

# QUELQUES ASPECTS ANCIENS ET MODERNES DE LA PHOTOSYNTHÈSE

par **J. M. BOVÉ**

*Institut Français de Recherches Fruitières Outre-Mer (I. F. A. C.).  
(Service de biochimie).*

## DEUXIÈME PARTIE \*

### QUELQUES ASPECTS ACTUELS DE LA PHOTOSYNTHÈSE : LA FORMATION DE L'ATP ET DU TPN H<sub>2</sub>

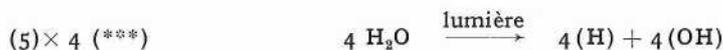
avec la collaboration de **A. GOFFEAU (\*\*)**

*Euratom, Service de Biologie, Bruxelles.*

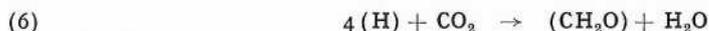
A la suite des travaux de Priestley, d'Ingen Housz, de de Saussure et d'autres, on savait dès le début du XIX<sup>e</sup> siècle, que les végétaux, grâce à l'énergie lumineuse, absorbent et assimilent le gaz carbonique en donnant lieu à une production concomitante d'oxygène. On admettait très généralement que l'oxygène ainsi dégagé provenait de la photodécomposition du CO<sub>2</sub> absorbé et, partant, ce dégagement d'oxygène était considéré comme un critère nécessaire et suffisant de la photosynthèse. Engelmann avait montré que l'émission d'oxygène avait lieu au niveau des chloroplastes ; c'est par conséquent dans les chloroplastes que l'absorption du CO<sub>2</sub> devait prendre place. D'où l'idée que ces chloroplastes étaient le siège de toutes les réactions photosynthétiques.

C'est à Van Niel que revient le mérite d'avoir reconnu que la source de l'oxygène photosynthétique résidait, non pas dans le gaz carbonique, mais dans l'eau. Un siècle plus tôt, de Saussure avait bien affirmé que les plantes recevaient leur hydrogène à partir de l'eau, mais il n'avait pas soupçonné que l'eau fût également la source de l'oxygène émis pendant la photosynthèse.

Dans l'hypothèse de Van Niel, l'eau était considérée comme un donneur d'hydrogène ; l'oxygène émis pendant la photosynthèse était en réalité de l'eau déshydrogénée. La lumière servait à produire une photodécomposition, une photolyse de l'eau :



(H) réduisait le CO<sub>2</sub> et (OH) donnait lieu au dégagement d'oxygène :



La somme des réactions (5) × 4, (6) et (7) est la réaction globale (2) :



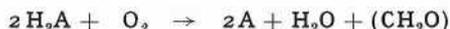
Cette hypothèse rendait compte de la photosynthèse chez les plantes vertes, mais elle ne pouvait pas être appliquée telle quelle aux bactéries photosynthétiques. Chez elles, la photosynthèse n'est jamais accompagnée d'un dégagement d'oxygène et elles ont besoin, dans leur milieu nutritif, d'un réducteur tel que le thiosulfate ou le succinate. Pour expliquer ces particularités de la photosynthèse

(\*) Première Partie : La Photosynthèse de PRIESTLEY à VAN NIEL par J. M. Bové « Fruits », vol. 16, n° 3, Mars 1961, p. 89-101.

(\*\*) Détaché actuellement au Service de biochimie de l'Institut Français de Recherches Fruitières Outre-Mer.

(\*\*\*) Suite de la numérotation de la première partie.

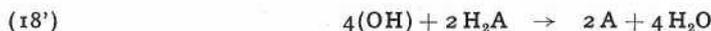
bactérienne, Van Niel avança l'idée que le réducteur  $H_2A$ , obligatoirement présent dans le milieu nutritif des bactéries photosynthétiques, jouait le même rôle que  $H_2O$  chez les plantes. Il proposa l'équation généralisée de la Photosynthèse :



Dans cette vue, les bactéries étaient considérées comme des organismes incapables d'utiliser  $H_2O$  comme donneur d'hydrogène, alors que les plantes vertes avaient ce pouvoir. Au cours de cet article nous verrons combien cette vue semble juste aujourd'hui bien que Van Niel ne devait pas lui rester fidèle longtemps. Il allait la remplacer par une hypothèse dans laquelle la photolyse de l'eau était considérée comme le dénominateur commun de la Photosynthèse. D'après cette hypothèse, la photolyse de l'eau représentait ce qui était commun à tous les organismes photosynthétiques :

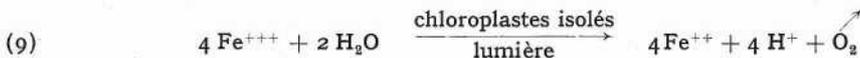


Dans cette hypothèse (OH) était supposé toxique ; les végétaux avaient le pouvoir de l'éliminer par dégagement d'oxygène suivant la réaction (7), mais les bactéries photosynthétiques n'avaient pas ce pouvoir ; elles étaient obligées d'éliminer (OH) au moyen du réducteur, obligatoirement présent dans leur milieu nutritif :

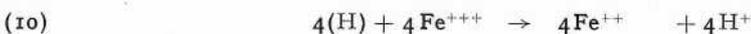
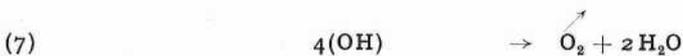
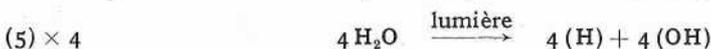


Cette hypothèse s'est maintenue pendant de nombreuses années. Nous verrons comment, en plusieurs étapes, l'équipe d'Arnon l'a battue en brèche, à partir de 1958.

En 1937, Hill avait découvert la réaction qui, aujourd'hui, porte son nom : les chloroplastes isolés ont le pouvoir de réduire, à la lumière, certains oxydants, et cette réduction est accompagnée d'un dégagement d'oxygène (réaction 9) :



La réaction de Hill pouvait être considérée comme étayant expérimentalement l'hypothèse de la photolyse de l'eau chez les plantes vertes. En effet, on peut écrire cette réaction de Hill comme la somme des trois réactions suivantes, dont la première est la photolyse de l'eau :



La photolyse de l'eau, partie intégrante de la réaction de Hill, devait donc avoir lieu là où la réaction de Hill prenait place : dans les chloroplastes. Mais les chloroplastes n'en étaient pas pour autant considérés comme le siège de toutes les réactions photosynthétiques. Ils s'étaient révélés rebelles à toute assimilation photosynthétique de  $CO_2$ . En 1953, Rabinowitch n'hésitait pas à écrire : « La tâche de séparer la (photosynthèse) des autres processus vitaux de la cellule... s'est révélée plus difficile que prévu. Le processus photosynthétique... semble être lié à la structure de la cellule ; il ne peut pas être reproduit en dehors de cette structure. » (Rabinowitch, 1953.) L'année suivante, les expériences d'Arnon allaient apporter un démenti flagrant à ces idées.

### I. LE CHLOROPLASTE, PARTICULE CELLULAIRE NÉCESSAIRE ET SUFFISANTE DE LA PHOTOSYNTHÈSE

L'année 1954 marque un tournant dans l'histoire de la photosynthèse. Arnon, Allen et Whatley (Arnon, 1954) montrent, à l'Université de Californie, Berkeley, que des chloroplastes isolés suivant une technique améliorée sont capables d'une fixation photosynthétique de  $CO_2$ . Le succès des expériences d'Arnon et coll. tient en particulier aux soins qu'ils apportèrent à la

préparation des chloroplastes : broyage des feuilles en chambre froide, centrifugation au froid, rapidité des manœuvres, etc.

L'équipe de Berkeley montre que les produits de fixation de  $CO_2$  au moyen de chloroplastes isolés sont les mêmes que ceux obtenus avec des cellules entières\* ; l'amidon, en particulier, est l'un des produits obtenus.

Dans toutes ces expériences, pour mettre en évidence l'absorption du gaz carbonique, celui-ci était marqué au carbone 14 (nombre de masse : 14), isotope radio-

(\*) Voir chapitre V (prochain numéro de *Fruits*).

actif du carbone de nombre de masse 12. Les produits solubles obtenus après assimilation de  $^{14}\text{CO}_2$  étaient séparés par chromatographie sur papier à deux dimensions et repérés par radioautographie, technique qui consiste à placer, en chambre noire, le papier-chromatogramme sur un film radiologique à rayons X ; les produits radioactifs impressionnent le film et se traduisent par des taches noires, après révélation photographique (\*).

Les chloroplastes qui assimilaient le  $\text{CO}_2$  étaient aussi capables de dégager de l'oxygène par réaction de Hill. Il devenait donc de plus en plus évident que, contrairement à l'opinion généralement admise, le chloroplaste isolé ne représentait pas un système beaucoup plus simple que celui nécessaire à la photosynthèse, mais qu'il était bien le siège de toutes les réactions photochimiques.

