

## Effet de la fréquence d'éclairs de faible intensité sur les caractères des changements spectraux produits dans une feuille étiolée

JEAN-MARIE MICHEL et CYRILLE SIRONVAL

Laboratoire de Photobiologie, Département de Botanique,  
Université de Liège, Sart-Tilman, 4000 Liège, Belgique

(Manuscrit reçu le 24 novembre 1972)

### RÉSUMÉ

Lorsqu'on soumet une feuille étiolée de Haricot à un régime d'éclairs répétés de faible énergie ( $6,17 \cdot 10^3$  ergs.cm<sup>-2</sup> par éclair au niveau de la feuille) et de courte durée (130 μsec à mi-hauteur du pic), les caractères des changements spectraux observés (absorption et fluorescence à 77°K) dépendent de la fréquence des éclairs. A des fréquences supérieures à 0,2 Hz, le maximum de l'émission de fluorescence à basse température est situé à 690-693 nm (absorption autour de 682 nm), tandis qu'à des fréquences inférieures à 0,1 Hz il se trouve à 680-685 nm (absorption autour de 668 nm). Lorsque les fréquences sont intermédiaires, la réponse varie de feuille à feuille dans un lot déterminé. L'effet observé ne dépend apparemment pas de la durée du traitement par éclairs répétés, si le nombre d'éclairs reçus par la feuille reste inférieur ou égal à 200.

### SUMMARY

When an etiolated bean leaf is illuminated with a regime of repetitive light flashes of low energy ( $6.17 \cdot 10^3$  ergs.cm<sup>-2</sup> per flash at the level of the leaf) and short duration (130 μsec at half-width) the characters of the spectral changes one can observe (absorption and fluorescence emission at 77 °K) are dependent on the frequency of the flashes. At frequencies above 0.2 Hz, the maximum of the fluorescence emission at low temperature is located at 690-693 nm (absorption maximum around 682 nm), whereas at frequencies below 0.1 Hz the maximum of fluorescence lies at 680-682 nm (absorption around 668 nm). For intermediary frequencies the response varies from leaf to leaf within a given set. The observed effect apparently does not depend on the duration of the treatment with repetitive flashes if the number of flashes does not exceed or is equal to 200.

## INTRODUCTION

Les recherches récentes de GASSMAN et *al.* (1968), KAHN et *al.* (1970), SIRONVAL et *al.* (1968) ont établi que la réduction *in vivo* de la protochlorophylle (-ide) en chlorophylle (-ide) s'effectue en plusieurs étapes (SIRONVAL et KUYPER, 1972). L'expérimentation à l'aide d'éclairs ayant une durée de l'ordre de la milliseconde, sur des feuilles de haricots étiolés, a permis d'étudier ces étapes. Il a été notamment montré que le premier produit formé *in vivo*, à la lumière et en un temps inférieur à la seconde, émet à 688 nm et absorbe à 676 nm ( $P_{688-676}$ ). Ce produit se transforme à l'obscurité selon le degré d'avancement de la réaction lumineuse, soit en un produit émettant à 675 nm et absorbant à 668 nm (la transformation dure alors quelques minutes à la température ordinaire, LITVIN et BYELYAEVA, 1971), soit en un produit émettant à 694 nm et absorbant à 682-684 nm (la transformation est complète en 30 secondes à la température ordinaire, SIRONVAL et MICHEL, 1967; GASSMAN et *al.*, 1968).

Nous résumons dans cette note préliminaire quelques faits observés récemment. Ils permettent d'affirmer que la fréquence d'éclairs de courte durée et de faible intensité détermine directement ou indirectement certains caractères des déplacements spectraux se produisant dans une feuille étiolée qui les reçoit en nombre limité (de l'ordre de 200). Il s'agit d'éclairs tels qu'après 200 éclairs, le pourcentage de pigment réduit est de l'ordre de 25 %.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Des graines de *Phaseolus vulgaris* L., var. Commodore, sont semées sur vermiculite et cultivées à l'obscurité totale suivant SIRONVAL et *al.* (1968). Les feuilles primordiales sont coupées au 14<sup>e</sup> ou au 17<sup>e</sup> jour après le semis. La cueillette a lieu 15 à 30 min avant le début de l'expérience.

