

BBA 45944

RECHERCHE DE PLUSIEURS TRANSPORTEURS D'ELECTRONS,
NOTAMMENT DES CYTOCHROMES *b*-559 ET *c*-553, CHEZ TROIS MUTANTS
NON PHOTOSYNTHETIQUES DE *CHLAMYDOMONAS REINHARDI*

JACQUES GARNIER ET JEANNINE MAROC

Laboratoire de Photosynthèse, C.N.R.S., 91-Gif-sur-Yvette (France)

(Reçu le 13 janvier, 1970)

SUMMARY

Studies of several electron carriers, particularly cytochromes b-559 and c-553 in three non-photosynthetic mutants of Chlamydomonas reinhardtii

Biochemical and spectroscopic analyses were performed in order to investigate the electron-carrier contents of three non-photosynthetic mutants (*Fl* 5, *Fl* 9 and *Fl* 15) of *Chlamydomonas reinhardtii*. These mutants exhibit several physiological anomalies, which indicate a blocking of the internal electron transport close to Photoreaction II.

Quinones and soluble proteins were analysed by chromatography. With the insoluble cell debris, difference absorption spectra were measured at 20° and at -190°.

The plastoquinone A, soluble cytochrome *c*-553, plastocyanin, ferredoxin and ferredoxin-NADP⁺ reductase contents of each mutant and of the wild type were comparable. Cytochrome *b*-559, also, was present in the four strains. But it appeared that the mutants *Fl* 9 and *Fl* 15 showed only traces of the insoluble (bound) form of cytochrome *c*-553; this insoluble form was present, in appreciable amounts, in the wild type and in the mutant *Fl* 5.

The wild type contained about: 1 molecule of cytochrome *b*-559 per 130 molecules of chlorophyll (*a*+*b*) and 1 molecule of bound cytochrome *c*-553 per 500 molecules of chlorophyll.

It seems probable that the mutants are affected by structural defects, which may be of a different nature for *Fl* 9 and *Fl* 15, on the one hand, and for *Fl* 5 on the other. However, the possibility of the lack of an unknown electron carrier in these mutants cannot be ruled out.

INTRODUCTION

Il est actuellement établi, à la suite de très nombreux travaux, que, chez les algues et les plantes supérieures, le mécanisme primaire de la photosynthèse comporte deux réactions photochimiques sensibilisées par des systèmes pigmentaires différents et couplées en série par une chaîne de transfert d'électrons. Divers transporteurs (cytochromes de type *b* et de type *c*, plastoquinones, plastocyanine, ferrédoxine), dont la présence dans les chloroplastes a été mise en évidence, interviennent vraisemblablement dans le transfert d'électrons, soit directement en série dans une voie principale, soit en

dérivation dans des voies parallèles. Le rôle exact de certains de ces transporteurs d'électrons n'est pas encore établi avec précision (voir revue¹). On sait, par ailleurs, que l'examen comparé des propriétés de mutants d'algues vertes unicellulaires, bloqués à différents niveaux de la chaîne de transport d'électrons liée aux deux réactions photochimiques, est un moyen d'investigation utile fréquemment employé pour l'étude du mécanisme de la photosynthèse (voir revues²⁻⁴).

Le but du présent travail est d'examiner l'équipement en transporteurs d'électrons de trois mutants de *Chlamydomonas reinhardtii* (souches *Fl* 5, *Fl* 9 et *Fl* 15). Ces mutants ont été isolés par l'un de nous (J.G.) et ont été sélectionnés au moyen de tests physiologiques relatifs à la fluorescence chlorophyllienne, à l'émission d'O₂ et aux variations d'absorption photoinduites *in vivo*⁵. Ils sont chlorophylliens, mais ils sont incapables de réaliser complètement la photosynthèse. Les études physiologiques, qui ont été réalisées^{5,6}, ont montré que, chez les trois mutants, la Photoréaction II fonctionne mais que le transfert d'électrons est probablement interrompu au voisinage du réducteur formé par cette dernière. Il semblait donc intéressant de rechercher si ces mutants présentent une déficience en l'un (ou en plusieurs) des transporteurs d'électrons photosynthétiques actuellement identifiés.

En ce qui concerne *Chlamydomonas*, l'étude de plusieurs mutants a permis à LEVINE⁷ de confirmer l'intervention en série, entre les deux réactions photochimiques, des transporteurs d'électrons suivants: un cytochrome de type *b* absorbant *in vivo* à 559 nm (cytochrome *b*-559), un cytochrome de type *c* absorbant *in vivo* à 553 nm (cytochrome *c*-553) et la plastocyanine. Le cytochrome *b*-559 ne peut pas être extrait des fragments de chloroplastes; le cytochrome *c*-553 existe sous deux formes: une forme "soluble" facilement extractible et une forme "insoluble" non extractible⁸. La présence de ferrédoxine a aussi été mise en évidence chez *Chlamydomonas*⁹: ce transporteur interviendrait, avec la ferrédoxine-NADP⁺-réductase, dans la partie terminale de la chaîne de transfert d'électrons, au voisinage du réducteur formé par la Photoréaction I^{1,7}.

Dans le but de préciser les propriétés des mutants *Fl* 5, *Fl* 9 et *Fl* 15, nous avons donc recherché, dans chacun d'eux et dans la souche sauvage, les quinones, les cytochromes *b*-559 et *c*-553, la plastocyanine, la ferrédoxine et la ferrédoxine-NADP⁺-réductase. Une analyse spectroscopique détaillée a montré que *Fl* 9 et *Fl* 15 sont déficients en cytochrome *c*-553 insoluble. Quelques interprétations possibles de ce résultat, ainsi que de ceux obtenus précédemment, sont proposées.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Organismes, conditions de culture et de récolte

La souche sauvage de *Chlamydomonas reinhardtii*, utilisée pour ces recherches, a été fournie au début par le Professeur R. P. LEVINE de l'Université Harvard. Les mutants *Fl* 5, *Fl* 9 et *Fl* 15 (qui sont désignés à l'aide du préfixe *Fl*, en raison du niveau élevé de la fluorescence chlorophyllienne émise par leurs colonies) ont été obtenus au laboratoire, par irradiation de cellules sauvages en lumière ultra-violette. Ils ont été sélectionnés, parmi de nombreuses souches, au moyen d'une méthode de criblage par photographie de fluorescence¹⁰ et à l'aide d'une série de tests physiologiques⁵.

Les algues de chacune des souches sont cultivées en conditions axéniques, sur

un milieu contenant de l'acétate (milieu Tris-acétate-phosphate¹¹), à 25°, en présence d'un éclaircissement faible (1000 lux), les suspensions étant continuellement agitées et aérées. Dans de nombreux cas, pour la recherche des protéines transporteurs d'électrons ainsi que pour certaines des analyses de quinones, des cultures de grands volumes (50 ou 100 l) sont effectuées et des récoltes importantes, d'environ 10 g d'algues sèches, sont utilisées.

Lorsque les cultures parviennent à la fin de la phase de croissance exponentielle, les algues sont récoltées et lavées, à 4°, au moyen de centrifugations. Sur des parties aliquotes de chaque récolte, les masses d'algues sèches et les teneurs en chlorophylles $a+b$ sont déterminées. Les chlorophylles sont extraites par l'acétone à 80 % dans l'eau et dosées spectrophotométriquement selon MACKINNEY¹² et ARNON¹³.