Au cours des dernières années, l'étude de la photosynthèse dans certains domaines a surtout progressé grâce à l'utilisation de chloroplastes isolés. Les réactions photosynthétiques peuvent ainsi être étudiées en dehors de la complexité de la cellule entière. Isoler des chloroplastes revient à séparer la fonction photosynthétique des autres fonctions physiologiques de la cellule. Donnons la parole à D. I. Arnon : « La cellule est un système très complexe. Nous y trouvons toutes sortes d'enzymes. Si vous pouvez être certain que toutes les enzymes de la photosynthèse sont localisées à un seul endroit de la cellule, aussitôt le problème est énormément simplifié : vous pouvez les chercher [ces enzymes] dans le chloroplaste et vous diminuez la possibilité de confondre le cycle respiratoire... avec la photosynthèse. » (*Research in Photosynthesis*, 1957, p. 294.)

Sans l'utilisation de chloroplastes isolés, Arnon et ses collaborateurs n'auraient jamais pu découvrir une réaction fondamentale en photosynthèse : la phosphorylation photosynthétique (voir plus loin).

## II. LA TRANSFORMATION DE L'ÉNERGIE LUMINEUSE EN ÉNERGIE CHIMIQUE, AU NIVEAU DES CHLOROPLASTES

### 1. Organismes photosynthétiques et Organismes chimiosynthétiques.

Nous avons vu, au cours de la première partie, que la fixation et la réduction du  $\text{CO}_2$  ne sont pas l'apanage des organismes photosynthétiques ; certains orga-

nismes non photosynthétiques peuvent assimiler le  $\text{CO}_2$  pour la synthèse de composés organiques. C'est à Winogradsky que revient le mérite de la découverte de ces organismes, les bactéries chimiosynthétiques autotrophes, qui assimilent le  $\text{CO}_2$  à l'obscurité. Pour que cette assimilation soit possible, il faut fournir à ces bactéries une source d'énergie, telle que l'hydrogène gazeux, l'hydrogène sulfureux, l'ammoniac, etc. Les bactéries chimiosynthétiques autotrophes ne peuvent se développer au moyen de  $\text{CO}_2$  qu'en présence d'un tel composé réducteur.

Ainsi donc, aussi bien chez les organismes photosynthétiques que chez les organismes chimiosynthétiques autotrophes, l'assimilation du  $\text{CO}_2$  apparaît comme une suite de réactions sombres. Les premiers ont la possibilité d'utiliser, pour cette assimilation, la lumière comme source d'énergie, alors que les seconds trouvent l'énergie nécessaire dans l'oxydation d'un réducteur.

### 2. L'hypothèse de Ruben.

A partir du moment où l'on envisage l'assimilation du  $\text{CO}_2$  comme une somme de réactions sombres, le problème suivant est posé : comment, dans une première phase, l'énergie lumineuse est-elle emmagasinée sous forme d'énergie chimique pour être utilisée, dans une deuxième phase, à l'assimilation de  $\text{CO}_2$  par une suite de réactions sombres ?

Deux hypothèses sont possibles :

a) (H) provenant de la photolyse de l'eau,  $\text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{lumière}} (\text{H}) + (\text{OH})$ , réduirait directement  $\text{CO}_2$  jusqu'au niveau de réduction des sucres par une suite de réactions sombres, suivant un mécanisme propre à la photosynthèse. Une telle hypothèse ne peut être appliquée qu'aux organismes *photosynthétiques*, seuls capables de photolyse de l'eau et de production de (H). Il faut postuler un autre mécanisme pour l'assimilation du  $\text{CO}_2$  chez les cellules *chimiosynthétiques*.

b) Conscient de ces difficultés, Ruben présentait, en 1943, une hypothèse qui s'est révélée très près de la vérité (Ruben, 1943). Elle consistait à faire intervenir, dans l'assimilation de  $\text{CO}_2$ , deux composés biochimiques bien connus : l'un, un composé réducteur, le pyridine nucléotide réduit,  $\text{PNH}_2$  (\*) ; l'autre un

(\*) Nous utiliserons dans cet article les abréviations suivantes :

$\text{Mg}^{++}$	: ion magnésium.
$\text{P}_i$	: phosphate inorganique (ou minéral)
AMP	: adenosine monophosphate.
ADP	: adenosine diphosphate

(\*) Voir chapitre V (prochain numéro de *Fruits*).

composé possédant deux liaisons phosphate à haute énergie, l'adénosine triphosphate, ATP (voir Bové, 1961, *b*). Dans l'esprit de Ruben, l'assimilation de CO<sub>2</sub> avait lieu en deux étapes :

1° fixation de CO<sub>2</sub> sur un accepteur ; l'énergie nécessaire à cette « carboxylation » était fournie par l'ATP ;  
2° réduction du composé carboxylé obtenu, en sucre au moyen de PNH<sub>2</sub> et d'ATP.

L'ATP et le PNH<sub>2</sub> nécessaires devaient résulter de la transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique. Le rôle de la lumière chez les êtres photosynthétiques se résumait alors à la formation d'ATP et de PNH<sub>2</sub>. Chez les êtres chimiosynthétiques, l'ATP et le PNH<sub>2</sub> pouvaient provenir de l'oxydation du réducteur nécessairement présent dans le milieu. L'ATP et le PNH<sub>2</sub> obtenus par l'un ou l'autre de ces procédés rendaient possible l'assimilation de CO<sub>2</sub> par une succession de réactions sombres.

L'hypothèse de Ruben était basée uniquement sur des considérations de thermodynamique. Elle n'avait pas de supports expérimentaux quand elle fut formulée. Cependant par la suite, de nombreuses expériences furent entreprises pour vérifier son exactitude :

### 3. Participation du phosphate en photosynthèse.

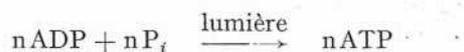
Si, dans l'hypothèse de Ruben, l'énergie lumineuse sert à former les liaisons phosphate à haute énergie de l'ATP, il doit par conséquent y avoir estérification de phosphate inorganique. Donc, à la lumière, le phosphate inorganique doit diminuer à l'intérieur des cellules éclairées : c'est ce que montra Kandler au moyen de chlorelles (Kandler, 1950). Cette diminution de phosphate inorganique pouvait être interprétée comme une estérification de phosphate inorganique en phosphate organique, mais elle ne permet-

ATP	: adénosine triphosphate.
DPN (H <sub>2</sub> )	: diphosphopyridine nucléotide (réduit).
TPN (H <sub>2</sub> )	: triphosphopyridine nucléotide (réduit).
PN (H <sub>2</sub> )	: pyridine nucléotide (réduit); terme global pour DPN(H <sub>2</sub> ) et TPN(H <sub>2</sub> ).
DCPIP (H <sub>2</sub> )	: 2,6-dichlorophénolindophénol (réduit).
TCPIP (H <sub>2</sub> )	: 2,3',6-trichlorophénolindophénol (réduit).
FMN (H <sub>2</sub> )	: flavine mononucléotide (réduit).
PMS	: phénazine méthosulfate.
e <sup>-</sup>	: électron.
Fe <sup>++</sup>	: ferrocyanure.
Fe <sup>+++</sup>	: ferricyanure.
AHB P	: acide 2-hydroxybenzoquinone 5-propionique.
Cyt.	: Cytochrome.
Chl	: Chlorophylle.
CMU	: 3-(parachlorophényl)-1,1-diméthylurée (monuron).
DCMU	: 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée (diuron).
Tris	: tris (hydroxyméthyl) aminométhane.
h	: constante de PLANCK.
ν	: fréquence de la lumière.
hν	: quantum de lumière de fréquence ν.

tait pas de conclure à une participation de l'ADP dans la formation d'ATP suivant la réaction classique :



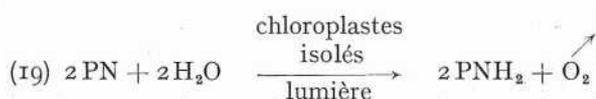
Les expériences de Simonis et Grube (1952) et de GRUBE (1953) permirent de serrer le problème d'un peu plus près. Ils firent absorber du phosphate radioactif à des feuilles détachées, puis séparèrent les phosphates en plusieurs fractions. L'une d'elles, P<sub>1</sub>, représentait le phosphate inorganique ; une autre, P<sub>2</sub>, le phosphate organique, y compris l'ATP. A la lumière, le phosphate de P<sub>1</sub> diminuait et celui de P<sub>2</sub> augmentait. La fraction P<sub>2</sub> contenant l'ATP, cette expérience était en accord avec une estérification de phosphate inorganique en ATP à la lumière :



Toutes ces expériences, néanmoins, n'apportaient qu'une preuve indirecte de la formation d'ATP à la lumière.