Les feuilles sont disposées dans le noir sur les portoirs en laiton décrits dans SIRONVAL et BROUERS (1970). Elles sont exposées à une série d'éclairs de lumière blanche. La température est fixée à + 24 °C pendant l'irradiation. Chaque éclair a une durée de 130 microsecondes au dixième de la hauteur. La fréquence de la répétition des éclairs est fixée à l'aide d'un générateur d'impulsion pilotant l'étage alimentant en T.H.T. l'électrode d'amorçage du tube.

Un tube à décharge General Electric type FT 230 constitue la source des éclairs. Ceux-ci sont obtenus en déchargeant, à travers le tube, un condensateur de 0,5  $\mu$ F chargé à 2 500 V.

Le tube à décharge est situé au centre d'un montage circulaire qui supporte vingt portoirs de feuille placés à 10 cm de l'arc; vingt feuilles sont ainsi éclairées de la même manière et simultanément. L'énergie lumineuse intégrée sur la durée d'un éclair est de  $6,17 \times 10^3$  ergs.cm<sup>2</sup> au niveau des feuilles. Un dispositif électromagnétique fait tomber les portoirs dans des vases de Dewar remplis d'azote liquide; la chute a lieu immédiatement après le dernier éclair d'une série prédéterminée. Les vases sont placés sous les portoirs une minute environ avant le dernier éclair prévu.



Les spectres de fluorescence des feuilles sont mesurés à la température de l'azote liquide à l'aide du spectrofluorimètre décrit par SIRONVAL *et al.* (1968). Une lampe à vapeur de mercure équipée d'un filtre isolant la raie à 436 nm fournit la lumière d'excitation.

Les spectres d'absorption sont enregistrés à la température de l'azote liquide à l'aide d'un spectrophotomètre Cary 14. Un verre diffusant est intercalé sur le trajet du faisceau témoin, de manière à ajuster la ligne de base au-delà de 700 nm.

## RÉSULTATS

### 1. — Dépendance du changement spectral produit par des éclairs à l'égard de la durée de la période obscure entre éclairs.

La figure 1 montre en (A) les spectres d'émission et d'absorption à  $-196^{\circ}\text{C}$  d'une feuille, étiolée au départ, qui a reçu 200 éclairs successifs tels que l'éclair ( $n + 1$ ) était séparé de l'éclair ( $n$ ) par une période d'obscurité de 1 seconde. Elle compare ces spectres à ceux (B) d'une autre feuille, étiolée au départ, ayant reçu de même 200 éclairs identiques aux précédents, mais tels que l'éclair ( $n + 1$ ) était séparé de l'éclair ( $n$ ) par une période d'obscurité de 15 secondes. Les spectres (A) et (B) diffèrent par la position des bandes principales d'émission et d'absorption dans le rouge formées sous l'action des éclairs répétés à partir du complexe protochlorophyllide-lipoprotéine  $P_{657-647}$  initial. Les spectres diffèrent aussi par l'intensité de l'émission à 630 nm ; cette dernière est relativement plus intense en (A) qu'en (B) en comparaison des émissions à 693 nm en (A) et à 682 nm en (B). Par ailleurs, l'absorbance à 682 nm en (A) est à peine égale à l'absorbance à 650 nm, tandis qu'en (B) l'absorbance à 668 nm est plus élevée que l'absorbance à 650 nm. Ces caractères se reproduisent de feuille à feuille. Tant en (A) qu'en (B), la comparaison des spectres d'émission avec les spectres d'absorption suggère un transfert d'énergie de la protochlorophylle (-ide) à la chlorophylle (-ide) puisqu'on observe principalement une fluorescence due à la chlorophylle (-ide) (à 682 et 693 nm) et presque pas de fluorescence due à la protochlorophylle (-ide) (à 630 et 650 nm) alors que les spectres d'absorption montrent que la grandeur de l'absorption des deux pigments est du même ordre.