Analyse des quinones

Après la récolte, le culot d'algues centrifugées est extrait par l'acétone jusqu'à épuisement. L'acétone est ensuite éliminée par évaporation sous vide; le résidu est repris dans l'éther de pétrole puis il est chromatographié sur une colonne d'acide silicique (Mallinckrodt) et de célite (2:1, en poids). Les quinones sont éluées par un mélange d'éther éthylique et d'éther de pétrole (3:7, en vol.)¹⁴. L'éluat est ensuite concentré, puis il est chromatographié sur couches minces de gel de silice PF 254 (Merck) ou de gel de silice HR très pur (Merck). Les quinones sont détectées au moyen de leur coloration au bleu de méthylène, sur gel HR, selon la technique de HENNINGER *et al.*¹⁵, ou bien, sur gel PF 254, en utilisant leur forte absorption dans l'ultra-violet. Elles sont éluées par l'éther. Elles sont ensuite identifiées et dosées par mesure de leurs spectres d'absorption dans l'éthanol, à l'état oxydé et après réduction par le NaBH₄. Les coefficients d'extinction (oxydé *minus* réduit) utilisés sont: 15 cm²· μ mole⁻¹, à 255 nm, pour la plastoquinone¹⁶ et 12.25 cm²· μ mole⁻¹, à 275 nm, pour l'ubiquinone¹⁷. La longueur de la chaîne isoprénique de l'ubiquinone est déterminée par chromatographie en phases inversées sur plaques de gel de silice imprégnées d'une solution de paraffine à 5 % dans l'éther de pétrole. L'ubiquinone est cochromatographiée avec des témoins: ubiquinones Q6 (Sigma), Q8 (préparée à partir de *Rhodospseudomonas gelatinosa*¹⁸), Q9 (don généreux de Hoffman-La Roche) et Q10 (Sigma); les chromatogrammes sont développés avec le mélange de solvants acétone-eau (95:5, en vol.).

Analyse des protéines transporteurs d'électrons

Les techniques employées pour l'analyse des protéines transporteurs d'électrons solubles sont celles qui sont indiquées par GORMAN ET LEVINE^{9,19} et CHUA ET LEVINE²⁰. Après la récolte, les algues sont mises en suspension dans un tampon phosphate 2 mM (pH 7.5), puis elles sont fixées par addition de 4 vol. d'acétone refroidie à -20°. Toutes les opérations ultérieures sont ensuite réalisées à 4°. L'acétone est éliminée par filtration, puis la poudre acétonique est extraite pendant une nuit avec un tampon phosphate 0.01 M (pH 7.5). Par centrifugation, on sépare ensuite: un surnageant, qui contient les protéines solubles, et un culot de résidus cellulaires, qui renferme les protéines insolubles.

Le surnageant est chromatographié sur colonne de DEAE-cellulose (Type 20, Brown Co.), les protéines étant éluées avec du tampon phosphate 0.05 M (pH 7.5) additionné de quantités croissantes de KCl^{19,20}. Par ordre d'élution, sont ainsi

séparés: la ferrédoxine-NADP⁺-réductase, le cytochrome *c*-553 et la plastocyanine, puis la ferrédoxine. Dans les fractions collectées, l'activité ferrédoxine-NADP-réductase est mise en évidence par la décoloration du 2,6-dichlorophénolindophénol, selon la technique de JAGENDORF²¹. Le cytochrome *c*-553 et la plastocyanine sont identifiés spectrophotométriquement. Le dosage du cytochrome est effectué selon GORMAN ET LEVINE⁹: sur les spectres des éluats réduits par l'ascorbate, l'absorption correspondant à la bande α est mesurée à 553 nm, par rapport à une ligne de base joignant les points situés à 542 et 561 nm, et le coefficient d'extinction de $20 \text{ cm}^2 \cdot \mu\text{mole}^{-1}$ est utilisé. La plastocyanine est dosée dans les éluats par mesure des différences d'absorption à 597 nm: état oxydé (par le ferricyanure) *minus* état réduit (par l'ascorbate), et emploi du coefficient d'extinction de $9.8 \text{ cm}^2 \cdot \mu\text{mole}^{-1}$ indiqué par KATOH *et al.*²². Le cytochrome *c*-553 et la plastocyanine sont ensuite éventuellement purifiés, au moyen de plusieurs chromatographies successives sur DEAE-cellulose^{9,19}. La ferrédoxine est repérée grâce à sa couleur brune et identifiée à l'aide de son spectre d'absorption⁹.

Pour l'analyse des résidus cellulaires insolubles, divers spectres d'absorption sont mesurés avec des suspensions maintenues à la température de la pièce (environ 20°) et avec des préparations refroidies à l'aide d'azote liquide (environ -190°). Dans les deux cas, les résidus cellulaires sont mis en suspension dans du tampon phosphate 0.01 M (pH 7.5); puis 4 vol. d'acétone sont ajoutés, afin d'extraire les pigments (chlorophylles, caroténoïdes) non éliminés lors de la fixation par l'acétone à froid.

Lorsque les mesures sont effectuées à 20°, l'acétone est éliminée par centrifugation et le culot dépigmenté est de nouveau mis en suspension dans du tampon phosphate; l'addition de quelques cristaux de NaHSO₃, d'ascorbate de sodium ou de K₃Fe(CN)₆, permet ensuite de réduire ou d'oxyder les cytochromes. Des lames de verre opalin sont accolées aux cuves du spectrophotomètre, selon le procédé de SHIBATA *et al.*²³, afin de diminuer les causes d'erreurs dues à la diffusion de la lumière par les particules en suspension; les spectres de différence sont mesurés directement, la suspension oxydée servant de référence. Les calculs de concentrations en cytochromes sont effectués, à partir de plusieurs spectres réalisés avec des dilutions différentes, en utilisant les coefficients d'extinction de $25 \text{ cm}^2 \cdot \mu\text{mole}^{-1}$ (cytochrome *c*) et de $20 \text{ cm}^2 \cdot \mu\text{mole}^{-1}$ (cytochromes *b*), selon la méthode indiquée pour des particules chloroplastiques par LUNDEGÅRDH²⁴. Les hauteurs des pics à 553.5 nm ou à 559 nm sont mesurées par rapport aux minimums situés à 575 nm²⁵.

Pour les spectres mesurés à -190°, le culot dépigmenté est déposé, par filtration de la suspension acétonique, sur une rondelle de papier filtre (filtre sans cendre, Prolabo). Il est ensuite traité par une solution concentrée de NaHSO₃, d'ascorbate de sodium ou de K₃Fe(CN)₆, que l'on fait passer sur le filtre. Immédiatement après, le papier filtre, ayant à sa surface quelques couches de débris cellulaires humides, est placé à l'intérieur du spectrophotomètre, sur un support métallique qui plonge dans l'azote liquide; le dispositif et la technique utilisés ont été mis au point et décrits par BRIANTAIS²⁶. Les spectres à l'état réduit et à l'état oxydé sont mesurés séparément, du papier filtre humide servant de référence; les spectres de différence sont calculés ensuite. Toutes les mesures de spectres d'absorption sont réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre enregistreur Cary 14, en utilisant l'échelle d'absorbances: 0-0.1.