### 4. Réduction des pyridines nucléotides à la lumière.

En 1952, Vischniac et Ochoa montrèrent que des chloroplastes isolés étaient capables de réduire, à la lumière, les phosphopyridines nucléotides, DPN ou TPN (Vischniac, 1952). Ils envisageaient cette réduction comme une réaction de Hill dans laquelle DPN ou TPN était l'oxydant :



On sait que DPNH<sub>2</sub> peut être oxydé par des mitochondries isolées en présence d'oxygène : une production d'ATP peut être couplée à cette oxydation (phosphorylation oxydative) (voir Bové, 1961 *b*). C'est pourquoi Vischniac et Ochoa ajoutèrent des mitochondries à leurs chloroplastes et montrèrent que le DPNH<sub>2</sub> formé suivant (19) était oxydé en présence d'oxygène, avec production concomitante d'ATP par phosphorylation oxydative. Dans l'esprit de ces auteurs, le rôle de la lumière se résumait alors à une réduction de pyridine-nucléotides. La lumière n'intervenait pas dans l'estérification de phosphate inorganique en ATP. Pour eux, l'ATP était produit par phosphorylation oxydative couplée à l'oxydation du

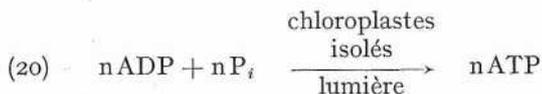
PNH<sub>2</sub> par les mitochondries, en présence d'oxygène. Ce mécanisme était le même chez les organismes photosynthétiques que chez les êtres non photosynthétiques.

Cependant, cette conception se heurtait à certaines difficultés. Elle nécessitait une association étroite entre les chloroplastes, photoproduleurs de PNH<sub>2</sub> et les mitochondries productrices d'ATP. On s'attendrait donc à trouver dans les feuilles vertes un nombre assez grand de mitochondries, au moins comparables à celui des chloroplastes. Or, il n'en est rien. Dans les feuilles vertes, il y a relativement peu de mitochondries par rapport aux chloroplastes.

Ces difficultés allaient être éliminées par une découverte capitale : la phosphorylation photosynthétique.

##### 5. Phosphorylation photosynthétique (photophosphorylation).

En 1954, Arnon, Allen et Whatley montrent que des chloroplastes entiers (non brisés) sont capables de synthétiser de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique, *quand ils sont éclairés* :



Ils appelèrent phosphorylation photosynthétique ou photophosphorylation cette formation d'ATP.

Au début, la découverte d'Arnon, Allen et Whatley fut accueillie avec scepticisme. Elle allait à l'encontre des notions généralement admises. A la suite de Vischniac et Ochoa, nombreux étaient ceux qui admettaient que l'ATP, nécessaire en photosynthèse, provenait simplement de la phosphorylation oxydative mitochondriale, couplée à l'oxydation du pyridine nucléotide réduit, PNH<sub>2</sub>, au niveau des mitochondries ; le rôle de la lumière était limité à la photoréduction de ces pyridines nucléotides par réaction de Hill, au niveau des chloroplastes. Dans cette conception, la formation d'ATP ne dépendait qu'*indirectement* de la lumière : la lumière était nécessaire à la formation de PNH<sub>2</sub>, mais une fois PNH<sub>2</sub> formé, la phosphorylation oxydative pouvait avoir lieu à l'obscurité.

Aussi la critique qui revenait le plus souvent au cours des discussions qui opposaient Arnon à ses contradicteurs était-elle la suivante : « Les chloroplastes que vous isolez sont peut-être contaminés par des mitochondries, ce sont elles qui produisent l'ATP ! » Une critique équivalente était adressée aux expériences

de fixation de CO<sub>2</sub> réalisées par l'équipe d'ARNON : « Comment savez-vous que ce sont les seuls chloroplastes qui assimilent le CO<sub>2</sub> ? Des enzymes du cytoplasme s'adsorbent peut-être sur les chloroplastes pendant que vous les isolez, et participent à l'assimilation du CO<sub>2</sub> ! »

Arnon répond en plusieurs points à ces critiques (*Research in Photosynthesis*, 1957, p. 294) :

1) Les chloroplastes sont séparés des mitochondries par centrifugation différentielle. Les chloroplastes sont beaucoup plus gros que les mitochondries ; ils sont centrifugés à 1 000 g et constituent le culot. Les mitochondries restent dans le surnageant.

2) Les chloroplastes entiers, ainsi séparés, sont ensuite lavés.

3) Si l'on ajoute à de tels chloroplastes entiers, lavés, les autres constituants cytoplasmiques, il n'y a pas augmentation, ni de la quantité de CO<sub>2</sub> assimilé, ni de la quantité d'ATP formé.

4) La fixation de CO<sub>2</sub> est proportionnelle à la concentration de chlorophylle des chloroplastes.

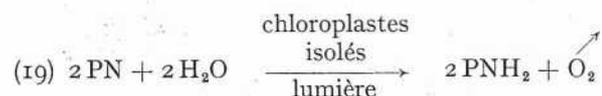
Au cours des années suivantes, les rendements de la phosphorylation photosynthétique et de l'assimilation de CO<sub>2</sub> par des chloroplastes isolés furent considérablement augmentés (plus de 200 fois). D'autres auteurs confirmèrent les découvertes de l'équipe d'Arnon et contribuèrent à l'étude de la phosphorylation photosynthétique. Citons en particulier l'équipe de A. T. Jagendorf, celle de B. Vennesland, celle de M. Avron...

Peu de temps après la découverte de la phosphorylation photosynthétique dans les chloroplastes, Frenkel montra que les chromatophores isolés de la bactérie photosynthétique *Rhodospirillum rubrum* avaient aussi le pouvoir de former de l'ATP à la lumière (Frenkel, 1954). Williams démontra l'existence de la photophosphorylation chez les chromatophores isolés de *Chromatium* (Williams, 1956).

Il devenait donc rapidement manifeste que la phosphorylation photosynthétique était l'apanage de tous les organismes photosynthétiques.

##### 6. Photoréduction de TPN et photophosphorylation simultanées.

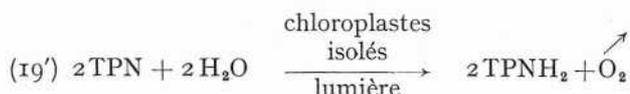
Nous avons vu qu'à la suite des expériences de Vischniac et Ochoa on savait que les chloroplastes étaient capables de réduire, à la lumière, les pyridines nucléotides suivant l'équation (19) :



Dans ces expériences, la réaction (19) était couplée à une réaction enzymatique de déshydrogénation qui éliminait  $\text{PNH}_2$  au fur et à mesure qu'il était formé. De cette façon, la réaction (19) pouvait avoir lieu. Mais dans ces expériences, il n'y avait pas mise en évidence directe d'une accumulation de  $\text{PNH}_2$ .

C'est à San Pietro et Lang que revient le mérite d'avoir montré que les pyridines nucléotides réduits à la lumière par les chloroplastes isolés peuvent s'accumuler (San Pietro, 1956). Pour que cette réduction ait lieu avec une faible quantité de chloroplastes (quantité catalytique) il faut ajouter un extrait aqueux de chloroplastes. San Pietro et Lang ont montré par la suite que le principe actif dans cet extrait de chloroplastes était une enzyme appelée depuis réductase photosynthétique du TPN (San Pietro, 1958). Cette enzyme semble fonctionner spécifiquement avec TPN.

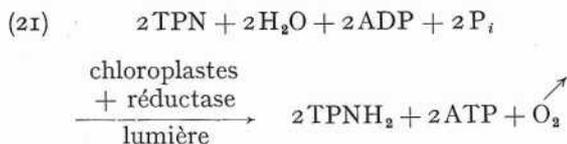
Les résultats de San Pietro et Lang furent confirmés par Arnon, Whatley et Allen (Arnon, 1957), qui montrèrent que, pour chaque molécule de  $\text{TPNH}_2$  produite, une quantité d'oxygène, stœchiométrique suivant l'équation (19') était dégagée ;



Ainsi TPN peut être considéré comme un « oxydant » de la réaction de Hill, analogue à l'oxydant classique de la ferricyanure.

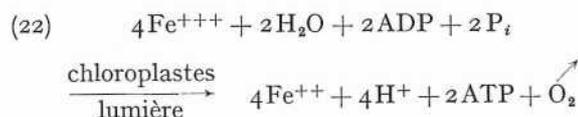
Mais il existe une différence capitale entre la réaction de Hill au ferricyanure et celle au TPN. La première est catalysée non seulement par des chloroplastes entiers, mais aussi par les grana, constituants *insolubles* des chloroplastes et siège de la chlorophylle. Par contre, la réaction de Hill au TPN n'est pas catalysée par les seuls grana. Il faut leur ajouter l'extrait *soluble* des chloroplastes (stroma) ou plus simplement la réductase photosynthétique du TPN, obtenue à partir de l'extrait soluble de chloroplastes.