La différence entre les spectres (A) et (B) ne dépend pas de la durée totale du temps séparant le premier éclair du moment où, immédiatement après le 200<sup>e</sup>, la feuille est plongée dans l'azote liquide : 200 secondes en (A) ; 3 000 secondes en (B). La figure 2 prouve en effet que 150 éclairs donnés à 5 secondes d'intervalle ( $f = 0,2$  Hz) produisent une émission principale localisée entre 690 et 694 nm, semblable à celle du spectre (A) (fig. 1), tandis que 50 éclairs donnés à 15 secondes d'intervalle ( $f = 0,066$  Hz) produisent une émission localisée entre 675 et 678 nm, semblable à celle du spectre (B) (fig. 1), pour une même durée totale du traitement par les éclairs : 750 secondes dans les deux cas. La figure 2 montre encore que dès le 50<sup>e</sup> éclair, la localisation des bandes est déterminée par la durée de la période obscure. On observe un faible déplacement vers les plus grandes longueurs d'onde du 50<sup>e</sup> au 150-200<sup>e</sup> éclair, indépendamment de la fréquence des éclairs (675  $\rightarrow$  682 nm pour les intervalles de 15 secondes ; 688  $\rightarrow$  693 nm pour les intervalles de 5 secondes entre éclairs).

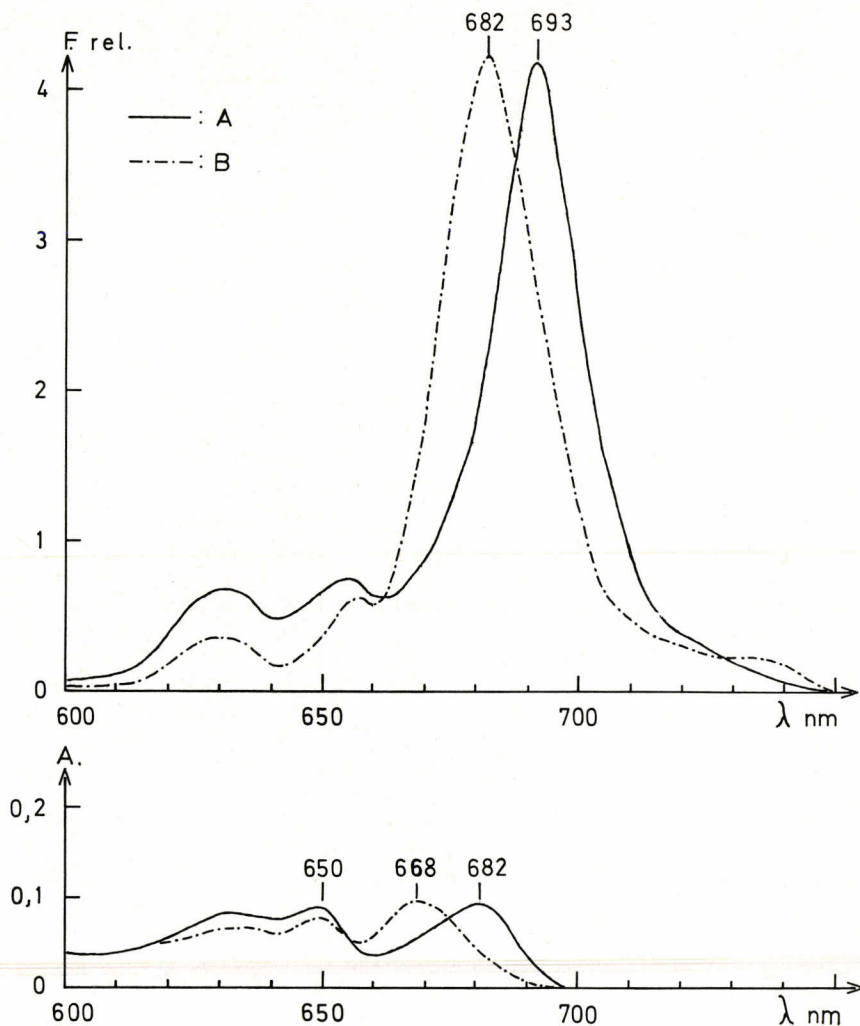


FIG. 1. — Spectres d'absorption (en bas) et de fluorescence à 77 °K (en haut) de deux feuilles primordiales de haricots, étiolées et de même âge, ayant reçu 200 éclairs, l'une à la fréquence de 1 Hz (A = —) et l'autre à la fréquence de 0,066 Hz (B = - - - -). Les émissions ont été normalisées à la même valeur à leur maximum (à 693 nm, courbe A et à 682 nm, courbe B).

