

BBA 45921

ETUDE DU ROLE DE LA FERREDOXINE DANS LES TRANSFERTS D'ELECTRONS ET LA PHOTOPHOSPHORYLATION DES CHLOROPLASTES D'EPINARD ET DE FEVE EN AEROBIOSE

Y. MATHIEU, M. MIGINIAC-MASLOW ET R. REMY

Laboratoire de Physiologie Végétale, Associé au C.N.R.S. Faculté des Sciences, 91-Orsay (France)

(Reçu le 20 novembre, 1969)

SUMMARY

Effect of ferredoxin on electron transfer and photophosphorylation of spinach and bean chloroplasts under air

The effect of ferredoxin on the endogenous O_2 absorption or evolution, photophosphorylation and $NADP^+$ reduction of isolated spinach and bean chloroplasts has been studied under air.

In the absence of $NADP^+$, 3-(*p*-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea-sensitive O_2 absorption and photophosphorylation took place. The addition of ferredoxin enhanced both activities in spinach chloroplasts but slightly inhibited them in bean chloroplasts.

In the presence of $NADP^+$, ATP/NADPH ratios were high. The addition of ferredoxin, which stimulates O_2 evolution and $NADP^+$ reduction more than photophosphorylation, decreased them until they became equal to 1.

The slight inhibition of $NADP^+$ reduction under air, as compared with nitrogen, was not relieved by ferredoxin.

The results are discussed with respect to the different O_2 -sensitive sites of isolated chloroplasts.

INTRODUCTION

On sait que la ferrédoxine peut intervenir dans différentes voies photosynthétiques de transfert d'électrons¹, chacune de ces voies pouvant être couplée à une photophosphorylation. En présence de $NADP^+$ en quantité non limitante, c'est un transfert non cyclique qui a lieu, avec formation de NADPH. En absence de $NADP^+$, la ferrédoxine réduite peut être réoxydée de façon cyclique par des constituants de la chaîne de transfert situés en amont d'elle; elle peut également intervenir dans un cas particulier du transfert non cyclique, fonctionnant avec O_2 comme accepteur terminal d'électrons². Ce dernier type de transfert fonctionne également en présence de cofacteurs autoxydables³, ou de façon endogène⁴. L'activité endogène est particulièrement élevée avec des chloroplastes isolés de façon à limiter leurs pertes en enzymes solubles⁵: le passage de l'azote dans l'air s'accompagne

Abréviation: CMU: 3-(*p*-chlorophényl)-1,1-diméthylurée.

d'une augmentation importante de la phosphorylation, même en présence de NADP^+ , dont la réduction est alors diminuée⁶, avec un ralentissement simultané du dégagement apparent d' O_2 ⁷. L'existence même d'une phosphorylation liée à la présence de l' O_2 laisse supposer que ce dernier intervient à proximité du Système I. Deux sites d'action de l' O_2 ont été décrits à ce niveau (voir ref. 7): la ferrédoxine elle-même² et le réducteur primaire produit par le Système I⁸⁻¹⁰.

De nombreux auteurs ont envisagé l'hypothèse d'un rôle régulateur de l' O_2 dans diverses activités photosynthétiques telles que l'émission d' O_2 ¹¹, les transferts d'électrons et la photophosphorylation^{12,13} ou les réactions enzymatiques du cycle de Calvin¹⁴. Il nous a donc paru utile d'étudier les interférences possibles entre la réduction de l'oxygène et celle du NADP^+ et les conséquences qu'elles pourraient avoir sur le rapport ATP/NADPH.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Les plantes employées: épinard (*Spinacia oleracea* L. var. *America*) et fève (*Vicia faba* L. var. *de Séville*, à longue cosse) sont cultivées en aquiculture, sur milieu synthétique¹⁵, dans des conditions d'éclairement assurant une bonne croissance végétative, soit 15000 lux pendant 12 h (température: 23°) en alternance avec 12 h d'obscurité (température: 16°) pour l'épinard et 4000 lux pendant 12 h et 12 h d'obscurité, à 20°, pour la fève. L'humidité relative est de 70 %.

Le choix de ces plantes est dû à la différence de sensibilité de leurs chloroplastes à l' O_2 .

Les chloroplastes d'épinard sont extraits comme décrit précédemment⁷, par une technique dérivée de celle de JENSEN ET BASSHAM¹⁶. Pour les chloroplastes de fève, le broyage au mixeur, ayant un effet découpleur, est remplacé par une dilacération rapide avec des ciseaux dans un tampon *N*-tris-(hydroxyméthyl) méthylglycine 0.05 M, pH 8, saccharose 0.3 M, MgCl_2 0.01 M. Dans tous les cas, le culot de chloroplastes entiers est soumis à un choc osmotique par remise en suspension dans le milieu de broyage dilué au 1:10, pour assurer une bonne pénétration des réactifs. Le dosage de chlorophylle est fait selon ARNON¹⁷.