La réaction de Hill au ferricyanure est une réaction non physiologique : il n'y a pas de ferricyanure dans les cellules. Par contre, la réaction de Hill au TPN est une réaction physiologique. D'où tout l'intérêt de cette réaction. Son importance a encore été accrue lorsque, en 1958, Arnon, Whatley et Allen (Arnon, 1958) montrèrent qu'on pouvait y coupler une phosphorylation, autrement dit que, *pendant la photo-réduction de TPN en  $\text{TPNH}_2$  il y avait formation simultanée d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique, suivant la réaction (21) :*



Dans cette réaction, il y a production et de  $\text{TPNH}_2$  et d'ATP, avec dégagement simultané d'oxygène. Seule l'énergie lumineuse est utilisée pour la formation de ces deux composés à haute énergie libre que sont le  $\text{TPNH}_2$  et l'ATP.

La même formation d'ATP a lieu lorsqu'on utilise le ferricyanure comme réactif de Hill (réaction 22) :



Pour bien faire ressortir les particularités de la formation d'ATP suivant la réaction (21) il est intéressant de la comparer à la production d'ATP par phosphorylation oxydative au niveau des mitochondries (voir Bové, 1961 *b*).

1) Dans la phosphorylation oxydative, il y a *absorption* d'oxygène ; dans la phosphorylation photosynthétique, suivant (21), il y a *dégagement* d'oxygène.

2) Dans la phosphorylation oxydative, il y a *oxydation de  $\text{DPNH}_2$*  ; il se forme du DPN ; c'est l'énergie libre du  $\text{DPNH}_2$  qui est utilisée pour la synthèse d'ATP. En phosphorylation photosynthétique, suivant (21) il y a, au contraire, *réduction* de TPN, il se forme du  $\text{TPNH}_2$  ; l'énergie nécessaire à la réduction de TPN en  $\text{TPNH}_2$  et à l'estérification du phosphate inorganique en ATP, est fournie par la lumière.

3) La phosphorylation oxydative a lieu au niveau des mitochondries. La phosphorylation photosynthétique se produit au niveau des chloroplastes.

## 7. Photophosphorylation cyclique et photophosphorylation non cyclique.

Nous avons rencontré, au cours de ce chapitre, deux types de photophosphorylation par les chloroplastes. L'une, suivant la réaction (21), est couplée à une réaction de Hill ; il y a formation d'ATP en même temps qu'il y a dégagement d'oxygène. C'est la phosphorylation non cyclique. L'autre, suivant la réaction (20), n'est pas caractérisée par un dégagement d'oxygène ; l'ATP est le seul produit de la réaction. C'est la phosphorylation cyclique. Nous verrons, au cours du chapitre suivant, la raison de ces dénominations.

A la fin de ce chapitre sur la transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique, nous voyons que les chloroplastes ont le pouvoir de transformer l'énergie lumineuse en énergie chimique de deux composés, TPNH<sub>2</sub> (réaction de Hill) et ATP (phosphorylation).

Ce sont là les composés qui, dans l'hypothèse de Ruben, étaient nécessaires à la fixation de CO<sub>2</sub>. Dès à présent, il apparaît que le rôle de la lumière est de fournir l'énergie nécessaire à la formation d'ATP et de TPNH<sub>2</sub> et que l'assimilation de CO<sub>2</sub> est une suite de réactions obscures auxquelles participent l'ATP et le TPNH<sub>2</sub> formés à la lumière.

Nous allons voir maintenant plus en détail dans quelles conditions et par quel mécanisme l'ATP et le TPNH<sub>2</sub> sont formés au niveau des chloroplastes et des chromatophores.

### III. LES CONDITIONS DE LA PHOSPHORYLATION PHOTOSYNTHÉTIQUE PAR LES CHLOROPLASTES

#### 1. Les premières conditions de la photophosphorylation cyclique.

La première phosphorylation photosynthétique qui fut décrite par Arnon, Allen et Whatley en 1954 (Arnon, 1954) était caractérisée par les conditions suivantes :

- elle n'avait lieu qu'à la lumière ;
- elle était catalysée par des chloroplastes entiers ;
- à part l'acide ascorbique, qui induisait une augmentation de la phosphorylation photosynthétique, aucun autre cofacteur n'était connu ;
- l'oxygène était nécessaire à la phosphorylation, bien qu'il ne fût pas consommé apparemment ; quand la réaction était effectuée sous atmosphère d'azote (condition anaérobie), la phosphorylation était grandement diminuée ;
- les rendements étaient faibles.

#### 2. Les conditions améliorées de la photophosphorylation cyclique.

Très rapidement, ces premières conditions furent améliorées ; les rendements de la photophosphorylation (quantité d'ATP formée par milligramme de chlorophylle et par heure) s'en trouvèrent énormément augmentés.

En premier lieu, l'équipe d'Arnon découvrit des

cofacteurs de la phosphorylation (Whatley, 1955 ; Arnon, 1955). Ces cofacteurs étaient, en plus de l'ascorbate :

- ions Magnésium, Mg<sup>++</sup> (Whatley, 1955),
- flavine mononucléotide, FMN (Whatley, 1955),
- certains dérivés de la naphthoquinone, en particulier la ménadione ou vitamine K<sub>3</sub>, et la vitamine K<sub>8</sub> (Arnon, 1955),
- triphosphopyridine nucléotide, TPN (Arnon, 1957).

Jagendorf et Avron découvrirent d'autres catalyseurs de la phosphorylation, parmi lesquels le phénazine méthosulfate, PMS, qui, bien que non physiologique, est celui qui donne les plus hauts rendements (Jagendorf, 1957). FMN, TPN, vitamine K, PMS ne sont nécessaires qu'en quantités catalytiques.

Très récemment Trebst vient de montrer que certains phénols-indophénols tels que TCPIP ou DCPIP, sous leur forme réduite, catalysent également la photophosphorylation anaérobie cyclique (Trebst, 1961 b).

En second lieu, Whatley, Allen et Arnon montrèrent que lorsque les cofacteurs adéquats sont présents, la phosphorylation photosynthétique peut procéder en atmosphère d'azote, en l'absence d'oxygène. Ils conclurent que la phosphorylation était un *processus anaérobie* (Whatley, 1955).

Ensuite, Whatley et coll. trouvèrent qu'en présence des cofacteurs et en atmosphère d'azote, la structure des chloroplastes n'avait plus besoin d'être intacte : des *chloroplastes brisés* sont capables de phosphoryler (Whatley, 1956). (Les chloroplastes brisés sont obtenus en faisant éclater les chloroplastes entiers dans un milieu hypotonique, H<sub>2</sub>O ou solution de NaCl à 0,2 %.)

Puis Allen, Whatley et Arnon montrèrent, en utilisant des fragments lavés de chloroplastes brisés, que l'accepteur de phosphate inorganique n'est pas l'adénosine monophosphate, AMP, mais l'*adénosine diphosphate*, ADP (Allen, 1958). Quand des chloroplastes entiers étaient utilisés pour la photophosphorylation, l'AMP aussi bien que l'ADP pouvaient servir d'accepteur de phosphate. Cela est dû à l'existence, dans les chloroplastes, d'une enzyme, la kinase adénylique ou myokinase, qui catalyse la réaction réversible suivante :



Au moyen de cette enzyme, l'AMP est transformée en ADP qui, alors, sert d'accepteur de phosphate inorganique. Les fragments lavés de chloroplastes sont dépourvus de la kinase adénylique.

Enfin, le pH optimum pour la phosphorylation est

de 8,3 quand les conditions précédentes sont remplies (Allen, 1958).

Grâce à ces nouvelles conditions, les rendements de la photophosphorylation cyclique ont été augmentés 200 fois par rapport à ce qu'ils étaient quand la photophosphorylation fut découverte. Des rendements de l'ordre de 750 micromoles d'ATP par milligramme de chlorophylle et par heure ont été obtenus par Jagendorf et Avron (Jagendorf, 1957). Récemment, Avron a triplé ces rendements (Avron, 1960).

A titre d'exemple, on trouvera ci-après la composition d'un mélange réactionnel capable de photophosphyler cycliquement avec de bons rendements, sous atmosphère d'azote :

Chloroplastes d'épinards brisés : quantité correspondant à 0,1 mg de chlorophylle.

PMS : 0,03 mg  
 ADP : 10 micromoles  
 $P_i$  : 10 micromoles  
 $MgCl_2$  : 10 micromoles  
 Tampon « tris » pH 8,3 : 80 micromoles  
 Eau : volume final du mélange réactionnel : 3 ml.  
 Éclairement : 40 000 Lux au niveau des foies.  
 Quantité d'ATP formé en 10 minutes : 9 micromoles.

### 3. Les conditions de la photophosphorylation non cyclique.

La photophosphorylation non cyclique est celle qui est couplée à la réduction du ferricyanure ou du TPN par des chloroplastes isolés (Arnon, 1959 a). Pour quatre molécules de ferrocyanure ou pour deux molécules de TPN réduit, on obtient deux molécules d'ATP (réactions 21 et 22), ainsi d'ailleurs qu'une molécule d'oxygène gazeux.

