

ACADÉMIE ROYALE DE BELGIQUE

**BULLETIN
DE LA CLASSE
DES SCIENCES**

5^e série - Tome LXIII
1977-2

EXTRAIT

**La réduction de la protochlorophyllide en chlorophyllide;
la théorie des relations entre transfert d'énergie,
émission de fluorescence à 688 nm et réduction**

par M. BROUERS et C. SIRONVAL

Laboratoire de Photobiologie et Laboratoire de ~~de~~ Systématique Biochimique,
Département de Botanique, Université de Liège, Sart-Tilman,
B4000 Liège, Belgique



BRUXELLES - PALAIS DES ACADÉMIES

**La réduction de la protochlorophyllide en chlorophyllide;
la théorie des relations entre transfert d'énergie,
émission de fluorescence à 688 nm et réduction**

par M. BROUERS et C. SIRONVAL

Laboratoire de Photobiologie et Laboratoire de Systématique Biochimique,
Département de Botanique, Université de Liège, Sart-Tilman,
B4000 Liège, Belgique

Résumé. — Les auteurs déduisent théoriquement des relations entre l'efficacité du transfert d'énergie, l'intensité de l'émission de fluorescence à 688 nm et le degré de réduction, pendant la réduction de la protochlorophyll(id)e en chlorophyll(id)e dans la feuille étiolée. À cet effet, ils introduisent les paramètres (e), (i) et (c) qui représentent respectivement les proportions d'énergie transférée, de lumière émise à 688 nm et de pigment réduit. La théorie prédit correctement les faits observés expérimentalement. Elle revêt un caractère statistique et ne concerne pas les événements microscopiques inclus dans le mécanisme même de la réduction.

1. INTRODUCTION

1.1 La théorie décrit des relations entre des événements observables lors de la réduction de la protochlorophyll(id)e, P, en chlorophyll(id)e, C, dans une feuille étiolée, — ou dans des homogénats d'une telle feuille, — pendant un éclaircissement de courte durée ($t \leq 1$ sec.). Elle manipule des statistiques portant sur un grand nombre de molécules. L'état de réduction du pigment, l'intensité de l'émission de fluorescence à 688 nm et le transfert de l'énergie de la protochlorophyll(id)e à la chlorophyll(id)e y apparaissent sous la forme de proportions (sans dimension).

La théorie ne concerne pas la description des événements microscopiques individuels à l'échelle de chaque molécule.

La réduction de la protochlorophyllide en chlorophyllide

Les données suivantes, observables lors d'un premier éclaircissement, suffisamment court, sont considérées comme vraies:

1.2. De l'énergie est transférée à partir de molécules de protochlorophyll(id)e excitées par la lumière, P^* , vers des molécules de chlorophyll(id)e, C (KAHN, BOARDMAN et THORNE, 1970; BROUERS, KUIPER et SIRONVAL, 1972; BROUERS et SIRONVAL, 1974).

1.3. Entre la proportion (c) des molécules de chlorophyll(id)e, C , et la proportion (i') de la fluorescence émise à 688 nm, il existe une relation de la forme:

$$(A - i')c = Ki' \quad (1)$$

où A et K sont des constantes telles que:

$$A - 1 = K \quad (2)$$

(SIRONVAL et KUYPER, 1972; voir l'appendice 2).

1.4. La loi de la désactivation de la protochlorophyll(id)e excitée par la lumière, P^* , est exprimée par l'égalité:

$$\frac{dP^*}{dt} = k_t[P^*][C] + k_p[P^*] + (k_1 + k_2 \dots + k_n)[P^*]$$

où $[P^*]$ et $[C]$ sont respectivement les concentrations en protochlorophyll(id)e excitée et en chlorophyll(id)e, k_t la constante de vitesse correspondant au transfert de l'énergie d'excitation de la protochlorophyll(id)e vers la chlorophyll(id)e, k_p la constante de vitesse de la réduction de la protochlorophyll(id)e excitée en chlorophyll(id)e, et k_1, k_2, \dots, k_n , les constantes de vitesse de la désactivation de la protochlorophyll(id)e excitée par les voies 1, 2, ... n , à l'exclusion du transfert d'énergie et de la réduction (NIELSEN et KAHN, 1973; VAUGHAN et SAUER, 1974; voir Appendice 1).

