Dans le cas le plus complexe, représentée par *Spirulina*, trois bandes sont visibles correspondant soit à trois espèces moléculaires différentes, soit à trois environnements différents pour une même espèce chimique du type proposé par Katz. [7] L'individualité des

trois formes pigmentaires apparaît fondée dans la mesure où l'électrophorèse en présence de SDS fait apparaître des complexes protéiques pigmentés possédant des proportions différentes des trois pigments photosensibles (Fig. 6). Il faut signaler que, dans les membranes chlorophylliennes, le photo-blanchiment des trois formes semble synchrone. Le rendement quantique est bon car un seul éclair est largement saturant. Le Ferricyanure supprime totalement toute variation photoinduite (Fig. 4E) et l'acide ascorbique réverse parfaitement son action. Nous pouvons admettre que les trois formes sont photooxydables réversiblement. Une titration redox précise serait nécessaire pour établir si les niveaux redox des trois formes sont identiques. A titre d'hypothèse, on peut donc considérer qu'il s'agit de centres ayant des fonctions voisines mais qui présentent une pluralité spectrale analogue à celle des formes majeures de chlorophylle *a* de l'antenne. Cette hétérogénéité spectrale est, en accord avec l'hypothèse d'une hétérogénéité de populations de centres Photosystème I, émise très récemment par Breton [21] sur la base de mesure de dichroïsme linéaire effectuées entre 730 nm et 700 nm.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Dr. Phung Nhu Hung du même laboratoire et le Dr. Houliers du laboratoire de Physique Cristalline d'Orsay pour leur aide dans les mesures de Résonance Paramagnétique Electronique.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Lozier, H. R. et Butler, W. L. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 333, 465–480
- 2 Ames, J. et Visser, J. W. M. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 234, 62–69
- 3 Ames, J. et De Grooth, B. G. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 440, 301–313
- 4 Reich, R., Scheerer, R., Seewe, K. U. et Witt, H. T. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 449, 285–294
- 5 Kok, B. (1963) in *Proceedings of the Fifth International Congress of Biochemistry*, Moscou, Vol 6, Mechanism of Photosynthesis, pp. 73–81, Pergamon Press and P. W. N. Polish Sci. Publ.
- 6 Kohl, D. H. (1972) in *Biological Applications of Electron Spin Resonance* (Swartz, H. M., Bolton, J. R. and Borg, D. C. eds.), p. 231, Wiley Interscience, New York
- 7 Katz, J. J. (1973) *Naturwissenschaften* 60, 32–39
- 8 Remy, R., Bebee, G. et Moyses, A. (1976) *Phycologia* 15, 321–327
- 9 Remy, R., Hoarau, J. et Leclerc, J. C. (1977) *Photochem. Photobiol.* 26, 151–158
- 10 Leclerc, J. C., Hoarau, J. et Guerin-Dumartrat, E. (1975) *Photochem. Photobiol.* 22, 41–48
- 11 Thornber, J. P. (1975) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 26, 127–158
- 12 Brown, J. S. (1975) *Carnegie Inst. Yearbook* 74, 779–783
- 13 Ke, B., Sugahara, K. et Sahu, S. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 449, 84–94
- 14 Satoh, K., Strasser, R. et Butler, W. L. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 440, 337–345
- 15 Ikegami, I. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 449, 245–258
- 16 Malkin, R., Bearden, A. J., Hunter, F. A., Alberte, R. S. et Thornber, J. P. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 430, 389–394
- 17 Evans, M. C. W., Sihra, C. K. et Slabas, A. R. (1977) *Biochem. J.* 162, 75–85
- 18 Murata, N. et Takamiya, A. (1969) *Plant Cell Physiol.* 10, 193–202
- 19 Van Gorkom, H. J., Tamminga, J. J. et Haveman, J. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 347, 417–438
- 20 French, C. S. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 2893–2897
- 21 Breton, J. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 459, 66–75