La structure du chloroplaste n'a pas besoin d'être intacte pour la photophosphorylation non cyclique qui, comme la photophosphorylation cyclique, se déroule très bien avec des chloroplastes brisés. Le pH optimum est aux alentours de 8. Mais alors que les seuls grana catalysent la phosphorylation non cyclique lorsque le ferricyanure est l'oxydant de Hill, il n'en est pas de même lorsqu'on utilise le TPN : il faut, en plus des grana, la reductase photosynthétique du TPN (voir précédemment).

Avec le mélange réactionnel suivant :

Chloroplastes d'épinards brisés : quantité correspondant à 0,1 mg de chlorophylle :  
 TPN : 4 micromoles  
 ADP : 10 micromoles

$P_i$  : 10 micromoles

$MgCl_2$  : 10 micromoles

Tampon « Tris », pH 8,0 : 80 micromoles

Reductase : 20 unités

Eau : volume final du mélange réactionnel : 3 ml.

Pour un éclairage de 40 000 lux, la durée nécessaire à réduire les 4 micromoles de TPN, avec formation concomitante de 4 micromoles d'ATP et 2 micromoles d'oxygène, est d'environ 15 à 30 minutes.

## IV. MÉCANISME DE LA PHOSPHORYLATION PHOTOSYNTHÉTIQUE

En phosphorylation oxydative, la formation d'ATP est couplée à un transport d'hydrogène dans les mitochondries. Les hydrogènes sont fournis par certains acides organiques (acides  $\alpha$ -cétoglutarique, succinique, etc.) ; par l'intermédiaire d'une série de transporteurs, ces hydrogènes sont acheminés vers l'oxygène moléculaire pour former de l'eau. Globalement, cela se traduit par l'oxydation d'un acide organique par l'oxygène moléculaire. La variation d'énergie libre pour cette oxydation est largement négative ; l'énergie libérée sert à la formation d'ATP.

Nous avons vu que la phosphorylation photosynthétique cyclique est catalysée par des cofacteurs. Ces cofacteurs se trouvent être des transporteurs d'hydrogène ou d'électrons, FMN, PMS, quinones, etc. Très rapidement, il est devenu manifeste que la formation d'ATP par les chloroplastes est également couplée à un transport d'hydrogène au niveau de ces chloroplastes. Mais il existe une différence fondamentale entre le transport d'hydrogène de la phosphorylation oxydative, chez les mitochondries, et celui de la phosphorylation photosynthétique cyclique chez les chloroplastes. Le premier est caractérisé par un donneur d'hydrogène, l'acide organique, et un accepteur d'hydrogène, l'oxygène moléculaire. Aussi, dans une réaction de phosphorylation oxydative par des mitochondries isolées, deux modifications apparentes peuvent-elles être mesurées en plus de la formation d'ATP :

— la consommation de l'acide organique qui est oxydé ou plus exactement déshydrogéné ;

— la consommation d'oxygène moléculaire.

Au contraire, dans le transport d'hydrogène de la phosphorylation photosynthétique cyclique, il n'y a ni consommation apparente d'un donneur d'hydrogène ni consommation apparente d'un accepteur d'hydrogène. La seule modification qui s'accomplisse dans le système réactionnel est l'apparition d'ATP à partir

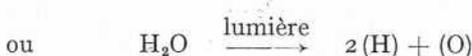
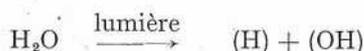
d'ADP et de phosphate inorganique. D'où viennent alors les hydrogènes et que deviennent-ils ? Comment est réalisé le transport d'hydrogène ?

Au moment où Arnon découvrit la photophosphorylation, la théorie de la photolyse de l'eau, imaginée par Van Niel, était très largement acceptée. Tout mécanisme essayant d'expliquer la phosphorylation photosynthétique essayait de tenir compte de la photolyse de l'eau. C'est ce que fit Arnon pendant les premières années. Mais ensuite il fut amené à abandonner l'idée de la photolyse de l'eau. Nous allons maintenant envisager ces étapes successives.

### I. Mécanisme basé sur la photolyse de l'eau.

#### a) Phosphorylation photosynthétique cyclique.

La phosphorylation photosynthétique étant couplée à un transport d'hydrogène, tout mécanisme de la photophosphorylation cyclique doit faire apparaître un donneur d'hydrogène et un accepteur d'hydrogène. Ce serait la photolyse de l'eau qui y pourvoirait ; grâce à l'énergie lumineuse, H<sub>2</sub>O est scindé en un donneur d'hydrogène (H) et un accepteur d'hydrogène (OH) qu'on peut aussi écrire sous la forme (O) :



(H) va fournir des hydrogènes qui, par l'intermédiaire des cofacteurs de la phosphorylation photosynthétique cyclique, FMN, vit. K, ..., vont être acheminés vers l'accepteur d'hydrogène, (O), pour redonner de l'eau. La phosphorylation est couplée à ce transport d'hydrogène. La figure 4 (\*) représente le premier schéma publié par Arnon pour expliquer le transport d'hydrogène de la phosphorylation photosynthétique cyclique (Arnon, 1955).

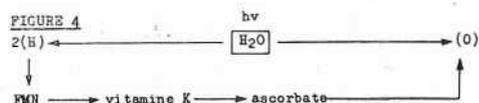


FIG. 4. — Transport d'hydrogène de la phosphorylation photosynthétique cyclique (Arnon, 1955).

Au fur et à mesure des progrès dans l'étude de la phosphorylation photosynthétique cyclique, l'équipe d'Arnon a été amenée à améliorer ses schémas en y

(\*) Suite de la numérotation de la première partie.

introduisant des certitudes ou des hypothèses nouvelles. D'après le schéma de la figure 4, FMN et vitamine K servent de transporteur d'hydrogène sur le même trajet ; ils interviennent l'un après l'autre. Cependant la vitamine K seule, ou FMN seul, peuvent catalyser la phosphorylation photosynthétique. Ces faits ont amené Whatley, Allen et Arnon à penser que ces deux cofacteurs catalyseraient des trajets distincts de transport d'hydrogène (Whatley, 1959). L'un des arguments en faveur de cette idée était le fait que la phosphorylation catalysée par FMN était augmentée de façon appréciable par la présence de quantités catalytiques de TPN, alors que le système catalysé par la vitamine K était moins stimulé par TPN. De plus, la phosphorylation au FMN répondait différemment à certains inhibiteurs que celle à la vitamine K. Cependant, nous allons voir plus loin (IV, 3, 1) que cette distinction entre le « système » FMN et le « système » vitamine K tend à s'estomper actuellement. La figure 5 représente le schéma de la phosphorylation photosynthétique catalysée par FMN, ainsi que l'envisageait l'équipe d'Arnon en 1958.

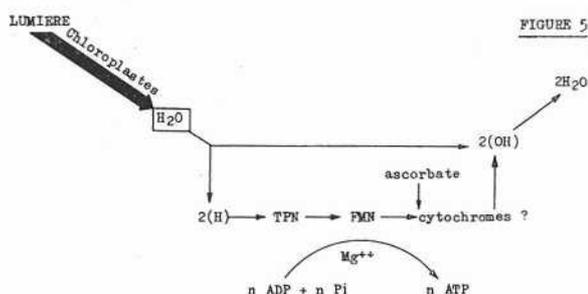


FIG. 5. — Phosphorylation photosynthétique cyclique couplée au transport d'hydrogène cyclique via FMN (« système » FMN) (Whatley, 1959).

Dans ce schéma, l'ascorbate n'était pas considéré comme transporteur d'hydrogène pour la phosphorylation. Il semblait protéger les chloroplastes contre une inactivation. En l'absence d'ascorbate, les chloroplastes perdaient une grande partie de leur pouvoir de phosphorylation. Cette perte était rendue négligeable par l'addition d'ascorbate aux milieux d'extraction et de lavage des chloroplastes.

Dans le schéma de la figure 5, le dernier maillon de la chaîne de transport est constitué par des cytochromes. L'introduction des cytochromes dans le schéma n'était pas basée, à cette époque, sur des faits expérimentaux, mais leur participation à la chaîne de transport semblait raisonnable.

En outre, l'ion Magnésium n'intervient pas dans le

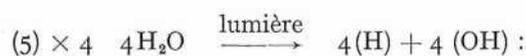
transport d'hydrogène, mais est nécessaire au couplage de la phosphorylation.

Enfin, l'équipe d'Arnon montrait qu'un extrait aqueux de chloroplastes (E. A. C.) stimulait la phosphorylation couplée au système FMN. Cette stimulation est due à la réductase photosynthétique du TPN dont nous avons déjà parlé, et à la TPNH<sub>2</sub>-diphosphorase qui catalyse le passage des hydrogènes du TPNH<sub>2</sub> au FMN (Avron, 1956).

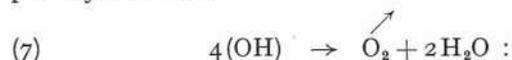
La formation d'ATP couplée au transport d'hydrogène, représenté par la figure 4 ou 5, est appelée phosphorylation photosynthétique *cyclique* parce que les hydrogènes parcourent un cycle : ils proviennent de l'eau, par photolyse, et redonnent de l'eau, en se combinant avec (O) en fin de course.