Pour distinguer la désactivation par transfert d'énergie des autres désactivations, nous écrivons en abrégé:

$$\frac{d[P^*]}{dt} = k_t[P^*][C] + k[P^*] \quad (3)$$

où $k = k_p + k_1 + k_2 + \dots + k_n$.

1.5. La théorie des relations cinétiques montre que les données (1.2), (1.3) et (1.4) forment un tout cohérent.

2. DÉFINITIONS

2.1. Molécules photoréductibles. — Un volume unitaire étioilé, — de feuille ou d'homogénat, — qui n'a jamais reçu de lumière, contient N molécules photoréductibles de pigment. Seules ces molécules réductibles sont prises en considération. À un instant t donné de l'éclairement, elles sont, soit non-réduites (protochlorophyll(id)e), soit réduites (chlorophyll(id)e). Par protochlorophyll(id)e (chlorophyll(id)e), on entend l'ensemble des pigments qui sont le substrat (produit) de la photoréduction.

2.2. La proportion (c). — À un instant t donné de l'éclairement, la concentration $[C]$ en chlorophyll(id)e, — exprimée en mg par unité de poids frais de matériel étioilé —, est liée à la proportion (c) en chlorophyll(id)e dans l'ensemble des molécules (photoréductibles + photoréduites), — exprimée en mg par mg de pigment —, par l'égalité: $[C] = \gamma c$, où γ est la somme de la concentration $[P]$ de la protochlorophyll(id)e (réductible) plus la concentration $[C]$ de la chlorophyll(id)e. La concentration $[P]$ en protochlorophyll(id)e (réductible) est au même instant:

$$[P] = \gamma(1 - c).$$

2.3. Les proportions (i) et (e). — (i) est la proportion des molécules qui, dans l'ensemble des molécules de pigment et à un instant t donné de l'éclairement, contribuent à la fluorescence émise à 688 nm. La proportion (i) comporte deux parts:

I. La proportion (c) des molécules de chlorophyll(id)e dans l'ensemble des (protochlorophyll(id)es + chlorophyll(id)es);

II. La proportion (e) des molécules qui, parmi les molécules (réductibles) de protochlorophyll(id)e, transfèrent de l'énergie d'excitation vers des molécules de chlorophyll(id)e.

3. RELATIONS ENTRE LES PROPORTIONS (c), (i) ET (e)

3.1. Par définition, la proportion (i) s'écrit:

$$i = (1 - c)e + c$$

ce qui implique l'expression pour (c):

$$c = \frac{i - e}{1 - e} \quad (4)$$

3.2. La proportion (e) des molécules qui, parmi les molécules de protochlorophyll(id)e, transfèrent de l'énergie vers des molécules de chlorophyll(id)e est dérivable de l'égalité (3). Elle est égale au rapport de la vitesse de la désactivation de la protochlorophyll(id)e excitée, P^* , par transfert, à la somme des vitesses de désactivation de P^* par toutes les voies possibles, y compris le transfert; soit:

$$e = \frac{k_t[P^*][C]}{k_t[P^*][C] + k[P^*]}$$

(cf. VAUGHAN et SAUER, 1974 et Appendice 2).

Après substitution de la proportion (c) à la concentration $[C]$, ceci s'écrit:

$$e = \frac{k_t c}{k_t c + k'} \quad \text{où} \quad k' = \frac{k}{\gamma}$$

De cette manière, on trouve une seconde expression pour (c):

$$c = \frac{k'}{k_t} \cdot \frac{e}{1 - e} \quad (5)$$

3.3. La comparaison des expressions (4) et (5) pour (c) permet d'écrire (e) en terme de (i):

$$\frac{i}{e} = \frac{k'}{k_t} + 1 = \beta \quad (6)$$

Selon (6), il y a un rapport constant (β) entre la proportion (i) de molécules qui participent à l'émission de fluorescence à 688 nm d'une part, et la proportion (e) des molécules qui transfèrent de l'énergie à la

chlorophyll(id)e d'autre part. En introduisant (6) dans (4), on obtient (c) en fonction de (i):

$$c = \frac{(\beta - 1)i}{\beta - i} \quad (7)$$

4. VÉRIFICATIONS EXPÉRIMENTALES

4.1. L'expression (7) est identique à la relation (1) si:

$$\begin{aligned} \beta &= A, \\ \beta - 1 &= K, \\ i &= i'. \end{aligned} \quad (8)$$