Le tampon de base du milieu réactionnel est identique au milieu de broyage pour la fève et constitué d'un tampon acide *N*-2-hydroxyéthylpipérazine-*N'*-2-éthanesulfonique 0.05 M, pH 8, sorbitol 0.33 M, MgCl_2 1 mM, MnCl_2 1 mM pour l'épinard. Il contient, en supplément, par ml, 2 μmoles d'ADP et de tampon NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 . Dans les expériences de photophosphorylation, le tampon phosphate contient du ^{32}P . Les autres additions sont, s'il y a lieu, par ml: NADP : 0.5 μmole , ferrédoxine en quantité variable, CMU: 10 μl d'une solution alcoolique (concentration finale: 5 μM), catalase: 0.3 mg, KCN: 1 μmole . Les chloroplastes ajoutés représentent 90-100 μg de chlorophylle par ml de milieu.

La ferrédoxine est isolée à partir de feuilles d'épinard par la méthode de HILL ET BENDALL¹⁸, avec contrôle des étapes de purification par électrophorèse sur gel d'acrylamide selon DAVIS¹⁹. Son activité est de 64 unités San Pietro/mg de protéine.

Le dosage de l'oxygène dissous est fait par une technique ampérométrique décrite précédemment⁷.

Pour la réduction du NADP^+ et la photophosphorylation, l'incubation se fait dans un appareil de Warburg, à 18°, avec un éclaircissement de 65000 lux. Des

prélèvements sont faits au cours du temps à l'aide d'une micro-seringue. Le NADPH est dosé par spectrophotométrie à 340 nm, après élimination des chloroplastes par centrifugation au froid à $10000 \times g$. Pour la phosphorylation, le mélange réactionnel est déprotéinisé par précipitation à l'acide trichloracétique (concentration finale 2 %) et centrifugation. La détermination de l'ATP radioactif formé est faite selon la technique d'AVRON²⁰.

RÉSULTATS

Effet de l'addition de ferrédoxine en absence de $NADP^+$ exogène

En l'absence de $NADP^+$ et de ferrédoxine exogènes, les deux types de chloroplastes absorbent l' O_2 à la lumière (Figs. 1a et 1b), dans une réaction de MEHLER²¹ classique, puisque l'absorption est sensible au 3-(*p*-chlorophényl)-1,1-diméthylurée (CMU), supprimée par addition de catalase chez l'épinard et exaltée par addition de KCN (inhibiteur de la catalase) chez la fève⁶ qui possède une activité catalasique endogène importante. L'addition de ferrédoxine, en quantité déterminée comme

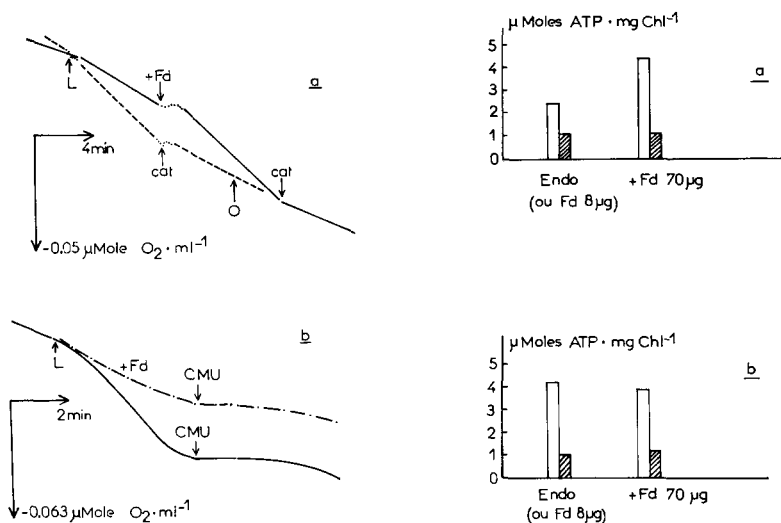


Fig. 1. Effet de la ferrédoxine sur l'absorption d' O_2 en l'absence de $NADP^+$ exogène. Enregistrements polarographiques. a. Chloroplastes d'épinard. b. Chloroplastes de fève. L, lumière; O, obscurité; Cat, catalase; + Fd, ferrédoxine ajoutée: 48 $\mu\text{g/ml}$. —·—, la ferrédoxine est présente dès le début de l'enregistrement.