RÉSULTATS

Chlorophylles

Lorsque les algues sont cultivées dans des conditions identiques et récoltées à la fin de la phase de croissance exponentielle, les souches *Fl 5* et *Fl 15* sont généralement un peu moins pigmentées que la souche sauvage; mais les trois souches ont des teneurs en chlorophylles (exprimées par rapport à la masse d'algues sèches) voisines. Par contre, le mutant *Fl 9* est toujours nettement moins (environ 1.8 fois moins) pigmenté que la souche sauvage. Les Tableaux I et II indiquent les teneurs en chlorophylles $a+b$ des algues qui ont été utilisées pour la recherche des quinones et pour celle des protéines transporteurs d'électrons. Il a par ailleurs été constaté, à l'occasion de nombreux dosages de pigments effectués avec ces souches, que les rapports chlorophylle a /chlorophylle b sont généralement du même ordre de grandeur (2.2) pour les souches *Fl 9*, *Fl 15* et sauvage, mais un peu moins élevé (de l'ordre de 1.8) pour le mutant *Fl 5*. Les rapports chlorophylles $a+b$ /caroténoïdes totaux sont sensiblement les mêmes et de l'ordre de 4 pour les quatre souches.

TABLEAU I

TENEURS EN CHLOROPHYLLES, PLASTOQUINONE A ET UBIQUINONE Q9 DE LA SOUCHE SAUVAGE ET DES MUTANTS *Fl 5*, *Fl 9*, *Fl 15* DE *C. reinhardi*

Les valeurs relatives aux chlorophylles et à la plastoquinone A sont des moyennes correspondant à trois séries de dosages effectués sur des récoltes différentes: les écarts maximums, qui ont été constatés, sont de $\pm 22\%$ (dans le cas de *Fl 9*) pour les chlorophylles et de $\pm 34\%$ (dans le cas de *Fl 15*) pour la plastoquinone A. Les résultats concernant l'ubiquinone Q9 ne correspondent qu'à un (souche sauvage, *Fl 15*) ou deux (*Fl 5*, *Fl 9*) dosages.

	<i>Souche sauvage</i>	<i>Mutants</i>		
		<i>Fl 5</i>	<i>Fl 9</i>	<i>Fl 15</i>
Chlorophylles $a+b$ (mg/g d'algues sèches)	57	48	32	48
Plastoquinone A (μ mole/g d'algues sèches)	0.65	0.62	0.65	0.82
(μ moles/m mole de chlorophylles $a+b$)	9.8	11.6	17.8	15.2
Ubiquinone Q9 (μ mole/g d'algues sèches)	0.26	0.24	0.29	0.18

Quinones

Bien que certaines analyses aient été effectuées à partir de quantités importantes d'algues (8.8 g d'algues sèches correspondant à 550 mg de chlorophylles, dans le cas de la souche sauvage), seules ont pu être décelées: la plastoquinone A et l'ubiquinone Q9. On sait que, chez les végétaux verts, la plastoquinone A (Q 254) se trouve dans les chloroplastes et intervient vraisemblablement dans la photosynthèse^{1,27}, tandis que les ubiquinones (Q 275 ou coenzymes Q) sont localisées dans les mitochondries et participent aux transports d'électrons liés aux oxydations cellulaires²⁸⁻³⁰. Les résultats des dosages de quinones sont indiqués dans le Tableau I. On voit que l'équipement en quinones de chacun des mutants est sensiblement le même que celui de la souche sauvage: les teneurs en plastoquinone A, exprimées par rapport à la masse d'algues sèches, sont très voisines et les différences observées d'une souche

à l'autre, qui sont inférieures aux écarts constatés avec différentes récoltes d'une même souche, ne sont pas significatives. Si les rapports plastoquinone A/chlorophylles varient avec les souches, les différences reflètent essentiellement celles des teneurs des algues en chlorophylles; ceci est particulièrement net dans le cas du mutant *Fl 9*. Les valeurs obtenues pour la plastoquinone A sont du même ordre de grandeur (0.01–0.02 μ mole/mg de chlorophylles) que celles qui sont reportées par SUN *et al.*³¹ pour différentes espèces d'algues, dont *Chlorella pyrenoidosa* et *Euglena gracilis*. Par contre, ces valeurs sont nettement plus faibles que celles (15 moles de chlorophylles par mole de plastoquinone) qui sont indiquées par SMILLIE ET LEVINE³², pour *C. reinhardi*. Ces différences sont peut-être en relation avec le fait que les conditions de culture des algues (éclairage de 4000 lux), d'une part, et la méthode de purification des quinones, d'autre part, utilisées par les auteurs précédents³², sont différentes de celles que nous avons employées pour le présent travail.

On peut noter, enfin, que la présence d'ubiquinone Q9 a été mise en évidence dans chacune des souches et que les teneurs des mutants sont du même ordre de grandeur que celle de la souche sauvage.

TABLEAU II

TENEURS EN CHLOROPHYLLES, CYTOCHROMES, PLASTOCYANINE, FERRÉDOXINE ET FERRÉDOXINE-NADP⁺-RÉDUCTASE DE LA SOUCHE SAUVAGE ET DES MUTANTS *Fl 5*, *Fl 9*, *Fl 15* DE *C. reinhardi*

+, présence de. (Au cours des séparations chromatographiques, la présence de ferrédoxine, formant de larges bandes brunes sur les colonnes et identifiée spectrophotométriquement, a été constatée dans le cas de chaque souche. La ferrédoxine n'a pas été purifiée ni dosée. L'activité ferrédoxine-NADP⁺-réductase a été recherchée dans certaines des fractions collectées, mais elle n'a pas été systématiquement mesurée sur la totalité des éluats. Dans le cas de chacun des mutants et dans celui de la souche sauvage, des activités comparables ont été nettement mises en évidence.) Ces résultats correspondent à une seule série de dosages.

	Souche sauvage	Mutants		
		<i>Fl 5</i>	<i>Fl 9</i>	<i>Fl 15</i>
Chlorophylles <i>a + b</i> (mg/g d'algues sèches)	56	47	31	44
<i>Protéines solubles</i>				
Cytochrome <i>c-553</i> (μ mole/g d'algues sèches)	0.023	0.015	0.008	0.014
(μ mole/m mole de chlorophylles <i>a + b</i>)	0.36	0.29	0.23	0.28
Plastocyanine (μ mole/g d'algues sèches)	0.071	0.070	0.095	0.091
(μ moles/m mole de chlorophylles <i>a + b</i>)	1.13	1.33	2.74	1.86
Ferrédoxine	+	+	+	+
Ferrédoxine-NADP ⁺ -réductase	+	+	+	+
<i>Cytochromes insolubles*</i>				
Cytochrome <i>c-553</i> (μ mole/g d'algues sèches)	0.13	0.06	Traces	Traces
(μ moles/m mole de chlorophylles <i>a + b</i>)	2.0	1.2	Traces	Traces
Cytochrome <i>b-559</i> (μ mole/g d'algues sèches)	0.48	0.37	0.16	0.24
(μ moles/m mole de chlorophylles <i>a + b</i>)	7.7	7.1	4.5	4.9

* Teneurs approximatives calculées à partir de différents spectres d'absorption de résidus cellulaires insolubles (voir texte).

Cytochromes

Les résultats des analyses concernant les cytochromes *c*-553 et *b*-559 sont résumés dans les Tableaux II et III et dans les Figs. 1-6.