Dans ce cas, la constante (A) de la relation (1) est l'inverse du rapport de la constante de vitesse de la désactivation de P^* par transfert, à la somme des constantes de vitesses de désactivation par toutes les voies possibles, y compris le transfert, k' étant égal à $\frac{k}{\gamma}$.

4.2. (8) implique: $A - K = 1$. Cette conséquence est vérifiée avec une bonne approximation, par les mesures de SIRONVAL et KUIPER (1972), réalisées sur des feuilles fraîches de haricot, qui aboutissent à la relation (1). Dès lors, (i) est mesuré par (i').

Le travail de SIRONVAL et KUIPER (1972) mesure (i') en évaluant la proportion de fluorescence émise par la feuille à 688 nm lorsqu'elle est plongée à l'état frais dans l'azote liquide au terme d'une illumination de courte durée à une température connue, par exemple la température ordinaire (voir l'Appendice 2). Le travail ne mesure pas (e).

À température ordinaire (23 °C environ), (A) vaut 1,13, de sorte que, dans la feuille fraîche de haricot:

$$e = 0,88 i; A = 1.13.$$

4.3. Le travail de VAUGHAN et SAUER (1974) est effectué sur des homogénats. Il donne des valeurs théoriques et expérimentales de (e); il fournit aussi les valeurs correspondantes de (c) (voir l'Appendice 3). Mais il ne donne pas (i).

En se servant de (6) et de (8), on peut introduire la constante (K) de la relation (1) dans (5), qui devient :

$$c = K \frac{e}{1 - e}$$

La forme linéarisée de cette expression est :

$$\frac{e}{c} = \frac{1}{K} - \frac{e}{K} \quad (9)$$

La figure 1 reprend les données du tableau I du travail de VAUGHAN et SAUER. Elle montre que (9) est raisonnablement respecté dans des homogénats éclairés à la température ordinaire; ceci justifie la définition de (e).

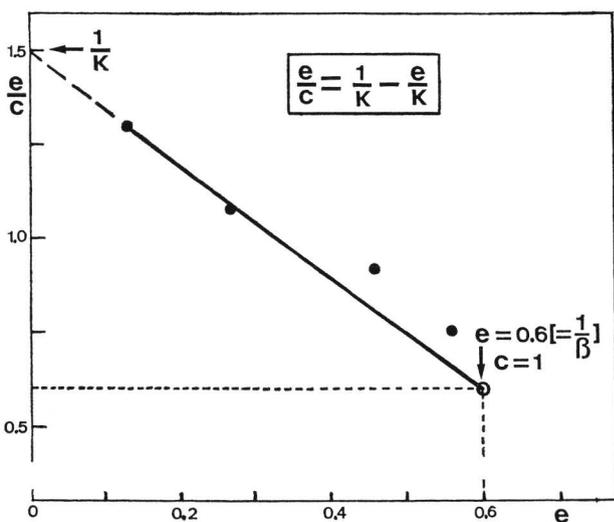


FIG. 1. — Représentation linéaire de la relation entre (e) et (c). La ligne noire continue correspond aux valeurs théoriques de VAUGHAN et SAUER (Tableau I; 1974); les points noirs sont leurs données expérimentales. Lorsque (c) = (i) = 1, (e) est égal à $\left(\frac{1}{\beta}\right)$ (égalité 6).