Fig. 2. Effet de la ferrédoxine (Fd) sur la photophosphorylation endogène. a. Chloroplastes d'épinard. b. Chloroplastes de fève. □, sans CMU; ▨, avec CMU 5 μM . 10 min d'incubation à la lumière. Chl, chlorophylle.

saturante pour la réduction du $NADP^+$, augmente l'absorption d' O_2 des chloroplastes d'épinard (Fig. 1a) mais diminue légèrement celle des chloroplastes de fève (Fig. 1b). Un effet identique est obtenu pour la photophosphorylation concomittante, sensible au CMU (Figs. 2a et 2b), qui n'est stimulée par l'addition de ferrédoxine que dans les chloroplastes d'épinard.

Effet de l'addition de ferrédoxine en présence de NADP^+ exogène

En présence de NADP^+ , l'absorption d'oxygène fait place à un faible dégagement avec les deux types de chloroplastes. Ce dégagement est stimulé par l'addition de ferrédoxine (Fig. 3) qui stimule également la réduction du NADP^+ (Figs. 4 et 5). La phosphorylation est stimulée à un moindre degré que la réduction (Fig. 4). Avec des chloroplastes de fève, elle est même souvent très peu modifiée par l'addition de ferrédoxine (Fig. 5). En conséquence, le rapport ATP/NADPH, nettement supé-

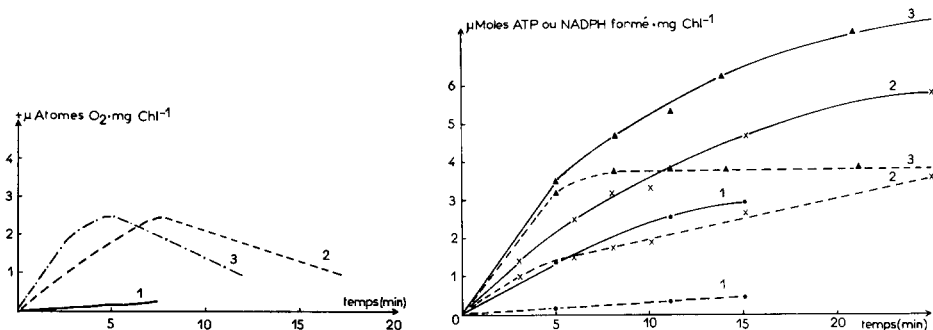


Fig. 3. Effet de la ferrédoxine sur le dégagement d' O_2 des chloroplastes d'épinard à la lumière en présence de NADP^+ . Courbe 1, sans ferrédoxine; 2, ferrédoxine 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 3, ferrédoxine 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$. On obtient le même type de courbes avec des chloroplastes de fève, à condition d'opérer en présence de KCN, car sinon, la réabsorption de l' O_2 est masquée par l'activité catalasique. Chl, chlorophylle.

Fig. 4. Effet de la ferrédoxine sur la photophosphorylation et la réduction du NADP^+ des chloroplastes d'épinard. —, photophosphorylation; — — —, réduction du NADP^+ . 1, sans ferrédoxine; 2, ferrédoxine 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 3, ferrédoxine 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Chl, chlorophylle.

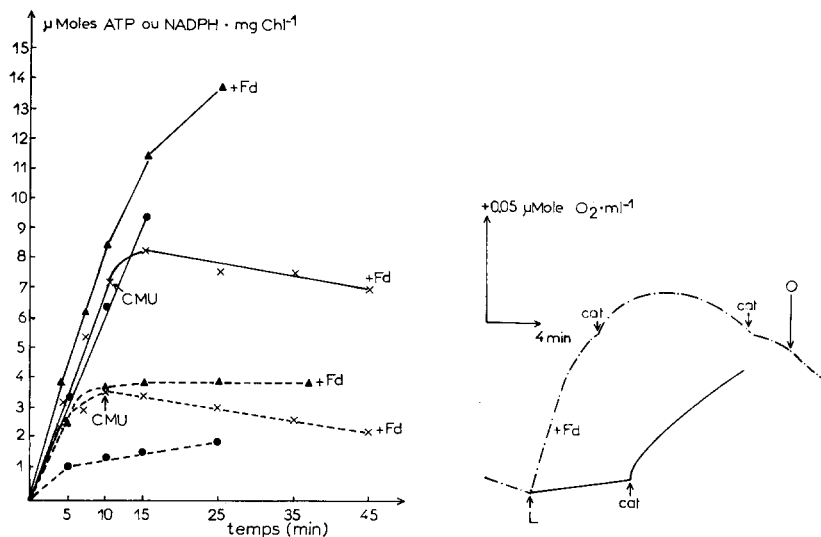


Fig. 5. Effet de la ferrédoxine sur la photophosphorylation et la réduction du NADP^+ des chloroplastes de fève. —, photophosphorylation; — — —, réduction du NADP^+ . + Fd, ferrédoxine ajoutée 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Le CMU (5 μM) est ajouté au moment indiqué sur la figure.