Les trois mutants *Fl* 5, *Fl* 9 et *Fl* 15, comme la souche sauvage, possèdent la forme soluble du cytochrome *c*-553. A titre d'exemple, les spectres d'absorption d'un extrait du mutant *Fl* 15, qui indiquent la présence de cytochrome *c*-553 et de plastocyanine, sont reproduits sur la Fig. 1. La Fig. 2 montre les spectres de différence, réduit *minus* oxydé, d'une solution de cytochrome *c*-553 purifié: les deux pics à 552.5 nm et à 522.5 nm, à 20°, correspondent aux bandes α et β indiquées par GORMAN ET LEVINE⁹. Exprimées par rapport aux masses d'algues sèches, les teneurs en cytochrome soluble sont légèrement plus faibles, pour *Fl* 5 et *Fl* 15, et nettement plus petite, pour *Fl* 9, que pour la souche sauvage (Tableau II). Par contre, lorsque les quantités de cytochrome *c*-553 sont rapportées aux quantités de chlorophylles *a*+*b*, les valeurs obtenues sont voisines et oscillent autour d'un rapport moyen de 3 molécules de cytochrome pour 10000 molécules de chlorophylles; ce rapport est du même ordre de grandeur que celui qui a été observé par GORMAN ET LEVINE⁹, avec des cellules de *Chlamydomonas* récoltées au début de la phase de croissance stationnaire. Il semble donc que, contrairement à ce qui a été observé pour la plastoquinone

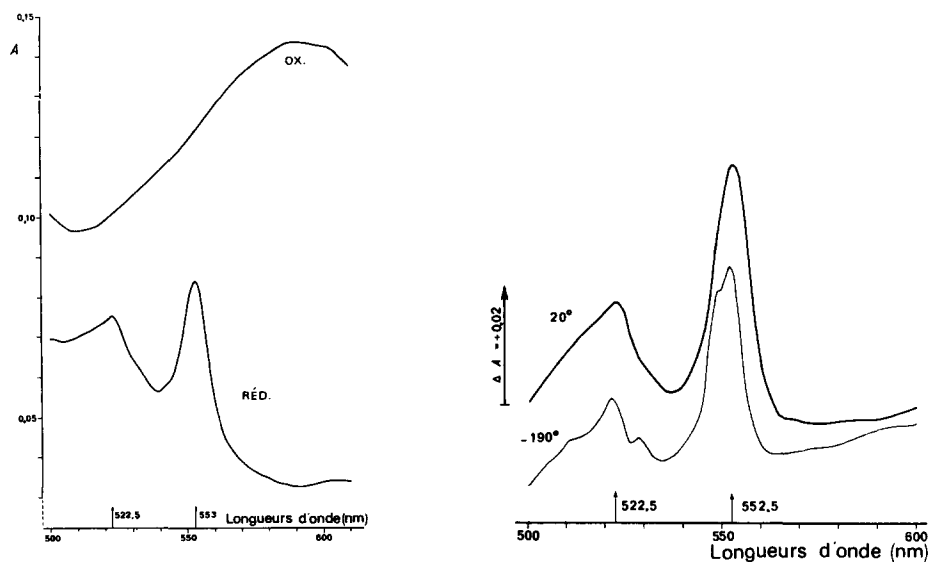


Fig. 1. Spectres d'absorption, à 20°, d'un extrait du mutant *Fl* 15 de *C. reinhardtii*, contenant du cytochrome *c*-553 et de la plastocyanine: oxydé par le $K_3Fe(CN)_6$ (OX.) et réduit par l'ascorbate (RÉD.). Ces spectres sont ceux de la fraction qui a été éluée avec du tampon phosphate 0.05 M (pH 7.5) additionné de KCl 0.15 M, lors de la chromatographie sur DEAE-cellulose de l'extrait brut obtenu à partir d'une poudre acétonique d'algues. 1 ml d'extrait correspond à 114 mg d'algues sèches ou à 5 mg de chlorophylles *a*+*b*. Maximum dans la région 590-600 nm (OX.): plastocyanine; pics à 522.5 et à 553 nm (RÉD.): cytochrome *c*-553.

Fig. 2. Spectres de différence d'une solution de cytochrome *c*-553 de *C. reinhardtii*, à 20° et à -190°: réduit (par l'ascorbate) *minus* oxydé (par le $K_3Fe(CN)_6$). Le cytochrome, extrait à partir de cellules sauvages, a été purifié au moyen de plusieurs chromatographies sur DEAE-cellulose. Solvant: tampon phosphate 0.02 M (pH 7.5); pour le spectre à -190°, une rondelle de papier filtre imbibée de solution est congelée à l'aide d'azote liquide. Les deux spectres ne sont pas comparables quantitativement.

A, il y ait une relation entre teneur en chlorophylles et teneur en cytochrome *c*-553 soluble.

L'examen spectroscopique des résidus cellulaires, après extraction des protéines solubles, indique la présence dans la souche sauvage de deux cytochromes insolubles (Figs. 3-6). Les deux cytochromes sont réduits par le NaHSO_3 (Fig. 3), tandis que seul l'un d'entre eux est réduit par l'ascorbate de sodium (Fig. 4): le NaHSO_3 , dont le potentiel d'oxydo-réduction est suffisamment bas, est capable de réduire tous les cytochromes des chloroplastes; par contre, l'ascorbate a un potentiel ($E_0' = +0.08$ V) plus élevé que ceux des cytochromes de type *b* (voir réf. 1) et ne peut réduire ceux-ci. L'un des cytochromes insolubles est donc vraisemblablement de type *c* et l'autre de type *b*. Sur les spectres de différence: réduit par l'ascorbate *minus* oxydé par le $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, des résidus insolubles de souche sauvage: à -190° (Fig. 4), les pics (à 548-548.5 et 552 nm) correspondent à ceux du cytochrome *c*-553 purifié (Fig. 2), ainsi qu'à ceux qui ont été indiqués pour le cytochrome *f* des plantes supérieures^{25, 33}; à 20° (Fig. 6A), le maximum à 553.5 nm correspond à la bande α de la forme insoluble du cytochrome *c*-553 de *C. reinhardtii*⁸.

Quant à l'autre cytochrome insoluble, son maximum d'absorption à 556-557 nm, à -190° (Fig. 5; sur les spectres de différence: réduit par le NaHSO_3 *minus* réduit par l'ascorbate, l'absorption due au cytochrome *c*-553 est éliminée), correspond à celui du cytochrome 559, de type *b*, des chloroplastes de plantes supérieures^{25, 26}. De plus, la comparaison des spectres de différence: réduit par le NaHSO_3 moins oxydé par le $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, des résidus insolubles du mutant *Fl* 9 (Figs. 3 et 6B) pour