On tire de la figure que $\frac{1}{K} = 1,5$. La valeur de (β) est calculée en appliquant la relation (8); on trouve (β) = 1,67. On estime également

$\left(\frac{1}{\beta}\right)$ graphiquement comme indiqué sur la figure 1. On trouve ainsi que, dans l'homogénat de VAUGHAN et SAUER, à température ordinaire:

$$e = 0,60 \text{ ; } A = 1,67.$$

5. REMARQUE

Remplaçons la théorie I présentée en 2 et 3 par une théorie II en substituant à la proportion (i) des molécules qui contribuent à la fluorescence émise à 688 nm (définition 2.3) la proportion (i') de la fluorescence émise à 688 nm. Conservant la définition 2.2 et 2.3 de (c) et de (e), (i') est donné par:

$$i' = \alpha(1 - c)e + c$$

où α est le rapport du coefficient d'absorption de la protochlorophyll(id)e à celui de la chlorophyll(id)e à la longueur d'onde utilisée pour l'excitation de la fluorescence. Dans la théorie II, les expressions (4), (6) et (7) de la théorie I deviennent:

$$c = \frac{i' - \alpha e}{1 - \alpha e} \quad (4')$$

$$\frac{i'}{e} = \frac{k'}{k_t} \cdot \frac{1 - \alpha e}{1 - e} + \alpha = \beta' \quad (6')$$

$$c = \frac{(\beta' - \alpha)i'}{\beta' - \alpha i'} \quad (7')$$

L'expression (7') est identique à la relation empirique (1) si

$$\beta' = A$$

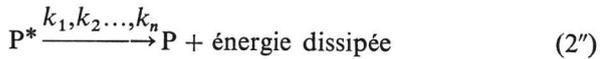
$$\beta' - \alpha = K$$

$$\alpha = 1$$

L'expérience qui mesure (i') et (c) montre que $A - K = 1$ (cf. SIRONVAL et KUYPER, 1972, et fig. 1 reprenant les données de VAUGHAN et SAUER, 1974). C'est ce qui fonde la théorie I.

APPENDICES

1. NIELSEN et KAHN (1973) ont proposé trois types de désactivation des protochlorophyll(id)es excitées par la lumière (P^*):



(1'') est la réaction de réduction produisant la chlorophyll(id)e.

(2'') rend compte des désactivations de P^* correspondant à une dissipation de l'énergie d'activation, selon des voies: 1, 2, ... n .

(3'') décrit un transfert d'énergie des molécules de protochlorophyll(id)e excitées vers des molécules de chlorophyll(id)e. Si on accepte ces types de désactivation pour P^* , la loi de la vitesse de la désactivation est celle indiquée dans le paragraphe 1.4 (voir VAUGHAN et SAUER, 1974).

2. Dans le travail de SIRONVAL et KUIPER (1972), (i') est mesuré par le rapport de l'intensité (I_p^{688}) de la fluorescence émise à 688 nm par une feuille lors d'un éclairage p non saturant, à l'intensité (I_∞^{688}) de cette fluorescence après un éclairage qui sature la transformation du spectre d'émission:

$$i' = \frac{I_p^{688}}{I_\infty^{688}} \quad (4'')$$

(I^{688}) est mesuré dans l'azote liquide, la lumière d'excitation provenant de la raie 436 nm d'une lampe à vapeur de mercure; la feuille tombe dans l'azote liquide au terme d'un éclairage de courte durée ($t \leq 1$ sec).

Il est montré que, dans les conditions expérimentales mises en œuvre, (I^{688}) est proportionnel à la quantité d'un complexe macromoléculaire, — le complexe $P_{688-676}$ —, formé à la lumière. Ce complexe est défini comme une entité, — l'unité de transfert d'énergie —, contenant en mélange des molécules de protochlorophyll(id)e et de chloro-

phyll(id)e qui contribuent ensemble à l'émission à 688 nm, — la protochlorophyll(id)e transférant de l'énergie à la chlorophyll(id)e —. Une entité $P_{688-676}$ moyenne comporte un nombre (n) de molécules de pigments et apporte une contribution invariable, définie, à l'émission à 688 nm dans les conditions choisies.