Fig. 6. Effet de la catalase sur le dégagement d' O_2 des chloroplastes d'épinard en présence de NADP^+ . Enregistrements polarographiques. + Fd, ferrédoxine ajoutée 64 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Abréviations voir Fig. 1.

rieur à 1 quand la ferrédoxine est limitante, devient voisin de 1 lorsqu'elle est saturante. En présence de quantités limitantes de ferrédoxine, l'addition de catalase augmente le dégagement d' O_2 observé, montrant ainsi que l'excédent d'ATP formé par rapport au NADPH est dû pour une bonne part à un transfert lié à la réduction d' O_2 (Fig. 6).

Lorsque tout le $NADP^+$ est réduit, la synthèse d'ATP se poursuit à une vitesse identique à celle que l'on observe lorsque les mesures sont effectuées en absence de $NADP^+$ exogène. L'oxygène émis est alors réabsorbé (Fig. 3), cette réabsorption n'étant visible, dans les chloroplastes de fève, qu'en présence de KCN. Absorption d' O_2 et phosphorylation sont sensibles au CMU.

DISCUSSION

Pour les chloroplastes d'épinard, la stimulation simultanée de l'absorption d' O_2 et de la phosphorylation par la ferrédoxine, en l'absence de $NADP^+$, montre que dans ces conditions l' O_2 intervient soit au niveau de la ferrédoxine elle-même, qui est autoxydable²², soit au niveau de la ferrédoxine- $NADP^+$ -réductase, puisque l'anticorps de la réductase a un effet inhibiteur sur la phosphorylation aérobie se déroulant en présence de pyridine nucléotide réductase photosynthétique (équivalente à l'actuelle ferrédoxine)²³.

En présence de $NADP^+$, nous avons vu que les rapports ATP/NADPH élevés que l'on observe lorsque la ferrédoxine est limitante sont dus au fonctionnement simultané de deux systèmes non cycliques (à $NADP^+$ et à O_2). L'addition de ferrédoxine diminue la part de phosphorylation liée à la réduction de l' O_2 jusqu'à la supprimer totalement. La phosphorylation aérobie se déroulant en conditions de ferrédoxine limitante doit donc dépendre d'un transfert d'électrons où l' O_2 intervient avant la ferrédoxine, probablement au niveau du réducteur primaire du Système I.

On peut penser que les deux sites proposés existent également dans les chloroplastes de fève, puisque la variation des rapports ATP/NADPH y est analogue. Mais comme l'addition de ferrédoxine, en l'absence de $NADP^+$ exogène, ne stimule pas, ou même diminue la photophosphorylation et l'absorption d' O_2 de ces chloroplastes, il semble que dans les chloroplastes de fève, le site situé avant la ferrédoxine soit particulièrement sensible à O_2 .

La ferrédoxine elle-même (ou sa réductase), comme l'ont déjà observé ARNON

TABLEAU I

EFFET DE LA FERRÉDOXINE SOUS AZOTE ET SOUS AIR SUR LA PHOTOPHOSPHORYLATION ET LA PHOTORÉDUCTION SE DÉROULANT EN PRÉSENCE DE $NADP^+$ EXOGENE

Ferrédoxine ajoutée: 110 $\mu\text{g/ml}$. Chloroplastes de fève. 10 min d'incubation à la lumière.

Additions	Phase gazeuse	$NADP^+$ réduit		ATP formé	ATP/ NADPH
		$\mu\text{moles} \cdot \text{mg}$ $\text{Chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	% de l'activité sous N_2		
—	Azote	4.6	100	10	2.1
	Air	3.6	78	24	6.6
	Azote	46	100	52	1.1
	Air	38	82	55	1.4

*et al.*², semble inaccessible à l'O₂ tant que le NADP⁺ n'est pas limitant. On s'attendrait donc à ce que l'O₂ ne puisse pas déprimer la réduction de ce nucléotide.