### b) Phosphorylation photosynthétique non cyclique.

Nous avons vu plus haut (chapitre II, paragraphe 6) qu'Arnon et ses collaborateurs réussirent à coupler une formation d'ATP à la réaction de Hill avec, comme oxydant, aussi bien le ferricyanure que le TPN (réactions 21 et 22). Nous savons aussi que pour expliquer la réaction de Hill on fait intervenir en premier lieu la photolyse de l'eau :



photolyse de l'eau



dégagement d'oxygène

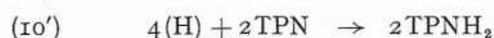


réduction de l'oxydant.

Somme (9) :



Dans le cas où TPN est l'oxydant, la réaction (10) est remplacée par 10') :



La figure 6 donne une représentation schématique de la réaction de Hill avec phosphorylation couplée (Arnon, 1959 a).

Cette représentation fait ressortir que la réaction de Hill est une réaction de transport d'hydrogène. Le donneur d'hydrogène est (H), tout comme dans le transport d'hydrogène cyclique.

(H) est formé par la photolyse de l'eau. Il se forme en même temps (OH).

Dans le transport d'hydrogène cyclique (fig. 5), (OH) jouait le rôle d'accepteur d'hydrogène final.

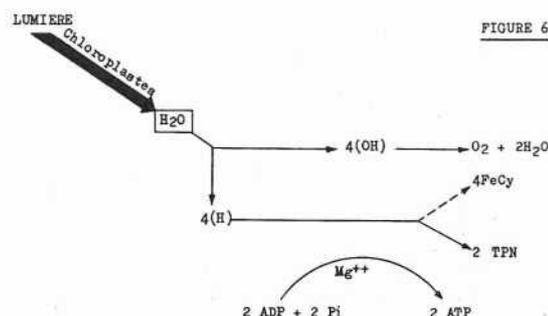


FIG. 6. — Réaction de Hill au ferricyanure ou au TPN avec photophosphorylation couplée : phosphorylation photosynthétique non cyclique (« système » ferricyanure ou « système » TPN) (Arnon, 1959 a).

Dans le transport d'hydrogène de la réaction de Hill, (OH) n'est plus l'accepteur d'hydrogène terminal : l'accepteur d'hydrogène est le ferricyanure ou le TPN. (OH) est éliminé par dégagement d'oxygène. Le transport d'hydrogène n'est donc plus cyclique. L'hydrogène de (H) ne retourne plus à (OH). Il sert à réduire le ferricyanure ou le TPN. La formation d'ATP couplée à ce transport d'hydrogène non cyclique est appelée phosphorylation photosynthétique non cyclique.

### c) Passage d'un système non cyclique à un système cyclique.

En phosphorylation photosynthétique cyclique, l'accepteur d'hydrogène est (OH) ; les hydrogènes de (H) parviennent à (OH) grâce à la présence d'un cofacteur (fig. 5). En phosphorylation non cyclique, l'accepteur d'hydrogène n'est pas (OH), mais par exemple TPN. Qu'arriverait-il si on ajoutait aux composants d'une phosphorylation photosynthétique non cyclique au TPN un cofacteur de la phosphorylation cyclique, par exemple la vitamine K ? Dans ces conditions, deux accepteurs d'hydrogène terminaux seraient en compétition : TPN et (OH). L'expérience montre que c'est (OH) qui l'emporte : dès qu'on ajoute à un système de phosphorylation non cyclique au TPN une quantité même catalytique de vitamine K, immédiatement le dégagement d'oxygène et la réduction de TPN s'arrêtent. Seule la formation d'ATP continue activement. C'est ce qui est représenté sur la figure 7.

Les hydrogènes ne vont plus au TPN ; ils empruntent maintenant la voie cyclique, via vitamine K, pour se combiner aux (OH).

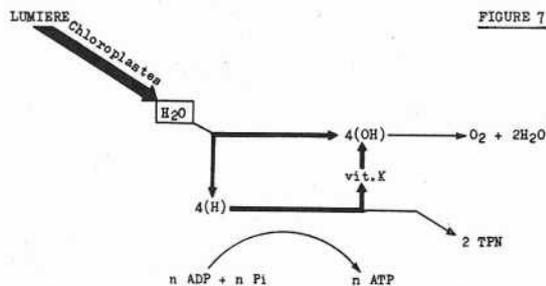


FIG. 7. — Passage de la photophosphorylation non cyclique à TPN à la photophosphorylation cyclique à vitamine K. Les traits épais représentent le trajet des électrons en présence et de TPN et de vitamine K. Dès qu'on ajoute la vitamine K au « système » TPN (fig. 6) le « système » vitamine K draine les Hydrogènes d'une façon cyclique ; le dégagement d'oxygène et la réduction du TPN cessent aussitôt, mais la phosphorylation continue.

Lorsqu'on réalise la même expérience mais en utilisant le ferricyanure au lieu du TPN (fig. 8), l'addition de vitamine K n'a aucune influence ni sur le dégagement d'oxygène, ni sur la réduction du ferricyanure, ni sur la vitesse de phosphorylation, aussi longtemps que tout le ferricyanure présent n'a pas été réduit.

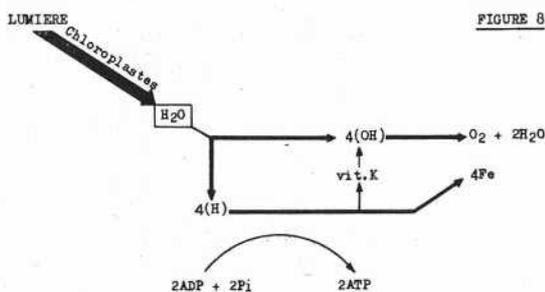


FIG. 8. — L'addition de vitamine K au « système » ferricyanure est sans influence sur ce système. Le « système » vitamine K ne deviendra fonctionnel que lorsque tout le ferricyanure aura été réduit. Les traits épais représentent le trajet des Hydrogènes en présence de ferricyanure et de vitamine K.

Dès que tout le ferricyanure est réduit, le dégagement d'oxygène s'arrête, mais la phosphorylation continue avec un rendement plus élevé, caractéristique du système cyclique. Autrement dit, tant que des ions ferricyanure sont présents, les hydrogènes ne peuvent pas prendre la voie cyclique via vitamine K. Ils servent tous à réduire le ferricyanure. Ils ne prendront la voie cyclique que lorsque tout le ferricyanure sera transformé en ferrocyanure. Donc, dans la compéti-

tion pour les hydrogènes, le ferricyanure l'emporte sur la vitamine K, alors que cette dernière l'emportait sur le TPN. Ces différences s'expliquent par les potentiels d'oxydo-réduction de ces corps (+ 0,46 v pour le système ferro-ferricyanure ; autour de 0 v pour le système vitamine K ; - 0,32 pour le système TPN/TPNH<sub>2</sub>). Un corps est d'autant meilleur accepteur d'hydrogène (ou d'électrons) que son potentiel est plus élevé.

## 2. Le problème des bactéries photosynthétiques. La photophosphorylation cyclique, dénominateur commun de la photosynthèse.

Si le mécanisme de la phosphorylation photosynthétique tel que nous venons de l'exposer est correct, il doit pouvoir être adapté à la photosynthèse bactérienne et en expliquer les particularités. Rappelons que la photosynthèse chez les bactéries est caractérisée par par deux traits :

— Il n'y a jamais dégagement d'O<sub>2</sub> : les bactéries photosynthétiques, quand elles photosynthétisent, se comportent comme des organismes anaérobies ;

— Les bactéries photosynthétiques ont besoin, dans leur milieu nutritif, d'un réducteur, H<sub>2</sub>A.

Dans le cadre de la théorie de la photolyse de l'eau considérée comme le dénominateur commun de la photosynthèse, Van Niel expliquait ces deux traits caractéristiques de la façon suivante (figure 3, voir première partie) :

a) la photolyse de l'eau produit (H) et (OH) ou, en utilisant une notation différente, XH et YOH (réaction 5'),

b) (H) sert à la réduction du CO<sub>2</sub> (réaction 16),

c) (OH), supposé toxique, ne peut être éliminé sous forme d'oxygène, car les bactéries photosynthétiques ne possèdent pas l'appareillage enzymatique nécessaire. D'où la nécessité du réducteur H<sub>2</sub>A, dont le rôle est d'éliminer les (OH) en les réduisant en H<sub>2</sub>O.

On voit que dans cette conception (H) et (OH) suivent des voies distinctes et ne se rencontrent jamais. (H) joue bien le rôle d'un donneur d'hydrogène, mais les hydrogènes donnés ne sont pas transportés vers les (OH). Autrement dit, dans cette vue, les hydrogènes ne suivent pas un trajet cyclique (fig. 3).