**2. — Effet de 200 éclairs successifs séparés par une période obscure inférieure à 5 secondes ( $f = 0,2$  Hz) ou supérieure à 10 secondes ( $f = 0,1$  Hz).**

Lorsque l'intervalle obscur entre éclairs est inférieur à 5 secondes, et au moins jusqu'à 1 seconde, la bande principale de la fluorescence de toutes les feuilles sans exception se situe après 200 éclairs à une longueur d'onde supé-



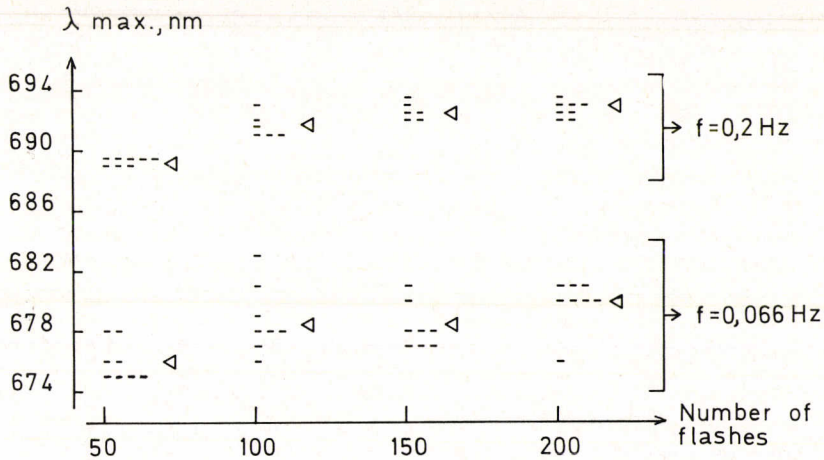


FIG. 2. — Position du maximum de l'émission de fluorescence à 77 °K trouvé chez des feuilles primordiales étiolées de haricot ayant reçu un nombre donné d'éclairs répétés, soit à la fréquence de 0,066 Hz, soit à la fréquence de 0,2 Hz. En ordonnée, la position du maximum de l'émission de fluorescence. En abscisse, le nombre d'éclairs répétés reçus. Chaque trait représente la position du maximum observé chez une feuille qui a reçu 50, 100, 150 ou 200 éclairs répétés. Le triangle dessiné à droite de chaque série de 6 ou 8 traits représente la valeur moyenne de la position du maximum dans la série considérée.

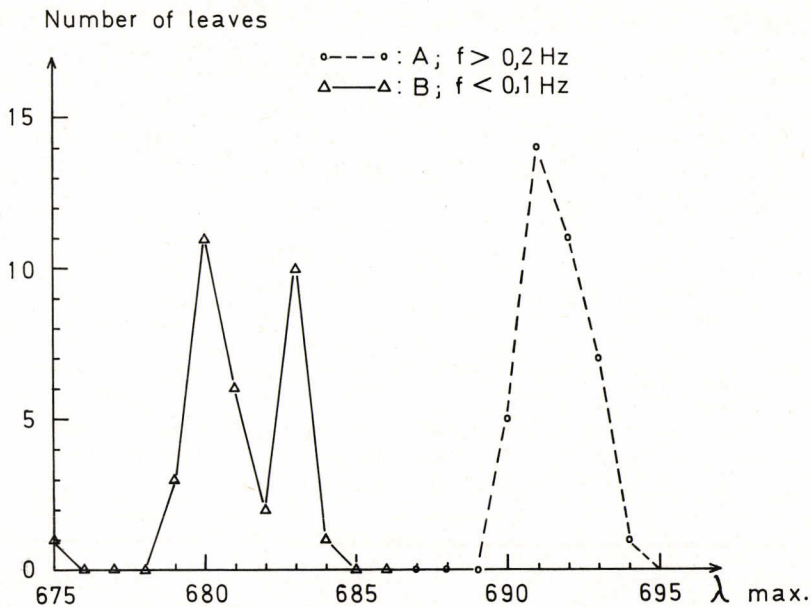


FIG. 3. — Nombre de feuilles (en ordonnée) dont le maximum de l'émission de fluorescence à 77 °K a été trouvé à une valeur donnée en abscisse, d'une part, dans un lot de 38 feuilles ayant reçu des éclairs à une fréquence plus grande que 0,2 Hz (courbe A), et d'autre part, dans un lot de 34 feuilles ayant reçu des éclairs à une fréquence plus petite que 0,1 Hz (courbe B).

