

# ETUDE DE LA STRUCTURE DE MEMBRANES CHLOROPLASTIQUES ISOLÉES DE LA SOUCHE SAUVAGE ET D'UN MUTANT SANS ACTIVITÉ DU PHOTOSYSTÈME I DE *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

Alain PICAUD et Suzanne ACKER

*Laboratoire de Photosynthèse du C.N.R.S., 91190 Gif-sur-Yvette et  
Département de Biologie C.E.N. Saclay, B.P. 2, 91190 Gif-sur-Yvette, France*

Received 12 February 1975

## Summary

We studied the chlorophyll *a* forms and the pattern of protein-pigment complexes by electrophoresis from chloroplastic membranes isolated from a mutant strain of *C. reinhardtii* without photosystem I activity.

It is possible, therefore, to correlate the absence of photosystem I activity with the lack of protein-pigment complex I (mol. wt = 70 000) and, also, with the lack of Chl *a*<sub>690</sub> form.

## 1. Introduction

L'emploi de mutants de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* a été largement développé dans divers laboratoires pour étudier la structure et le fonctionnement de l'appareil photosynthétique.

Le mutant *Fl*<sub>5</sub>, qui a été sélectionné pour son haut niveau de fluorescence [1], a été caractérisé comme ne présentant pas d'activité liée au fonctionnement du photosystème I ni de changements d'absorption liés à l'oxydation du P<sub>700</sub>, induits chimiquement ou par illumination; par contre le photosystème II est fonctionnel chez ce mutant [2-4].

Dans cette note, sont présentés les résultats d'une étude spectroscopique *in vivo* des formes chlorophylliennes, ainsi que les résultats de l'analyse, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, des protéines membranaires de ce mutant.

## 2. Matériel et méthodes

Les algues (souche sauvage et mutant non photosynthétique *Fl*<sub>5</sub>) sont cultivées à la lumière dans un milieu contenant de l'acétate selon les conditions précédemment décrites [5].

### 2.1. Préparation des membranes

Les algues sont récoltées par centrifugation, puis mises en suspension (10 ml) dans le milieu tamponné suivant: Sorbitol 0.3 M, KCl 20 mM, NaCl 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, MnCl<sub>2</sub> 1 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7.3. Elles sont ensuite cassées par deux passages successifs dans une presse de French (Yeda press) à la pression de 130-150 kg · cm<sup>-2</sup>. La suspension de débris cellulaires est placée dans un pot de centrifugeuse contenant des couches superposées de solutions de saccharose (1.0 M, 1.5 M, 2.0 M), puis elle est centrifugée à 90 000 g pendant 1 hr. On recueille les membranes chloroplastiques aux interfaces 1.0-1.5 M et 1.5-2.0 M.

### 2.2. Spectroscopie d'absorption et électrophorèse

Les spectres d'absorption, à 77°K, des holochromes chlorophylliens sont effectués selon la technique décrite par Briantais [6]. Les conditions expérimentales pour les électrophorèses en présence de SDS sont celles indiquées par Guignery et al. [7].

## 3. Résultats

Sur la fig. 1, sont portés les résultats de l'étude comparée de l'action du Triton X-100 sur des