Or, jusqu'à présent, la formation d'ATP par les chromatophores isolés de bactéries photosynthétiques ressemble par tous ses caractères à la phosphorylation photosynthétique cyclique chez les chloroplastes : 1) elle est catalysée par les mêmes cofacteurs : PMS et vitamine K. Lorsque les chromatophores sont fraîchement prépa-

rés, ils phosphorylent néanmoins sans qu'il soit nécessaire d'ajouter un cofacteur. 2) Le dinitrophénol et l'o-phénanthroline n'inhibent pas la phosphorylation du type vitamine K chez les chloroplastes ; ces inhibiteurs n'inhibent pas non plus la phosphorylation bactérienne avec des chromatophores isolés. 3) La phosphorylation photosynthétique avec des chromatophores n'est pas accompagnée d'un dégagement d'oxygène. 4) L'ion chlorure est un cofacteur de la réaction de Hill (voir IV, 3, 1), mais il n'est pas nécessaire à la phosphorylation cyclique par les chloroplastes. Il n'est pas requis non plus pour la formation d'ATP par les chromatophores. 5) La phosphorylation par les chromatophores a lieu sans que le mélange réactionnel contienne un donneur d'hydrogène et un accepteur d'hydrogène. En particulier, la formation d'ATP par les chromatophores peut avoir lieu sans que se trouve dans le mélange réactionnel le réducteur  $H_2A$ , par ailleurs indispensable pour le développement des bactéries.

La formation d'ATP par les chromatophores bactériens, catalysée par le PMS et la vitamine K, ressemble donc étroitement à la phosphorylation photosynthétique du type PMS ou vitamine K chez les chloroplastes : c'est là une phosphorylation cyclique. La phosphorylation bactérienne, au moyen de chromatophores frais sans addition de PMS ni de vitamine K, ou au moyen de chromatophores « âgés » en présence de ces cofacteurs, cette phosphorylation doit donc être cyclique elle aussi. Autrement dit, les hydrogènes donnés par (H) se recombinaient avec (OH). Or, dans la théorie de Van Niel où la photolyse est considérée comme le dénominateur commun de la photosynthèse, les hydrogènes ne se recombinaient jamais avec les (OH). Les hydrogènes donnés par (H) servent à réduire le  $CO_2$ . On aboutit ainsi à une impasse : la formation d'ATP exige la recombinaison des produits de la photolyse de l'eau, alors que dans la théorie de Van Niel cela ne peut avoir lieu, puisque l'un de ces produits (H) sert à réduire le  $CO_2$  et que l'autre (OH) est éliminé grâce au réducteur  $H_2A$ .

Arnon et son équipe n'hésitent pas alors à formuler une hypothèse nouvelle et à abandonner celle de Van Niel. Pour eux, la formation d'ATP par les chromatophores se fait par phosphorylation photosynthétique cyclique. Cela implique que les produits de la photolyse de l'eau puissent se recombinaient : les hydrogènes de (H) se recombinaient avec les (OH) après un transport d'hydrogène cyclique. Mais dans ces conditions, les hydrogènes de (H) ne sont plus disponibles pour la réduction du  $CO_2$ . Un autre donneur d'hydrogène doit y pourvoir : c'est le réducteur  $H_2A$ , obligatoire-

ment présent dans le milieu nutritif des bactéries photosynthétiques.

Ainsi donc, dans la photosynthèse bactérienne :

1) Pour Van Niel : ce sont les hydrogènes de (H) qui servent à la réduction du  $CO_2$  ; ces hydrogènes viennent de l'eau, grâce à la photolyse ;

Pour Arnon, c'est le réducteur  $H_2A$  qui fournit les hydrogènes nécessaires à la réduction de  $CO_2$ .

2) Dans les vues de Van Niel : (OH) est éliminé par  $H_2A$ , alors que dans l'hypothèse d'Arnon (OH) disparaît par recombinaison avec (H).

3) Pour Van Niel : le dénominateur commun de la photosynthèse résidait non seulement dans la photolyse de l'eau mais encore dans l'utilisation par tous les organismes photosynthétiques des hydrogènes de l'eau pour la réduction du  $CO_2$ . Pour Arnon, à ce stade de sa pensée, la photolyse de l'eau reste commune à tous les organismes photosynthétiques, mais  $H_2O$  ne constitue plus l'origine commune des hydrogènes nécessaires à la réduction du  $CO_2$ . Pour lui, ce qui est commun à tous les organismes photosynthétiques, c'est la formation d'ATP par phosphorylation photosynthétique cyclique ; ce qui différencie les plantes vertes des bactéries photosynthétiques, c'est que les premières ont la possibilité d'utiliser les hydrogènes de l'eau pour la réduction du  $CO_2$ , alors que les deuxièmes doivent utiliser des donneurs d'hydrogène beaucoup moins répandus que l'eau, tels que l'hydrogène gazeux, le thiosulfate, l'hydrogène sulfuré, certains composés organiques (que nous avons tous désignés par  $H_2A$ ).

Pour les plantes vertes, on peut donc écrire :



et pour les bactéries photosynthétiques :



Nous retrouvons ainsi l'équation généralisée de la photosynthèse qui correspondait aux premières idées de Van Niel (première partie, chap. 6). D'après ces premières idées, les plantes vertes utilisaient l'hydrogène de l'eau pour la réduction du  $CO_2$  grâce à la photolyse de l'eau ; les bactéries photosynthétiques utilisaient l'hydrogène du réducteur  $H_2A$  pour cette réduction et il n'y avait donc pas photolyse de l'eau chez elles. Puis plus tard Van Niel, pensant que la déshydrogénation du réducteur spécifique  $H_2A$ , chez les bactéries photosynthétiques, était une réaction obscure, alors que la déshydrogénation de l'eau, le réducteur spécifique des plantes vertes, étant une réaction lumineuse, proposa pour aplanir cette différence

que, dans *tous* les organismes photosynthétiques, il y avait :

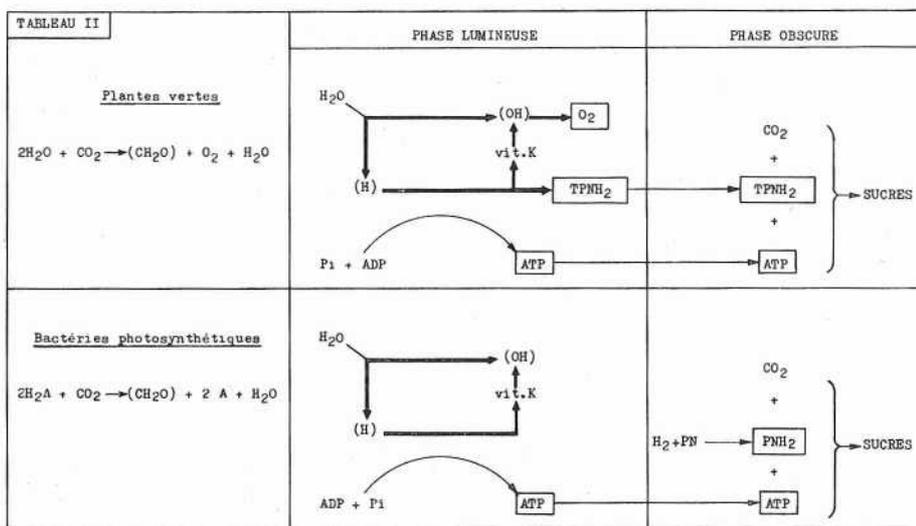
1) photolyse de l'eau et 2) utilisation, grâce à cette photolyse, des hydrogènes de l'eau pour la réduction du CO<sub>2</sub>.

Les idées d'Arnon, vers 1958, réalisaient un compromis entre les deux hypothèses précédentes de Van Niel. Arnon admettait qu'il y avait bien photolyse de l'eau chez tous les organismes photosynthétiques,

mais tous ces organismes n'utilisaient pas les hydrogènes de l'eau pour la réduction du CO<sub>2</sub>. Seules, les plantes vertes en étaient capables, alors que les bactéries photosynthétiques étaient obligées d'utiliser les hydrogènes du réducteur H<sub>2</sub>A. Ce qui restait commun à tous les organismes photosynthétiques, c'était la photolyse de l'eau et la phosphorylation photosynthétique cyclique. Le Tableau II résume les considérations précédentes.

TABLEAU II (\*)

LA PHOTOSYNTHESE CHEZ LES PLANTES VERTES ET CHEZ LES BACTÉRIES PHOTOSYNTHÉTIQUES (1958).



*Pendant la phase lumineuse :* Les plantes vertes forment de l'ATP et du TPNH<sub>2</sub>, par phosphorylation photosynthétique non cyclique ; elles peuvent aussi former leur ATP par photophosphorylation cyclique ; les bactéries photosynthétiques forment de l'ATP que par photophosphorylation cyclique.

*Pendant la phase obscure :* Les plantes vertes utilisent l'ATP et le TPNH<sub>2</sub> formés pendant la phase lumineuse pour l'assimilation du CO<sub>2</sub>. Les bactéries photosynthétiques réduisent des pyridines nucléotides à l'obscurité au moyen d'hydrogène moléculaire ; le PNH<sub>2</sub> ainsi formé à l'obscurité et l'ATP formé pendant la phase lumineuse servent à l'assimilation de CO<sub>2</sub>.