Il en résulte que i' , défini par (4''), est équivalent à la proportion (i) des pigments (protochlorophyll(id)e + chlorophyll(id)e) qui, après un éclairage p donné, sont inclus dans des unités de transfert d'énergie $P_{688-676}$, dans l'ensemble des pigments foliaires susceptibles de faire partie de ces unités (c'est-à-dire dans l'ensemble des pigments « spectralement phototransformables »). C'est la proportion des pigments qui contribuent à l'émission de fluorescence à 688 nm après un éclairage donné. Les auteurs montrent que la relation (1) du paragraphe 1.3 représente raisonnablement les rapports entre (i') et la proportion (c) de chlorophyll(id)e parmi les pigments photoréductibles de la feuille (voir aussi à ce sujet: SIRONVAL, 1972).

3. Reprenant une suggestion de THORNE et BOARDMAN (1972) et de NIELSEN et KAHN (1973), selon laquelle la probabilité du transfert d'énergie de la protochlorophyll(id)e à la chlorophyll(id)e dépend linéairement de la concentration en chlorophyll(id)e, VAUGHAN et SAUER (1974) expriment l'efficacité (E) du transfert d'énergie comme une proportion de la désactivation de la protochlorophyll(id)e:

$$E = \frac{k_t[P^*][C]}{k_t[P^*][C] + k[P^*]} \quad (5'')$$

où les symboles ont les significations données au paragraphe 1.4. (E) est la proportion des molécules de protochlorophyll(id)e excitées qui se désactivent par transfert. Comme la concentration $[P^*]$ de la protochlorophyll(id)e excitée est une certaine fraction de la concentration totale $[P]$ en protochlorophyll(id)e réductible, (E) est aussi la proportion des molécules de protochlorophyll(id)e qui se désactivent par transfert d'énergie dans l'ensemble des molécules de protochlorophyll(id)e réductible. Nous appelons (e) cette proportion (paragraphe 2.3).

VAUGHAN et SAUER mesurent (E), ainsi que les concentrations en protochlorophyll(id)e et en chlorophyll(id)e; seuls les pigments photoréductibles sont pris en considération. Ils montrent que (5'') est à peu près conforme à l'expérience (voir figure 1).

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les Dr. G. AKOYOUNGLOU d'Athènes et K. SAUER de Berkeley pour la discussion de ce travail. Ils remercient également le Fonds National de la Recherche Scientifique (Bruxelles) pour son soutien financier.

RÉFÉRENCES

- BROUERS, M., KUIPER, Y. and SIRONVAL, C. The reduction of protochlorophyllide into chlorophyllide. V. Demonstration of energy transfer inside the P₆₈₈₋₆₇₆ molecular units. *Photosynthetica* 6: 169-176, 1972.
- BROUERS, M. and SIRONVAL, C. Evidence for energy transfer from protochlorophyllide to chlorophyllide in leaves treated with δ -aminolevulinic acid. *Plant Sc. Let.* 2: 67-72, 1974.
- KAHN, A., BOARDMAN, N.K. and THORNE, S.W. Energy transfer between protochlorophyllide molecules: Evidence for multiple chromophores in the photoactive protochlorophyllide-protein complex *in vivo* and *in vitro*. *J. Mol. Biol.* 48: 85-101, 1970.
- NIELSEN, O.F. and KAHN, A. Kinetics and quantum yield of photoconversion of protochlorophyll(ide) to chlorophyll(ide) a. *Biochim. Biophys. Acta* 292: 117-129, 1973.
- SIRONVAL, C. and KUIPER, Y. The reduction of protochlorophyllide into chlorophyllide. IV. The nature of the intermediate ₆₈₈₋₆₇₆ species. *Photosynthetica* 6: 254-275, 1972.
- SIRONVAL, C. The reduction of protochlorophyllide into chlorophyllide. VI. Calculation of the size of the transfer unit and the initial quantum yield of the reduction *in vivo*. *Photosynthetica* 6: 375-380, 1972.
- THORNE, S.W., BOARDMAN, N.K. The kinetics of photoconversion of protochlorophyllide in etiolated bean leaves. *Biochim. Biophys. Acta* 267: 104-110, 1972.
- VAUGHAN, G.D., SAUER, K. Energy transfer from protochlorophyllide during photoconversion of etiolated bean holochrome. *Biochim. Biophys. Acta* 374: 383-394, 1974.