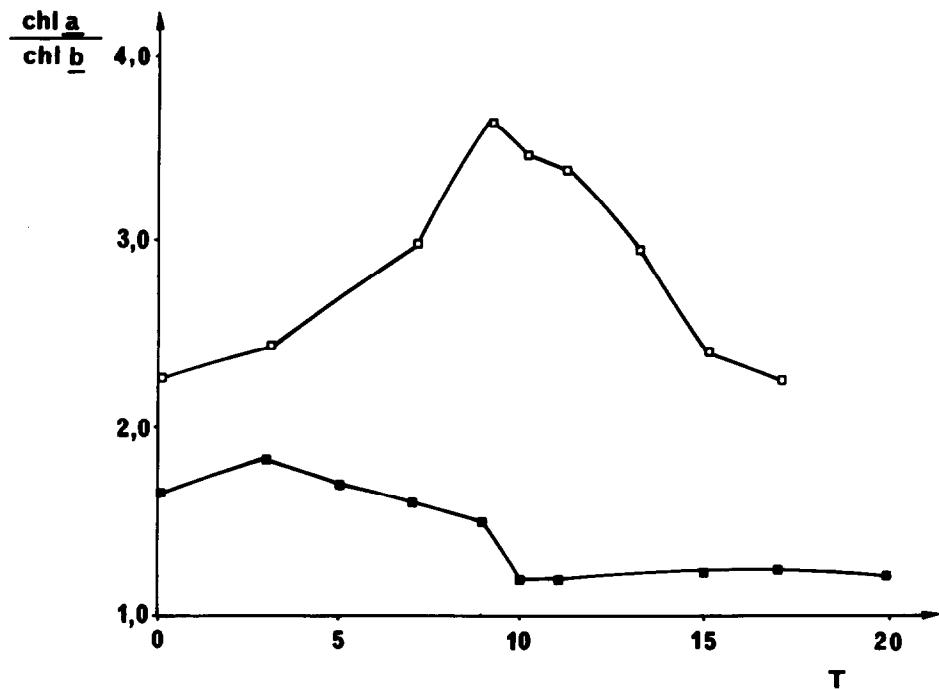


Fig.1. Variation du rapport Chl *a*/Chl *b* dans le surnageant S12 000 g en fonction de la concentration relative en Triton X-100 pour la souche sauvage et le mutant *Fl*<sub>5</sub>. En ordonnée: rapport Chl *a*/Chl *b* dans S12 000 g, (□—□—□) sauvage, (■—■—■) *Fl*<sub>5</sub>. En abscisse: concentration en Triton X-100 (T: mole de Triton X-100 par mole de chlorophylle *a* + *b*). Pour le protocole expérimental, voir le texte.

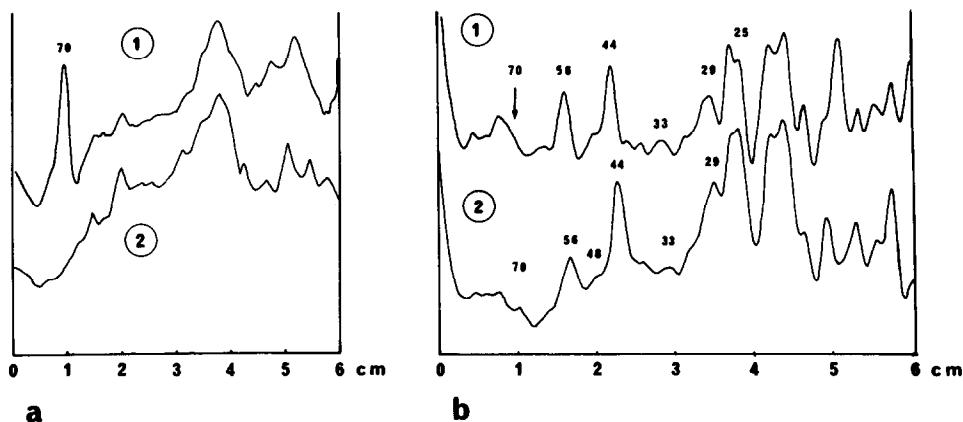


Fig.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide des protéines membranaires. Profil densitométrique des gels à 600 nm après coloration des protéines par le Bleu de Coomassie. a) Des protéines non délipidées, ① souche sauvage, ② mutant *Fl*<sub>5</sub>. b) Des protéines délipidées. Avant incubation par le SDS, les membranes sont délipidées par plusieurs extractions par le mélange acétone-eau 80/20, ensuite par le mélange chloroforme-méthanol (2/1), puis de nouveau par l'acétone à 80%. Souche sauvage ①, mutant *Fl*<sub>5</sub>, ②. Les chiffres indiquent les masses moléculaires ( $\times 10^3$  Dalton) des principales protéines.