Or la réduction du NADP⁺ reste toujours légèrement inférieure sous air (Tableau I), le pour cent d'activité par rapport à l'azote restant sensiblement le même en présence et en absence de ferrédoxine exogène. Il semblerait donc que la diminution de la réduction du NADP⁺ soit due à l'intervention d'un site sans rapport direct avec la ferrédoxine. Il faut noter à cet égard que d'autres points d'intervention de l'O₂, situés entre les deux systèmes photochimiques, ont été décrits (voir notamment ref. 24).

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier le professeur A. Moysé qui nous a guidés dans ce travail, et Mme A. Hoarau dont nous avons apprécié la collaboration technique.

RÉSUMÉ

L'effet de l'addition de ferrédoxine sur l'absorption ou le dégagement endogène d'O₂, la photophosphorylation et la réduction du NADP⁺ des chloroplastes isolés d'épinard et de fève a été étudié en aérobiose.

En absence de NADP⁺, on observe une absorption d'O₂ et une photophosphorylation sensibles au 3-(*p*-chlorophényl)-1,1-diméthylurée. L'addition de ferrédoxine stimule ces deux activités dans les chloroplastes d'épinard et les inhibe légèrement dans les chloroplastes de fève.

En présence de NADP⁺, les rapports ATP/NADPH sont élevés. L'addition de ferrédoxine, stimulant la réduction du NADP⁺ plus que la photophosphorylation, les diminue jusqu'à ce qu'ils atteignent 1.

L'addition de ferrédoxine n'a pas d'effet sur la diminution de la réduction du NADP⁺ dans l'air, par rapport à l'azote.

Ces résultats sont discutés en fonction des sites sensibles à l'O₂ existant dans les chloroplastes.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 K. TAGAWA, H. Y. TSUJIMOTO ET D. I. ARNON, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 49 (1963) 567.
- 2 D. I. ARNON, H. Y. TSUJIMOTO ET B. MCSWAIN, *Nature*, 214 (1967) 562.
- 3 G. FORTI ET A. T. JAGENDORF, *Biochim. Biophys. Acta*, 54 (1961) 522.
- 4 T. NAKAMOTO, D. W. KROGMANN ET B. VENNESLAND, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 2783.
- 5 P. S. NOBEL, *Plant Physiol.*, 42 (1967) 1389.
- 6 M. MIGINIAC-MASLOW ET A. MOYSE, in H. METZNER, *Progress in Photosynthesis Research*, Vol. 3, IUBS, Tübingen, 1969, p. 1203.
- 7 Y. MATHIEU *Biochim. Biophys. Acta*, 189 (1969) 411.
- 8 M. AVRON ET B. CHANCE, *Brookhaven Symp. Biol.*, 19 (1969) 149.
- 9 Y. DE KOUCHKOVSKY ET P. JOLIOT, *Photochem. Photobiol.*, 6 (1967) 567.
- 10 U. HEBER ET C. S. FRENCH, *Planta*, 79 (1968) 99.
- 11 O. WARBURG, *Biochem. Z.*, 103 (1920) 188.
- 12 F. R. WHATLEY, *Photosynthetic Mechanisms in Green Plants*, *Natl. Acad. Sci. U.S.-Natl. Res. Council Publ.*, 1145 (1963) 243.
- 13 U. HEBER, *Biochim. Biophys. Acta*, 180 (1969) 302.
- 14 M. GIBBS, P. W. ELLYARD ET E. LATZKO, in K. SHIBATA, A. TAKAMIYA, A. T. JAGENDORF ET R. C. FULLER, *Comparative Biochemistry and Biophysics of Photosynthesis*, University of Tokyo Press, Tokyo, 1968, p. 387.

- 15 D. I. ARNON, *Am. J. Botany*, (1938) 322.
- 16 R. G. JENSEN ET J. A. BASSHAM, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 56 (1966) 1095.
- 17 D. I. ARNON, *Plant Physiol.*, 24 (1949) 1.
- 18 R. HILL ET F. BENDALL, *Nature*, 187 (1960) 417.
- 19 B. J. DAVIS, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121 (1964) 404.
- 20 M. AVRON, *Biochim. Biophys. Acta*, 40 (1960) 257.
- 21 A. H. MEHLER, *Arch. Biochem. Biophys.*, 33 (1951) 65.
- 22 D. I. ARNON, *Experientia*, 22 (1966) 1.
- 23 C. A. FEWSON, C. C. BLACK ET M. GIBBS, *Plant Physiol.*, 38 (1963) 680.
- 24 O. BJÖRKMAN, *Physiol. Plantarum*, 19 (1966) 618.

Biochim. Biophys. Acta, 205 (1970) 95-101