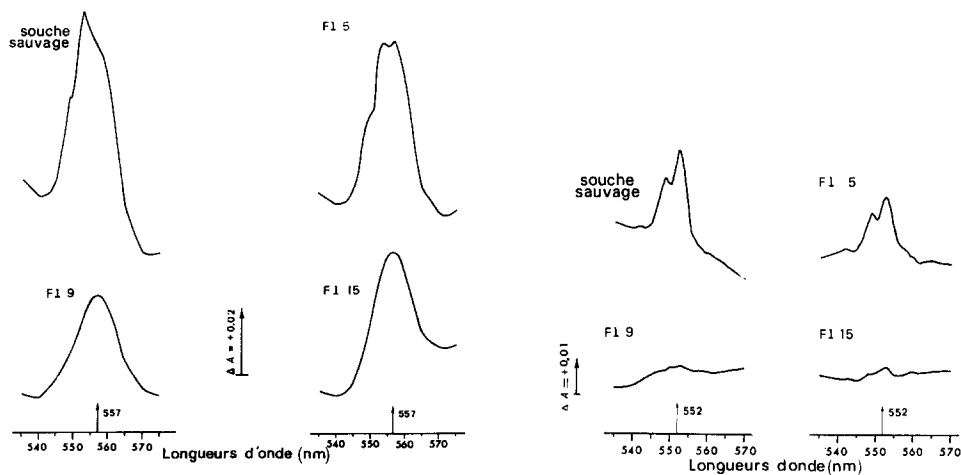


Fig. 3. Spectres de différence de résidus cellulaires insolubles de *C. reinhardtii* (souche sauvage et mutants *Fl* 5, *Fl* 9, *Fl* 15), à -190° : réduit (par le NaHSO_3) *minus* oxydé (par le $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$). Les résidus cellulaires (après extractions des protéines solubles et des pigments) sont déposés sur une rondelle de papier filtre et congelés à l'aide d'azote liquide. Pour chaque spectre, la quantité de résidus répartis sur 1 cm^2 de papier correspond à 0.26 mg de chlorophylles *a* + *b* (dosées avant les extractions). Epaulements à 548.5 nm et pics vers 553 nm: cytochrome *c*-553; pics ou épaulements à 556-557 nm: cytochrome *b*-559.

Fig. 4. Spectres de différence de résidus cellulaires insolubles de *C. reinhardtii* (souche sauvage et mutants *Fl* 5, *Fl* 9, *Fl* 15), à -190° : réduit (par l'ascorbate) *minus* oxydé (par le $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$). Les conditions de mesure de ces spectres sont les mêmes que celles qui sont indiquées dans la légende de la Fig. 3. Pics à 548-548.5 et à 552 nm: cytochrome *c*-553, qui seul est réduit par l'ascorbate.

lesquels l'absorption due au cytochrome *c*-553 est négligeable, confirme que le maximum d'absorption du cytochrome de type *b* se situe, à 20°, à 559 nm. Les deux cytochromes insolubles de la souche sauvage peuvent donc être identifiés comme

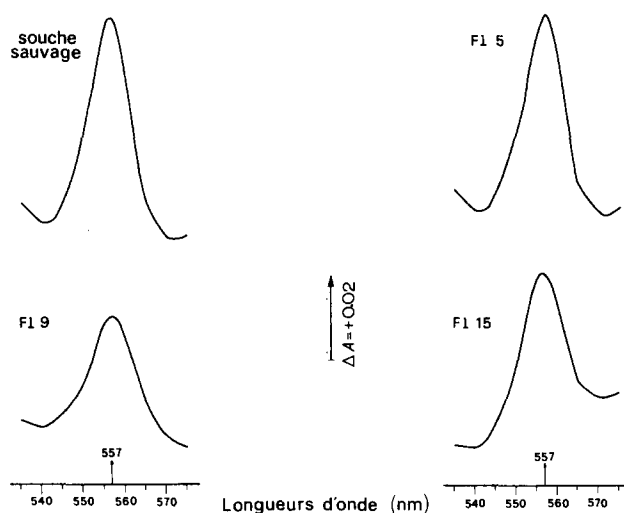


Fig. 5. Spectres de différence de résidus cellulaires insolubles de *C. reinhardi* (souche sauvage et mutants *Fl* 5, *Fl* 9, *Fl* 15), à -190° : réduit (par le NaHSO_3) *minus* réduit (par l'ascorbate). Les conditions de mesure de ces spectres sont les mêmes que celles qui sont indiquées dans la légende de la Fig. 3. Maximums à 556–557 nm: cytochrome *b*-559, qui est réduit par le NaHSO_3 mais non par l'ascorbate.

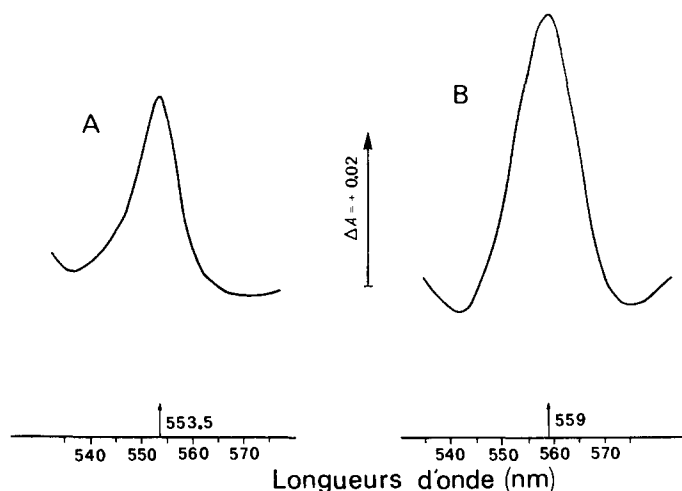


Fig. 6. Spectres de différence de résidus cellulaires insolubles de *C. reinhardi*, à 20° . A. Souche sauvage, réduit (par l'ascorbate) *minus* oxydé (par le $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$). B. Mutant *Fl* 9, réduit (par le NaHSO_3) *minus* oxydé (par le $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$). Les résidus cellulaires (après extractions des protéines solubles et des pigments) sont mis en suspension dans du tampon phosphate 0.01 M (pH 7.5); des lames de verre opalin sont accolées aux cuves du spectrophotomètre. Pour chaque spectre, la quantité de résidus contenus dans 1 ml de suspension correspond à 0.40 mg de chlorophylles *a* + *b* (dosées avant les extractions). Pic à 553.5 nm (A): cytochrome *c*-553, qui seul est réduit par l'ascorbate; maximum à 559 nm (B): cytochrome *b*-559, qui est le seul cytochrome insoluble présent en quantité appréciable chez *Fl* 9.

TABLEAU III

LONGUEURS D'ONDE DES MAXIMUMS D'ABSORPTION ATTRIBUABLES AUX BANDES α DES CYTOCHROMES, OBSERVÉS SUR LES SPECTRES DE DIFFÉRENCE D'EXTRAITS ET DE RÉSIDUS CELLULAIRES DE *C. reinhardi*, À 20° ET À LA TEMPÉRATURE DE L'AZOTE LIQUIDE (−190°)

A—F: réduit par l'ascorbate *minus* oxydé par le $K_3Fe(CN)_6$; H—F: réduit par le $NaHSO_3$ *minus* oxydé par le $K_3Fe(CN)_6$; H—A: réduit par le $NaHSO_3$ *minus* réduit par l'ascorbate.

	λ (nm)		Spectres de différence
	20°	−190°	
Cytochrome <i>c</i> -553 purifié en solution	552.5	548.5* et 552	A—F, H—F
Cytochrome <i>c</i> -553 insoluble	553.5	548–548.5 et 552	A—F
Cytochrome <i>b</i> -559 insoluble	559	556–557	H—F, H—A

* Épaulement important.

étant respectivement les cytochromes *c*-553 et *b*-559, qui ont déjà été mis en évidence dans des fragments de chloroplastes de *C. reinhardi*³⁴. Le Tableau III récapitule les différents maximums d'absorption attribuables aux cytochromes, qui ont été observés au cours de cette étude.