fragments chloroplastiques de la souche sauvage et du mutant *Fl*<sub>5</sub>. Cette étude est faite selon le protocole suivant: on fait agir, à 4°C pendant 30 min, le Triton X-100 à des concentrations variables comprises entre 0 et 20 molécules de Triton pour une molécule de chlorophylle. Après incubation, les suspensions membranaires sont centrifugées à 12 000 g pendant 30 min; on suit dans les surnageants la répartition des chlorophylles *a* et *b*. On constate sur cette figure que pour le sauvage, la courbe représentative des variations du rapport chlorophylle *a* / chlorophylle *b* croît jusqu'à un maximum puis décroît; il n'en est pas de même pour le mutant *Fl*<sub>5</sub>. Il a été montré précédemment [5] que l'augmentation du rapport chlorophylle *a* / chlorophylle *b* est dû à un enrichissement des surnageants S<sub>12</sub> 000 g en particules subchloroplastiques riches en chlorophylle *a* et en centres P<sub>700</sub>. Donc, au manque d'activité photosystème I constaté auparavant chez le mutant *Fl*<sub>5</sub>, correspond l'absence d'un ensemble pigmentaire lié au photosystème I.

La séparation des protéines membranaires par électrophorèse sur gel de polyacrylamide met bien en évidence l'absence chez le mutant *Fl*<sub>5</sub> d'un complexe protéine-pigment de masse moléculaire 70 000 (fig.2a). Ce complexe peut être identifié au complexe protéine-pigment de Kung et Thornber [8] qui est attribué au photosystème I. Un pic protéique de masse 70 000 a été aussi observé sur les électrophorégrammes de préparations membranaires de *C. reinhardtii* par Levine et al. [9]. Par contre, sur les échantillons délipidés (fig.2b), on ne constate pas de différence significative, entre le sauvage et le mutant, dans la distribution des protéines membranaires sur les gels d'électrophorèse.

Le spectre de différence d'absorption, à 77°K, entre les membranes du sauvage et de la souche *Fl*<sub>5</sub> (fig.3), montre que les membranes chloroplastiques du *Fl*<sub>5</sub> sont déficientes en une forme chlorophylle absorbant à 690 nm (Chl *a*<sub>690</sub>). Cette forme représente environ 4 à 5% de l'ensemble des holochromes de la chlorophylle *a*, estimation qui est en accord avec les valeurs du même ordre obtenues par French et al. [10]. L'holochrome Chl *a*<sub>690</sub> est bien distinct de la forme Chl *a*<sub>685</sub> dont la présence est mise en évidence, chez le mutant comme chez le sauvage, en utilisant la propriété particulière de l'holochrome Chl *a*<sub>685</sub> qui est d'être transformé par

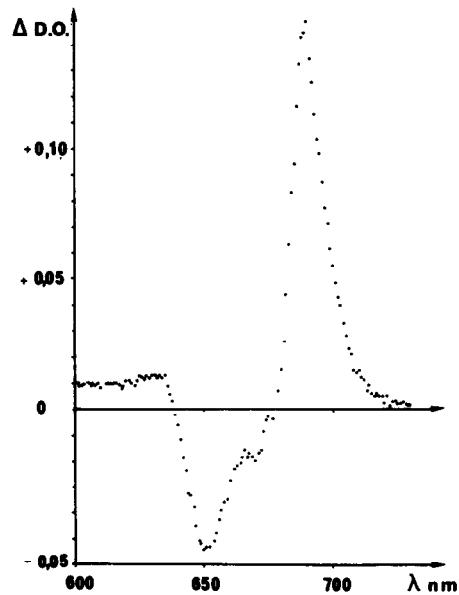


Fig.3. Spectre de différence d'absorption à 77°K: membranes 'sauvage' moins membrane 'Fl<sub>5</sub>'. Les spectres sont normalisés à 677 nm. Les fragments des membranes chloroplastiques sont déposés par filtration sur une membrane Millipore qui sert de support et d'écran diffusant.