rieure à 686 nm (fig. 3, courbe A). Au contraire, pour des intervalles plus grands que 10 secondes et au moins jusqu'à 25 secondes, la bande observée après 200 éclairs se situe à une longueur d'onde inférieure à 686 nm (fig. 3, courbe B). Il est exceptionnel que l'émission principale d'une feuille se situe à 686 nm ( $\pm 1$ ) après 200 éclairs.

Nous n'avons pas expérimenté des éclairs séparés par des intervalles plus courts que 1 seconde. Mais on sait qu'après un seul éclair intense d'une milliseconde, la bande d'émission est trouvée à 688 nm. Par ailleurs, nous avons parfois séparé les éclairs par des intervalles de plusieurs minutes. Dans ce cas, la bande d'émission formée est située en dessous de 685 nm, en général autour de 675 nm.

### 3. — Individualité de la réponse des feuilles lorsque la durée de la période obscure entre éclairs est comprise entre 10 et 5 secondes (fréquence comprise entre 0,1 et 0,2 Hz).

Lorsque la période obscure séparant deux éclairs successifs est comprise entre 5 ( $f = 0,2$  Hz) et 10 secondes ( $f = 0,1$  Hz), la bande principale d'émission se situe, après 200 éclairs, ou bien à une longueur d'onde inférieure à 686 nm, ou bien à une longueur d'onde supérieure à 686 nm, selon la feuille. L'expérience permet de mesurer la probabilité que, dans un lot d'un âge donné, une feuille prise au hasard fournisse l'un des deux résultats. Pour le lot de feuilles qui a servi à établir la figure 4, la probabilité que la bande se situe à une longueur d'onde supérieure à 686 nm est proche de zéro si l'intervalle est de 10 secondes. Elle s'accroît au fur et à mesure qu'on réduit l'intervalle obscur de 10 à 5 secondes. Elle atteint l'unité pour des intervalles de l'ordre de 4 secondes. La forme de la courbe ne varie pas de lot de feuilles à lot de feuilles ; seule la position de la zone des fréquences de transition varie. La position de cette zone dépend notamment de l'âge des feuilles, comme on le voit sur la figure 5.

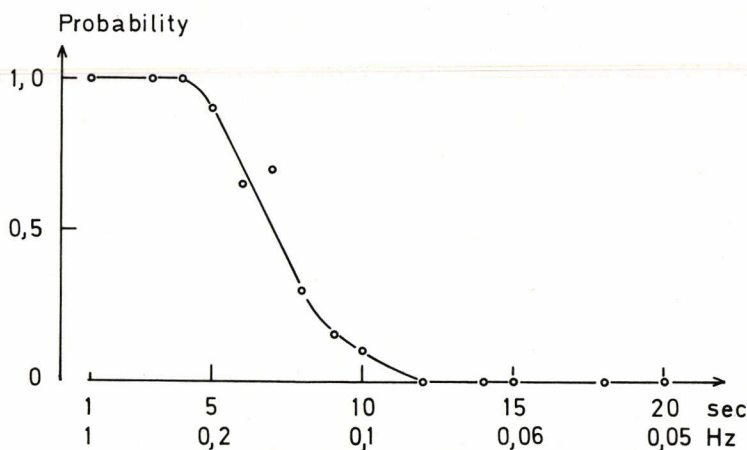


FIG. 4. — Probabilité (en ordonnée) que le maximum d'émission de fluorescence d'une feuille prise au hasard se trouve à une longueur d'onde supérieure à 686 nm en fonction de la fréquence des éclairs (en abscisse).