Comme la souche sauvage, le mutant *Fl* 5 possède du cytochrome *c*-553 insoluble, mais en quantité plus faible (Figs. 3 et 4). Les teneurs de ces deux souches, calculées, selon LUNDEGÅRDH²⁴, à partir de plusieurs spectres de différence: réduit par l'ascorbate *minus* oxydé par le $K_3Fe(CN)_6$, mesurés à 20°, sont indiquées dans le Tableau II. Par contre, les spectres obtenus avec les résidus insolubles de *Fl* 9 et de *Fl* 15 ne présentent, vers 548 et 552 nm, que de très petits épaulements mal définis et difficilement mesurables (Figs. 3 et 4). Il n'est d'ailleurs pas exclu que ces faibles épaulements puissent être provoqués par des traces de cytochrome *c*-553 soluble, qui auraient été entraînées avec les résidus cellulaires lors des centrifugations. Il apparaît donc que les mutants *Fl* 9 et *Fl* 15 sont pratiquement dépourvus, ou ne possèdent que des traces, de cytochrome *c*-553 insoluble. Ces déficiences ont été contrôlées spectrophotométriquement, à plusieurs reprises, avec des algues provenant de récoltes différentes.

Les spectres reproduits sur les Figs. 3 et 5 montrent nettement la présence de cytochrome *b*-559 chez les trois mutants. Ces spectres, obtenus avec des particules déposées sur du papier filtre, ne permettent pas de faire des mesures quantitatives précises. Il apparaît cependant que *Fl* 15 et, surtout, *Fl* 9 sont, pour une même quantité de chlorophylles, moins riches en cytochrome *b*-559 que la souche sauvage; en effet, les hauteurs des pics des spectres de différence: réduit par le $NaHSO_3$ *minus* réduit par l'ascorbate (Fig. 5), mesurées par rapport à une droite joignant les minimums à 540 nm et à 570 nm, sont dans les rapports suivants: 1 (sauvage), 0.92 (*Fl* 5), 0.69 (*Fl* 15), 0.54 (*Fl* 9). Les teneurs approximatives indiquées dans le Tableau II ont été évaluées de la manière suivante: celles des mutants *Fl* 9 et *Fl* 15, chez lesquels l'absorption due au cytochrome *c*-553 est négligeable, ont été calculées à partir de spectres de différence: réduit par le $NaHSO_3$ *minus* oxydé par le $K_3Fe(CN)_6$, mesurés à 20° (voir Fig. 6B). Les teneurs des souches *Fl* 5 et sauvage (qui ne peuvent être calculées de la même manière, en raison de la présence de cytochrome *c*-553) ont

ensuite été évaluées, à partir des teneurs de *Fl* 9 et de *Fl* 15, à l'aide des rapports de hauteurs de pics indiqués ci-dessus.

Les valeurs moyennes, qui ont été obtenues pour les teneurs en cytochromes insolubles de la souche sauvage (Tableau II) correspondent à: 1 molécule de cytochrome *c*-553 insoluble pour 500 (± 40) molécules de chlorophylles *a* + *b* et 1 molécule de cytochrome *b*-559 pour 130 (± 11) molécules de chlorophylles *a* + *b*. Ces rapports ont des valeurs respectivement très proches de celles des rapports: cytochrome *f*/chlorophylles (1/430) et cytochromes *b₆* + *b*-559/chlorophylles (1/118), qui ont été calculés pour des chloroplastes d'Epinard par BOARDMAN ET ANDERSON²⁵.

On peut encore noter qu'un autre cytochrome de type *b*, qui absorbe vers 563 nm (cytochrome *b*-563) et qui serait comparable au cytochrome *b₆* des chloroplastes de plantes supérieures^{1, 25}, a été détecté chez *C. reinhardtii*. Ce cytochrome a été décelé dans des cellules extraites par l'acétone à froid³², mais il n'a pas été retrouvé dans des fragments de chloroplastes³⁴. Au cours du présent travail, le cytochrome *b*-563 n'a pas été méthodiquement recherché: il n'a été repéré ni dans les fractions d'extraits ni dans les résidus cellulaires insolubles qui ont été examinés; cependant, il est possible que ce cytochrome ait été entraîné avec les protéines solubles, mais qu'il n'ait pas été élué lors des séparations chromatographiques.

Plastocyanine, ferrédoxine, ferrédoxine-NADP⁺-réductase

La souche sauvage et les trois souches de mutants contiennent de la plastocyanine. Les résultats des dosages (Tableau II, voir aussi Fig. 1) montrent que les teneurs en plastocyanine des quatre souches, exprimées par rapport à la masse d'algues sèches, sont très voisines. Par contre, il n'apparaît pas de relation entre teneur en plastocyanine et teneur en chlorophylles, le rapport plastocyanine/chlorophylles *a* + *b* variant nettement d'une souche à l'autre. La teneur de la souche sauvage, qui correspond à 2.3 μ g atomes Cu par mmole de chlorophylles, est semblable à celle qui a été mesurée par GORMAN ET LEVINE¹¹.

Enfin, on peut indiquer qu'au cours des analyses chromatographiques de protéines solubles, la présence de quantités appréciables de ferrédoxine et de ferrédoxine-NADP⁺-réductase, dans les extraits de la souche sauvage et dans ceux de chacun des trois mutants, a été constatée. Ces protéines transporteurs d'électrons n'ont pas été purifiées ni dosées avec précision.

DISCUSSION

Un schéma simplifié du mécanisme primaire de la photosynthèse est représenté sur la Fig. 7.

Des études antérieures^{5, 6}, concernant les échanges d'O₂, les variations photo-induites d'absorption dans la bande 515–520 nm et la fluorescence chlorophyllienne d'algues entières, ont montré que, par comparaison avec les propriétés de la souche sauvage, les mutants *Fl* 5, *Fl* 9 et *Fl* 15 présentent les anomalies suivantes: (1) absence de jet d'O₂ à l'illumination, absence de dégagement d'O₂ en conditions de photosynthèse normale, mais faible réaction de Hill en présence de *p*-benzoquinone; (2) variation photoinduite d'absorption à 519 nm de faible amplitude, qui décroît ensuite très lentement à l'obscurité; (3) niveau élevé de la fluorescence en phase stationnaire. Mais les trois mutants émettent une fluorescence variable, au début de

l'illumination; ce qui indique que, chez eux, la Photoréaction II fonctionne et que le premier accepteur d'électrons de celle-ci, Q, est présent et fonctionnel. Ces résultats ont été interprétés comme témoignant d'un blocage des transports d'électrons entre les deux photoréactions, au niveau du (ou des) oxydant(s) A (accepteur des électrons provenant de Q réduit) dont la quantité au début de l'illumination est normalement mesurée par le volume du jet d'O₂. Deux possibilités peuvent être envisagées, *a priori*: ou A manque parce que sa biosynthèse ne s'effectue pas; ou bien A est synthétisé mais n'est pas fonctionnel, la réduction de A par Q ne pouvant avoir lieu par suite, par exemple, d'un défaut de structure de l'appareil photosynthétique.