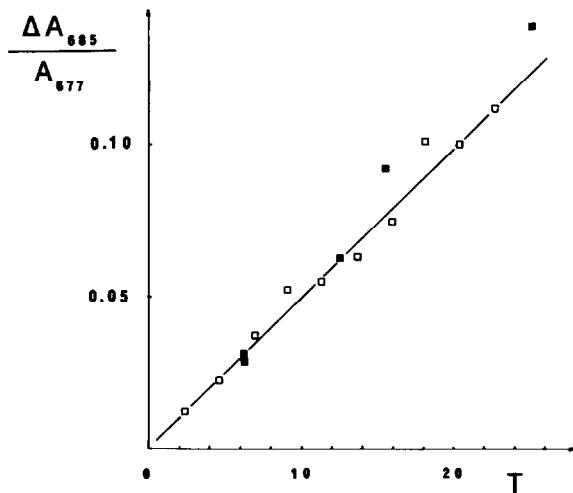


Fig.4. Action du Triton X-100 sur des membranes chloroplastiques provenant de la souche sauvage et du mutant *Fl*<sub>5</sub>. En ordonnée  $\Delta A_{685}/A_{677}$ : variation de densité optique mesurée à 685 nm par spectroscopie de différence 'chloroplastes moins chloroplastes + Triton' et normalisée par rapport à la densité optique à 677 nm qui reste constante quelque soit la concentration en Triton X-100. En abscisse: concentration en Triton X-100 (T: mole de Triton X-100 par mole de chlorophylle *a* + *b*), —□— sauvage; —■— Fl<sub>5</sub>.

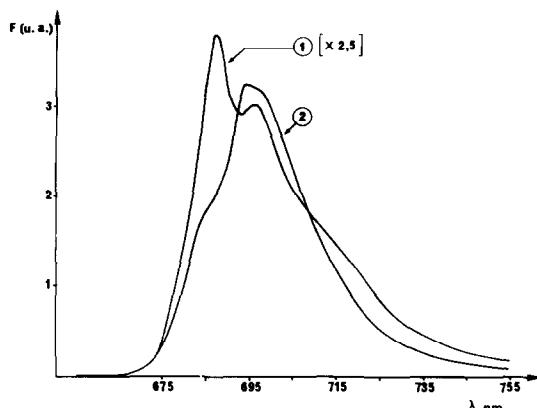


Fig.5. Spectre d'émission de fluorescence à 77°K des membranes chloroplastiques provenant de la souche sauvage et du mutant  $Fl_s$ . Longueur d'onde d'excitation 480 nm. Les intensités de fluorescence F (u.a.) sont exprimées en unités arbitraires. (1) Sauvage (ordonnée  $\times 2,5$ ); (2)  $Fl_s$ .

le Triton X-100 en une forme absorbant à 670 nm (confers fig.4 et réf. [11]). En outre, on observe un peu plus de chlorophylle *b* chez le mutant que chez le sauvage; cette différence s'observe vers 650 nm sur le spectre de la fig.3.

L'émission de fluorescence à 695 nm, à 77°K, est exaltée dans les préparations membranaires du  $Fl_s$  par rapport à celles du sauvage (fig.5). On peut attribuer cette exaltation au fait que les holochromes Chl  $\alpha_{685}$  ne peuvent pas transférer leurs excitons aux formes Chl  $\alpha_{690}$  et au P<sub>700</sub>, puisque le complexe protéine-pigment est absent chez le mutant.