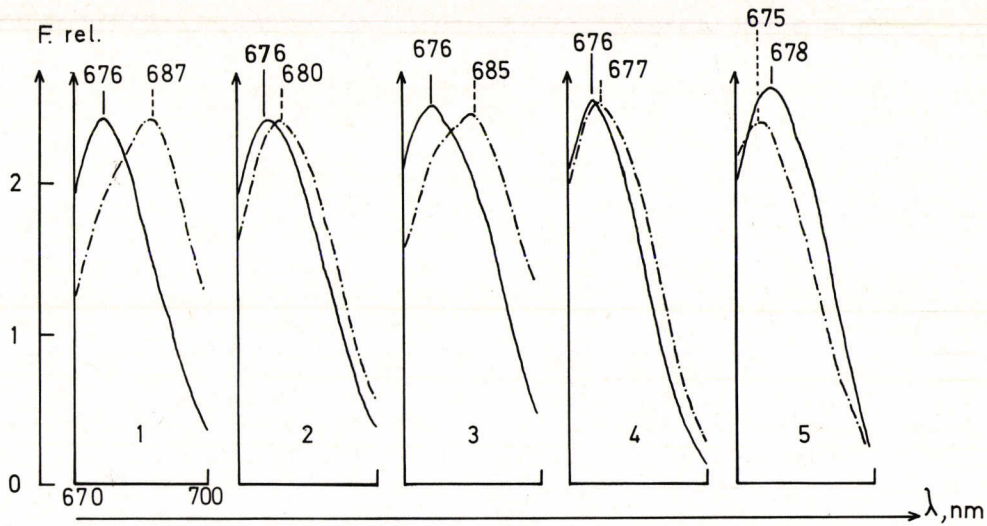


FIG. 5. — Effet de l'âge de la feuille primordiale sur la position du maximum de l'émission de fluorescence à 77 °K trouvé après que la feuille a reçu 120 éclairs à la fréquence de 0,1 Hz. En traits pleins : spectres de fluorescence de 5 feuilles prises au hasard âgées de 14 jours. En traits interrompus : spectres de 5 feuilles du même lot prises au hasard mais âgées de 15 jours. Les spectres sont reproduits entre 670 et 700 nm.

La figure 6 montre plusieurs sous-groupes de réponses possibles pour un lot donné de feuilles ayant reçu 200 éclairs à des fréquences comprises entre 0,1 et 0,2 Hz. Les réponses sont plus ou moins localisées autour de 690-692, 688-690 (aux fréquences de 0,143 et 0,166 Hz), 683-684 et 680-682 nm (aux fréquences de 0,125 et 0,111 Hz). Une division en sous-groupes est généralement observée lorsque l'intervalle obscur dépasse 4 secondes. Ceci souligne l'individualité de la réponse foliaire (l'hétérogénéité de l'âge physiologique des feuilles individuelles, etc.).

## DISCUSSION

Les émissions rencontrées après 200 éclairs répétés de faible intensité se situent, le plus souvent, soit autour de 690-693, soit autour de 680-685 nm, les absorptions correspondantes se situant soit autour de 682, soit autour de 668 nm. Ces caractéristiques spectrales résultent de déplacements obscurs qui succèdent à la photoproduction de  $P_{688-676}$ , — c'est-à-dire de déplacements distincts de la phototransformation proprement dite —, notamment pour les raisons suivantes :

1) Dans la feuille fraîche, un éclaircissement d'une durée de l'ordre de 1 ms forme l'intermédiaire  $P_{688-676}$  émettant à 685 nm au début, et à 688 nm à la fin de sa formation. Un déplacement obscur de l'émission de 685 vers 675 nm est obtenu en quelques minutes à la température ordinaire si l'obscurité est donnée