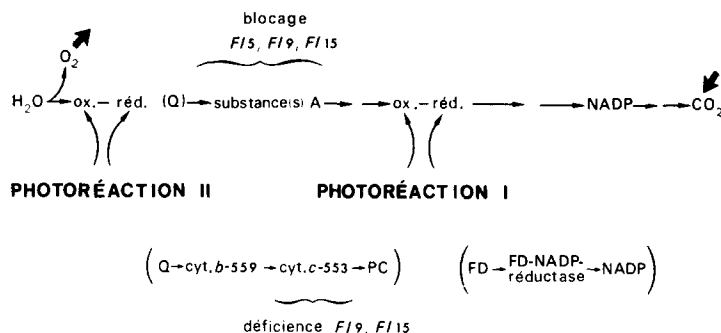


Fig. 7. Schéma simplifié du mécanisme de la photosynthèse. Dans la partie supérieure: schéma résumant l'intervention de deux réactions photochimiques couplées en série par une chaîne de transfert d'électrons. Une seule voie principale de transfert d'électrons est représentée; cependant des dérivations sont possibles, notamment dans la partie de la chaîne située entre les deux photoréactions. Dans la partie inférieure, entre parenthèses: séquence d'intervention des différents transporteurs d'électrons mis en évidence chez *C. reinhardtii* (d'après LEVINE⁷). Les flèches représentent des transferts d'électrons ou, pour O₂ et CO₂, des échanges gazeux. Les accolades indiquent les localisations présumées des anomalies, qui ont été constatées chez les mutants *Fl 5*, *Fl 9* et *Fl 15*. Abréviations: ox., oxydant; réd., réducteur; Q, premier accepteur d'électrons de la Photoréaction II (dont la réduction se traduit par un accroissement de la fluorescence chlorophyllienne); substance(s) A, accepteur(s) des électrons provenant de Q⁻ (A, à l'état oxydé, est normalement révélé par le jet d'O₂ au début de l'illumination); cyt., cytochrome; PC, plastocyanine; FD, ferrédoxine.

La séquence des différents transporteurs d'électrons, dont l'intervention dans la photosynthèse a été mise en évidence chez *C. reinhardtii*⁷ est indiquée sur la Fig. 7. La plastoquinone A joue aussi vraisemblablement un rôle, mais le site de son action n'est pas actuellement bien déterminé (voir revue¹). Les résultats d'analyses décrits plus haut (Tableaux I et II) indiquent que, en ce qui concerne la plastoquinone A, le cytochrome *c-553* soluble, la plastocyanine, la ferrédoxine et la ferrédoxine-NADP⁺-réductase, l'équipement de chacun des mutants est comparable à celui de la souche sauvage; de plus, le cytochrome *b-559*, insoluble, est présent dans chacune des quatre souches. Mais, si les souches *Fl 5* et sauvage possèdent la forme insoluble du cytochrome *c-553*, les mutants *Fl 9* et *Fl 15* apparaissent pratiquement dépourvus de cette forme liée de cytochrome. Cependant la biosynthèse du cytochrome *c-553* a lieu chez *Fl 9* et *Fl 15*: en effet du cytochrome *c-553* soluble a été extrait des cellules de ces mutants. Il semble donc possible, à première vue, que les mutants *Fl 9* et *Fl 15* soient affectés d'un défaut de structure de l'appareil photosynthétique, qui altérerait l'environnement moléculaire du cytochrome *c-553* au sein des lamelles lipoprotéiques.

La comparaison des deux types de résultats précédents pose le problème de la correspondance entre les transporteurs d'électrons identifiés par analyse biochimique, d'une part, et les entités cinétiques révélées par l'étude de phénomènes physiologiques, d'autre part. Dans le cas des mutants *Fl 9* et *Fl 15*, qui sont déficients en cytochrome *c*-553 lié et qui, par ailleurs, n'émettent pas de jet d' O_2 , trois hypothèses peuvent être faites. La première est que les substances A englobent la plus grande partie des transporteurs d'électrons qui interviennent entre les deux réactions photochimiques, au moins jusqu'au cytochrome *c*-553 inclus. Deux arguments, cependant, peuvent être opposés à cette interprétation: (1) d'une part, lors de la séparation physique des deux systèmes photochimiques de chloroplastes de plantes supérieures traités par le Triton X-100, les particules de type Système II, qui sont très appauvries en cytochrome *f* (équivalent du cytochrome *c*-553 des algues), conservent la capacité d'émettre un jet d' O_2 ; par contre, le cytochrome *f* demeure associé aux particules de type Système I, qui ne dégagent pas d' O_2 ²⁶. (2) Il a, d'autre part, été déterminé, avec des Chlorelles et avec des chloroplastes isolés, que la concentration de l'oxydant A est de l'ordre de 1 molécule d'A pour 50-70 molécules de chlorophylles *a + b* (réf. 35); dans le cas de *Chlamydomonas*, les résultats des mesures de jets d' O_2 , qui ont été effectuées avec des cellules sauvages cultivées sur milieu contenant de l'acétate, reflètent une concentration d'A moins élevée (1 A pour environ 200 chlorophylles). Or, même par rapport à cette dernière valeur, la concentration du cytochrome *c*-553 lié (1 molécule pour 500 molécules de chlorophylles) est nettement plus faible.

La seconde hypothèse consiste à supposer que déficience en cytochrome *c*-553 lié et absence d'émission de jet d' O_2 n'ont pas de relation directe de cause à effet, mais que ces deux anomalies témoignent d'un même défaut de structure de l'appareil photosynthétique. On peut envisager, par exemple, qu'un accroissement des distances entre molécules rende impossible le transport d'électrons entre Q et le cytochrome *b*-559; ou bien, encore, que des molécules de plastoquinone A, qui normalement interviendraient dans le transfert d'électrons, ne soient plus fonctionnelles par suite d'une altération de leur environnement moléculaire. Il y a, enfin, une troisième hypothèse selon laquelle les souches *Fl 9* et *Fl 15* auraient subi plusieurs mutations affectant l'appareil photosynthétique. Il n'y aurait alors aucune relation entre les deux anomalies constatées: la déficience en cytochrome *c*-553 lié serait la conséquence d'un défaut de structure, tandis que le blocage du transport d'électrons, dont témoigne l'absence d'émission de jet d' O_2 , pourrait résulter d'une déficience en un transporteur d'électrons inconnu intervenant entre les deux réactions photochimiques, au voisinage de la Photoréaction II. Seule une étude génétique des mutants permettrait de vérifier ou d'infirmer cette hypothèse. Cependant, on peut remarquer que, selon celle-ci, il faudrait que les mutants aient chacun subi au moins deux mutations et que les deux mutations de *Fl 9* soient analogues à celles de *Fl 15*, du moins en ce qui concerne leurs conséquences physiologiques. Or la probabilité pour qu'une telle coïncidence se produise est très faible.

Dans le cas du mutant *Fl 5*, qui possède tous les transporteurs d'électrons analysés ici, le blocage du transfert d'électrons entre les deux photoréactions pourrait également: soit être la conséquence d'une déficience en un transporteur inconnu, comme dans le cas présumé du mutant *ac-21* de *C. reinhardi* isolé et étudié par LEVINE⁷, soit être dû à un défaut de structure.

Les renseignements, que l'on possède actuellement sur les propriétés respectives

des trois mutants *Fl 5*, *Fl 9* et *Fl 15*, ne permettent pas de trancher catégoriquement parmi les diverses hypothèses qui viennent d'être faites. Toutefois, celle d'un défaut de structure, affectant à la fois le transfert d'électrons au voisinage de la Photoréaction II et le site d'action du cytochrome *c-553*, semble la plus probable dans le cas de *Fl 9* et dans celui de *Fl 15*.