#### 4. Discussion

La comparaison des résultats obtenus avec le mutant  $Fl_s$  et avec le sauvage indique une corrélation entre l'absence d'activité du photosystème I et l'absence du complexe 70 000. Cette corrélation est en faveur de l'appartenance du complexe chromoprotéique de masse 70 000 au photosystème I, appartenance dont divers types de preuves expérimentales ont déjà été apportés: isolement de particules enrichies en photosystème I préparées à partir de végétaux supérieurs [12,13] ou à partir de *C. reinhardtii* [9] et analyse par électrophorèse de ces particules; apparition simultanée d'une activité

photosystème I et du complexe 70 000 au cours du verdissement de plantules de *Canavalia ensiformis* (L) [14]. Enfin citons l'étude du mutant 8 de *Scenedesmus*, qui a permis à Gregory et al. [15], à Raps [16] d'établir une corrélation entre le manque d'activité du photosystème I et l'absence du complexe chromoprotéique de masse 70 000. D'après Raps [16] le signal I de RPE et le complexe protéique manquant apparaissent simultanément lors de la réversion du mutant 8.

Si l'origine photosystème I du complexe 70 000 ne fait guère de doute, son rôle structural et fonctionnel n'est pas complètement établi; il est tentant d'identifier le complexe 70 000 avec le complexe HP<sub>700</sub> du centre réactionnel (Vernon et al. [17]) à cause de l'analogie entre les deux structures (similitudes des masses moléculaires et des compositions en chlorophylle *a*).

On sait qu'il existe *in vivo* plusieurs types d'holochromes chlorophylliens qui traduisent probablement différentes formes d'association de la chlorophylle *a* avec les composants membranaires [10]. Mais il est souvent difficile d'assigner une localisation précise aux holochromes chlorophylliens à cause, notamment, des effets dénaturants des détergents utilisés pour obtenir des préparations subchloroplastiques. Notre étude, grâce à l'utilisation d'un mutant non photosynthétique, décrit un cas favorable où la corrélation entre l'absence de l'holochrome Chl  $\alpha_{690}$  d'une part et l'absence du complexe 70 000 d'autre part, apparaît nettement.

Nos résultats suggèrent donc que la forme Chl  $\alpha_{690}$  qui représente 4 à 5% des holochromes chlorophylliens, soit une vingtaine de molécules de chlorophylle *a* pour un P<sub>700</sub>, est associée *in vivo* au complexe chromoprotéique système I de masse 70 000. Ce complexe réunirait ainsi dans une même structure protéique les chlorophylles Chl  $\alpha_{690}$  sensibilisatrices directes du P<sub>700</sub>.

#### Bibliographie

- [1] Garnier, J., de Kouchkovsky, Y. et Lavorel, J. (1968) C. R. Soc. Biol. 162, 365-368.
- [2] Maroc, J. et Garnier, J. (1973) Biochim. Biophys. Acta 292, 477-490.
- [3] Garnier, J. et Maroc, J. (1972) Biochim. Biophys. Acta 283, 100-114.
- [4] Picaud, A. (1974) C. R. Acad. Sc. Paris 278, 1773-1776.

- [5] Picaud, A. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 275, 414-426.
- [6] Briantais, J. M. (1967) *Photochem. Photobiol.* 6, 155-162.
- [7] Guignery, G., Luzzati, A. et Duranton, J. (1974) *Planta* 115, 227-243.
- [8] Kung, S. D. et Thornber, J. P. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 253, 285-289.
- [9] Levine, R. P., Burton, W. G. et Duram, H. A. (1972) *Nature*, 237, 176-177.
- [10] French, C. S., Brown, J. S. et Lawrence, M. C. (1972) *Plant Physiol.* 49, 421-429.
- [11] Picaud, A. (1972) *Thèse de 3e Cycle*, Université de Paris.
- [12] Rémy, R. (1974) *Thèse de Doctorat*, Université de Paris.
- [13] Shiozawa, J. A., Alberte, R. S. et Thornber, J. P. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* 165, 383-397.
- [14] Alberte, R. S., Thornber, J. P. et Naylor, A. W. (1972) *J. Expr. Bot.* 23, 1060-1069.
- [15] Gregory, R., Raps, S. et Bertsch, W. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 234, 330-334.
- [16] Raps, S. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 305, 384-389.
- [17] Vernon, L. P., Shaw, E. R., Ogawa, T. et Raveed, D. (1971) *Photochem. Photobiol.* 14, 342-357.