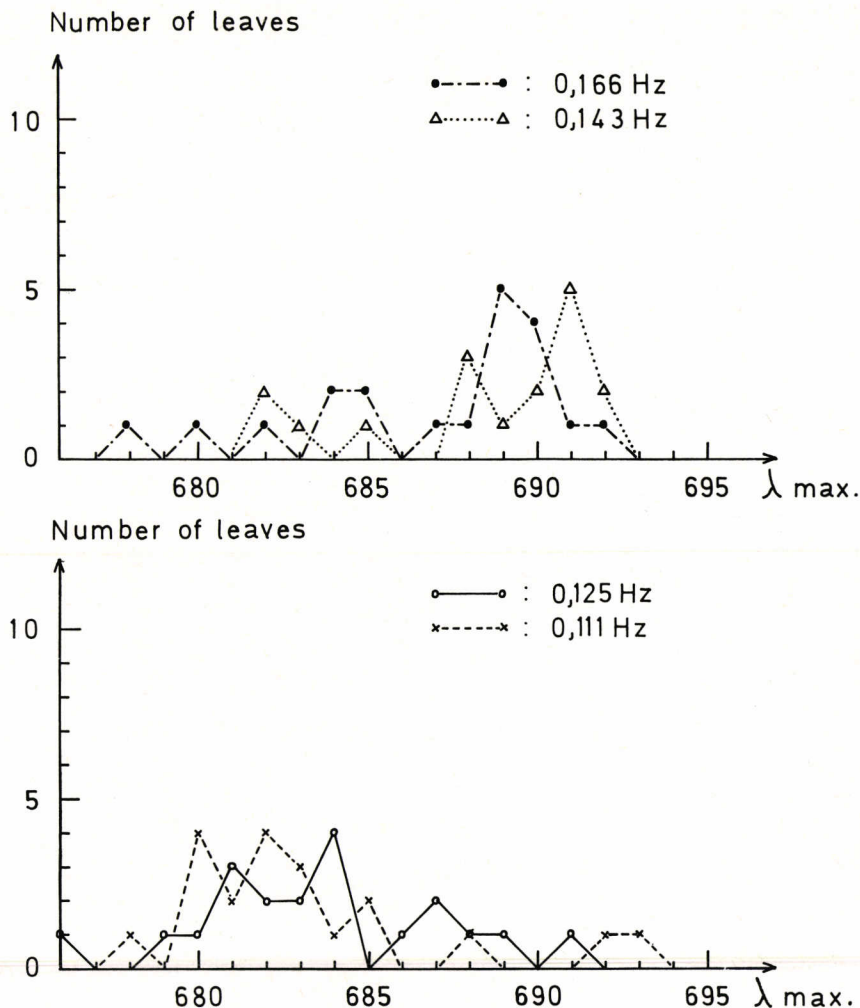


FIG. 6. — Nombre de feuilles (en ordonnée) dont le maximum de l'émission de fluorescence à 77 °K (en abscisse) a été trouvé à une valeur donnée en abscisse dans quatre séries de feuilles primordiales âgées de 15 jours et ayant reçu 200 éclairs à des fréquences comprises entre 0,1 et 0,2 Hz. Le nombre total des feuilles dans les séries est de 20 feuilles sauf dans la série 0,143 Hz où il est de 17 feuilles.

au début de la formation de  $P_{688-676}$  ainsi qu'il ressort du travail de LITVIN et BYELYAeva (1971); un déplacement obscur de l'émission vers 693 nm a lieu en moins de 30 secondes à la température ordinaire si l'obscurité est donnée à la fin de la formation de  $P_{688-676}$  comme l'ont montré SIRONVAL et al. (1967).

2) Les feuilles traitées par éclairs répétés n'émettent autour de 690-693, ou de 680-685 nm après 200 éclairs, qu'à condition de travailler à une température supérieure à 0 °C, et d'utiliser des feuilles fraîches. Nous avons vérifié que si la feuille étiolée est lyophilisée avant d'être soumise au régime des éclairs,



ou si la feuille étiolée fraîche est maintenue à  $-10^{\circ}\text{C}$ , les émissions après 200 éclairs sont localisées entre 685 et 688 nm. Or, il est connu par les travaux de LITVIN et BYELYAEVA (1971), GASSMAN et *al.* (1968), AKOYOUNGLOU et MICHALOPOULOS (1971) et DUJARDIN (1973) que ces conditions inhibent les déplacements spectraux obscurs.

On notera que la méthode expérimentale précipite la feuille dans l'azote liquide à l'instant du dernier éclair d'une série, ce qui élimine les changements qui pourraient se produire à l'obscurité après la fin de la séquence des éclairs. Ceci permet de dire que les caractéristiques des spectres s'élaborent pendant le traitement par éclairs répétés.