En conclusion, cette étude a montré que chacun des mutants est capable de synthétiser tous les transporteurs d'électrons, qui ont été mis en évidence dans la souche sauvage. Mais il est probable qu'un défaut de structure, révélé par l'absence de cytochrome *c-553* lié, affecte l'appareil photosynthétique des mutants *Fl 9* et *Fl 15*. Le même défaut de structure pourrait être également responsable d'un blocage du transfert d'électrons au voisinage de la Photoréaction II, dont témoignent, par ailleurs, plusieurs anomalies physiologiques. Cependant, il n'est pas exclu que ces deux mutants puissent aussi manquer d'un transporteur d'électrons inconnu; chacun d'eux serait alors vraisemblablement affecté de plusieurs mutations. Dans le cas du mutant *Fl 5*, il est également possible que les anomalies de fonctionnement du mécanisme photosynthétique, qui ont été observées, soient les conséquences soit d'un défaut de structure, soit d'une déficience en un transporteur d'électrons non identifié. En outre, il a été constaté que les teneurs de la souche sauvage en cytochromes *b-559* et *c-553* liés, rapportées aux chlorophylles, sont comparables respectivement aux teneurs en cytochromes *b* et *f* des chloroplastes de plantes supérieures. Des recherches complémentaires sont entreprises, pour déterminer avec plus de précision la nature du (ou des) blocage(s) de chacun des mutants.

RÉSUMÉ

Des analyses biochimiques et spectroscopiques sont effectuées, afin d'examiner l'équipement en transporteurs d'électrons de trois mutants non photosynthétiques (*Fl 5*, *Fl 9* et *Fl 15*) de *Chlamydomonas reinhardtii*. Ces mutants présentent plusieurs anomalies physiologiques, qui témoignent d'un blocage du transfert interne d'électrons, au voisinage de la Photoréaction II.

Les quinones, d'une part, et les protéines solubles, d'autre part, sont analysées par chromatographie. Les résidus cellulaires insolubles sont examinés par spectrophotométrie de différence, à 20° et à -190°.

Les teneurs de chacun des mutants en plastoquinone A, cytochrome *c-553* soluble, plastocyanine, ferrédoxine et ferrédoxine-NADP⁺-réductase, sont comparables à celles de la souche sauvage; de plus, le cytochrome *b-559*, insoluble, est présent dans les quatre souches. Le mutant *Fl 5* et la souche sauvage possèdent la forme insoluble du cytochrome *c-553*, en quantités appréciables; par contre, les mutants *Fl 9* et *Fl 15* ne présentent que des traces de cette forme liée de cytochrome.

La souche sauvage renferme environ 1 molécule de cytochrome *b-559* pour 130 molécules de chlorophylles (*a+b*), et 1 molécule de cytochrome *c-553* lié pour 500 molécules de chlorophylles.

Il semble probable qu'un défaut de structure affecte l'appareil photosynthétique de chacun des mutants, la nature de ce défaut pouvant être différente pour *Fl 9* et *Fl 15*, d'une part, et pour *Fl 5*, d'autre part. Toutefois, la possibilité d'une déficience des mutants en un transporteur d'électrons inconnu n'est pas exclue.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient sincèrement Madame F. Jouanneau et Madame A. Trouabal pour l'aide qu'elles leur ont apportée au cours de ce travail.

RÉFÉRENCES

- 1 Y. DE KOUCHKOVSKY, *Bull. Soc. Franç. Physiol. Végétale*, 14 (1968) 409.
- 2 J. GARNIER, *Physiol. Végétale*, 3 (1965) 121.
- 3 N. I. BISHOP, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 17 (1966) 185.
- 4 R. P. LEVINE, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 20 (1969) 523.
- 5 J. GARNIER, Y. DE KOUCHKOVSKY ET J. LAVOREL, *Compt. Rend.*, 162 (1968) 365.
- 6 Y. DE KOUCHKOVSKY, dans H. METZNER, *Progress in Photosynthesis Research*, Vol. 2, Metzner, Tübingen, 1969, p. 959.
- 7 R. P. LEVINE, *Science*, 162 (1968) 768.
- 8 D. S. GORMAN ET R. P. LEVINE, *Plant Physiol.*, 41 (1966) 1648.
- 9 D. S. GORMAN ET R. P. LEVINE, *Plant Physiol.*, 41 (1966) 1643.
- 10 J. GARNIER, *Compt. Rend. Sér. D*, 265 (1967) 874.
- 11 D. S. GORMAN ET R. P. LEVINE, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 54 (1965) 1665.
- 12 G. MACKINNEY, *J. Biol. Chem.*, 140 (1941) 315.
- 13 D. I. ARNON, *Plant Physiol.*, 24 (1949) 1.
- 14 R. POWLS ET E. R. REDFEARN, *Biochem. J.*, 104 (1967) 24c.
- 15 M. D. HENNINGER, R. BARR ET F. L. CRANE, *Plant Physiol.*, 41 (1966) 696.
- 16 R. BARR, M. D. HENNINGER ET F. L. CRANE, *Plant Physiol.*, 42 (1967) 1246.
- 17 A. M. PUMPHREY ET E. R. REDFEARN, *Biochem. J.*, 76 (1960) 61.
- 18 J. MAROC, H. DE KLERK ET M. D. KAMEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 162 (1968) 621.
- 19 D. S. GORMAN ET R. P. LEVINE, *Plant Physiol.*, 41 (1966) 1637.
- 20 N. H. CHUA ET R. P. LEVINE, *Plant Physiol.*, 44 (1969) 1.
- 21 A. T. JAGENDORF, dans S. P. COLOWICK ET N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, Vol., 6 Academic Press, New York, 1963, p. 430.
- 22 S. KATOH, I. SHIRATORI ET A. TAKAMIYA, *J. Biochem.*, 51 (1962) 32.
- 23 K. SHIBATA, A. A. BENSON ET M. CALVIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 15 (1954) 461.
- 24 H. LUNDEGÅRDH, *Physiol. Plantarum*, 15 (1962) 390.
- 25 N. K. BOARDMAN ET J. M. ANDERSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 143 (1967) 187.
- 26 J.-M. BRIANTAIS, *Physiol. Végétale*, 7 (1969) 135.
- 27 F. L. CRANE ET M. D. HENNINGER, *Vitamins Hormones*, 24 (1966) 489.
- 28 F. L. CRANE, *Plant Physiol.*, 34 (1959) 128.
- 29 H. DAM, *Vitamins Hormones*, 24 (1966) 295.
- 30 E. R. REDFEARN, *Vitamins Hormones*, 24 (1966) 465.
- 31 E. SUN, R. BARR ET F. L. CRANE, *Plant Physiol.*, 43 (1968) 1935.
- 32 R. M. SMILLIE ET R. P. LEVINE, *J. Biol. Chem.*, 238 (1963) 4058.
- 33 R. HILL ET W. D. BONNER, JR., dans W. D. McELROY ET B. GLASS, *Light and Life*, Johns Hopkins Press, Baltimore, 1961, p. 424.
- 34 R. P. LEVINE ET D. S. GORMAN, *Plant Physiol.*, 41 (1966) 1293.
- 35 Y. DE KOUCHKOVSKY ET P. JOLIOT, *Photochem. Photobiol.*, 6 (1967) 567.