On notera également qu'après 200 éclairs et en comparaison de l'absorbance résiduelle à 650 nm, l'absorbance à 668 nm observée lorsque les éclairs sont distants de 15 secondes est un peu plus grande que l'absorbance à 682 nm observée lorsque les éclairs sont distants de 1 seconde. La phototransformation du spectre d'absorption est plus avancée dans le premier cas que dans le second (voir fig. 1). Ceci indique apparemment que la chlorophylle (-ide) se forme plus facilement lorsque les éclairs sont espacés que lorsqu'ils sont rapprochés. Dans les deux cas, un transfert d'énergie semble avoir lieu de la protochlorophylle (-ide) vers les formes de chlorophylle (-ide) absorbant, soit à 668 nm (émission autour de 682 nm), soit à 682 nm (émission autour de 693 nm). On sait que dans des feuilles de haricots, ou dans des préparations de complexes protochlorophyllide-lipoprotéine partiellement phototransformés, il existe un transfert d'énergie de la protochlorophylle (-ide) à la chlorophyllide (KAHN et *al.*, 1970 ; BROUERS et *al.*, 1972).

Il nous paraît important d'insister sur le fait que les changements spectraux observés après un traitement par éclairs répétés dont la durée totale est de l'ordre de 10 à 15 minutes dépendent de la fréquence des éclairs. On voit en effet sur la figure 2 que 50 éclairs donnés à la fréquence de 0,06 Hz provoquent un déplacement de l'émission vers 693 nm, tandis que 150 éclairs à la fréquence de 0,2 Hz entraînent un déplacement de l'émission vers 693 nm, bien que la durée totale du traitement ait été de 12 minutes 30 secondes dans les deux cas. Pour des durées de traitement plus longues que 10 à 15 minutes, on ne peut évidemment pas exclure à la température ordinaire les phénomènes obscurs qui provoquent le « shift de SHIBATA » (1957). Ce résultat montre que la feuille étiolée est capable de mesurer le temps qui sépare deux événements lumineux. Nous ignorons la nature du mécanisme impliqué.

#### REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Messieurs R. GUYSEMBERG et F. OHN pour leur précieuse collaboration technique.

#### BIBLIOGRAPHIE

- AKOYOUNGLOU G. et MICHALOPOULOS G., 1971. — The relation between the phytylation and the 682  $\rightarrow$  672 nm shift *in vivo* of chlorophyll *a*. *Physiol. Plant.*, **25**, 324-329.

- BROUERS M., KUYPER Y. et SIRONVAL C., 1972. — The reduction of protochlorophyllide into chlorophyllide. V. Demonstration of energy-transfer inside the  $P_{688-676}$  molecular units. *Photosynthetica*, **6**, 169-176.
- DUJARDIN E., 1973. — Pigment-lipoprotein complexes in the lyophilized etiolated leaf. *Photosynthetica*, **6**, sous presse.
- GASSMAN M., GRANIK S. et MAUZERALL D., 1968. — A rapid spectral change in etiolated red kidney bean leaves following phototransformation of protochlorophyllide. *Biochem. biophys. Res. Comm.*, **32**, 295-300.
- KAHN A., BOARDMAN, N. K. et THORNE S. W., 1970. — 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.
- LITVIN F. F. et BYELYAEVA O. B., 1971. — Sequence of photochemical and dark reactions in the terminal stage of chlorophyll biosynthesis. *Photosynthetica*, **5**, 200-209.
- SHIBATA K., 1957. — Spectroscopic studies on chlorophyll formation in intact leaves. *J. Biochem.*, **44**, 147-173.
- SIRONVAL C. et MICHEL J. M., 1967. — On a « photoenzyme » or the mechanism of the protochlorophyllide-chlorophyllide photoconversion. In *Book of Abstracts, Europ. Photobiol. Symp.* Hvar, Yougoslavie, pp. 105-108.
- SIRONVAL C., BROUERS M., MICHEL J. M. et KUYPER Y., 1968. — The reduction of protochlorophyllide into chlorophyllide. I. The Kinetics of the  $P_{657-647} \rightarrow P_{688-676}$  phototransformation. *Photosynthetica*, **2**, 268-287.
- SIRONVAL C. et BROUERS M., 1970. — The reduction of protochlorophyllide into chlorophyllide. II. The temperature dependence of the  $P_{657-647} \rightarrow P_{688-676}$  phototransformation. *Photosynthetica*, **4**, 38-47.
- SIRONVAL C. et KUYPER Y., 1972. — The reduction of protochlorophyllide into chlorophyllide. IV. The nature of the intermediate  $P_{688-676}$  species. *Photosynthetica*, **6**, 254-275.