3. Mécanisme actuel de la phosphorylation photosynthétique : le transport d'électrons (Arnon, 1961 b).

a) Phosphorylation photosynthétique cyclique.

Van Niel avait été amené à faire l'hypothèse de la photolyse de l'eau chez les plantes vertes pour expliquer l'origine de l'oxygène dégagé pendant la photosynthèse. Cet oxygène lui apparaissait comme de l'eau déshydrogénée. La photolyse de l'eau, réalisée grâce à l'énergie solaire, séparait les hydrogènes de l'oxygène. L'oxygène moléculaire se dégageait et les hydrogènes réduisaient le CO<sub>2</sub>.

Bien que la photolyse de l'eau puisse sembler être un phénomène primordial chez les plantes vertes, en est-il de même chez les bactéries photosynthétiques qui, contrairement aux plantes vertes, non seulement ne dégagent pas d'oxygène, mais qui n'utilisent pas non plus les hydrogènes de l'eau pour la réduction du CO<sub>2</sub> comme nous le savons maintenant à la suite des idées d'Arnon ? Est-il nécessaire de faire intervenir H<sub>2</sub>O dans le mécanisme de la photosynthèse bactérienne, et en particulier dans la phosphorylation photosynthétique cyclique ?

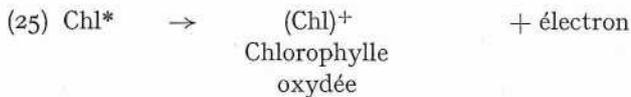
En phosphorylation photosynthétique cyclique, le seul produit de la réaction est l'ATP et il n'y a pas de raison a priori de connecter cette formation d'ATP

(\*) Suite de la numérotation de la première partie.

ni à la photolyse de l'eau, ni à la réduction de CO<sub>2</sub> (Arnon, 1959 b).

Arnon donc abandonne l'idée de la photolyse de l'eau chez les bactéries photosynthétiques et suggère un nouveau mécanisme pour la phosphorylation photosynthétique cyclique. Dans l'ancien mécanisme, la formation d'ATP était couplée à un transport d'hydrogène cyclique. Dans le nouveau mécanisme, la phosphorylation sera couplée à un transport d'électrons cyclique. « L'hypothèse la plus simple pour rendre compte de la formation d'ATP en phosphorylation photosynthétique est d'admettre que ... la formation d'une liaison pyrophosphate est couplée à la libération d'énergie libre qui se produit pendant un transport d'électron, c'est-à-dire quand un électron tombe d'un niveau énergétique élevé (celui qu'il possède dans la molécule donneur d'électron) à un niveau plus bas (celui qu'il possède après avoir rejoint la molécule accepteur d'électron) » (Arnon, 1959 b ; Arnon, 1961 a, p. 509).

Dans l'ancien mécanisme de la phosphorylation photosynthétique, celui du transport d'hydrogène, la photolyse de l'eau produisait à la fois un donneur d'hydrogène (H) et un accepteur d'hydrogène (OH). Dans la nouvelle hypothèse, le premier acte photochimique devra également produire à la fois un donneur d'électron et un accepteur d'électron. Arnon suggère que la chlorophylle, en absorbant un photon, devient excitée (réaction 24) et expulse l'un de ses électrons, amené à un niveau énergétique élevé (réaction 25). La chlorophylle excitée devient ainsi le donneur d'électron. En perdant un électron, la chlorophylle acquiert un état oxydé et devient par là même l'accepteur d'électron :



L'électron expulsé suivant (25) retourne à la chlorophylle oxydée (Chl)<sup>+</sup> par l'intermédiaire d'une série de transporteurs d'électrons. La formation d'ATP est couplée à ce transport d'électrons cyclique. Il y a une grande analogie entre ce transport d'électrons et le transport d'hydrogène envisagé antérieurement. Dans les deux cas, les transporteurs sont évidemment les mêmes : PMS, vitamine K, cytochromes. En effet, dire qu'un corps est un transporteur d'hydrogène,

c'est dire aussi que c'est un transporteur d'électrons, l'hydrogène étant le « support » de l'électron ; l'hydrogène en perdant l'électron devient un proton ou ion hydrogène, H<sup>+</sup>, qui peut passer dans le milieu. Mais un transporteur d'électrons n'est pas nécessairement un transporteur d'hydrogène ; le transport d'électrons peut avoir lieu sans que des hydrogènes interviennent : c'est le cas par exemple des cytochromes. Quand un transporteur d'électrons fonctionne avec participation de protons, ces ions hydrogènes peuvent provenir du milieu : c'est le cas par exemple de TPN, dans la réaction de Hill.

La figure 9 schématise le nouveau mécanisme de la phosphorylation photosynthétique cyclique. L'idée de ce mécanisme avait d'abord été suggérée par les travaux sur les bactéries photosynthétiques. Mais, très rapidement, Arnon n'hésita pas à suggérer le même mécanisme pour la phosphorylation photosynthétique cyclique chez les plantes vertes. En effet, si la photophosphorylation cyclique est le dénominateur commun de la photosynthèse chez tous les organismes photosynthétiques, un seul et même mécanisme doit en rendre compte, aussi bien chez les plantes vertes que chez les bactéries photosynthétiques. Le schéma de la figure 9 s'applique donc à tous les êtres photosynthétiques.

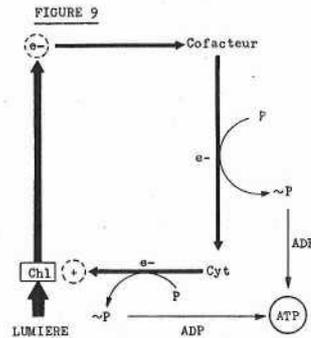


FIG. 9. — Photophosphorylation cyclique anaérobie du type vitamine K ou FMN (Système vitamine K ou système FMN) (Arnon, 1961 a).

Le chlorophylle, en absorbant un photon, devient excitée et expulse un électron. L'électron expulsé passe de la chlorophylle au cofacteur, du cofacteur aux cytochromes, et des cytochromes il retourne à la chlorophylle. Pendant ce transport cyclique d'électrons, les cofacteurs et les cytochromes subissent des réactions d'oxydo-réduction ; ces réactions sont couplées aux réactions de phosphorylation, qui produisent l'ATP.

Rôle des cytochromes.

Dans le schéma de la figure 9, un rôle important est attribué aux cytochromes. Les cytochromes restituent l'électron à la chlorophylle oxydée (Chl)<sup>+</sup>. Les raisons pour avoir inclus les cytochromes dans ce schéma

de phosphorylation photosynthétique sont de plusieurs sortes. Tout d'abord, condition *sine qua non*, il existe des cytochromes dans les chloroplastes, le cytochrome *f* et le cytochrome  $b_6$ , ainsi que dans les chromatophores, le cytochrome  $c_2$  par exemple. Ensuite, il a été montré dans divers laboratoires que les cytochromes s'oxydent (perte d'électrons !) quand on les illumine. En particulier, Nozaki, Ogata et Arnon ont montré que les cytochromes contenus dans des préparations subcellulaires de la bactérie photosynthétique *Chromatium* prenaient successivement l'état oxydé ou l'état réduit suivant qu'elles étaient éclairées ou non. (Voir Arnon, 1961 a.) En outre, ils ont montré que la vitamine K accélère la réduction du cytochrome  $C_2$ , oxydé au préalable à la lumière. (Voir Arnon, 1961 a.) Cette accélération n'a lieu qu'en présence de chromatophores. Cela signifie que la vitamine K facilite le transport des électrons vers les cytochromes en accord avec le schéma de la figure 9.

Les très récents résultats de Lundegardh sur les cytochromes des chloroplastes sont en très bon accord avec le concept d'Arnon, aux dires même de Lundegardh (Lundegardh, 1961). Celui-ci a d'abord étudié la nature et le pourcentage des cytochromes des chloroplastes isolés de diverses espèces végétales. Ensuite il a suivi les changements d'oxydo-réduction des cytochromes *c*, *f*,  $b_3$  et  $b_6$  dans les chloroplastes isolés, en réponse à l'éclairage et à l'addition de divers cofacteurs. Il arrive à la première conclusion que : « les chloroplastes contiennent deux à trois fois plus de cytochromes que les mitochondries de la même plante » et que « les cytochromes sont liés structurellement à la chlorophylle ». Puis il montre qu'à la lumière l'addition de FMN à des chloroplastes isolés amène la réduction des cytochromes, alors que ceux-ci se trouvent à l'état oxydé en l'absence de FMN. Il conclut que : « FMN diminue la résistance au transport interne des électrons de la chlorophylle excitée vers les cytochromes, résultat en accord avec la photophosphorylation [suivant Arnon] ».

L'addition de DPN à des chloroplastes illuminés augmente l'oxydation des cytochromes *f* (+ *c*) et  $b_3$  : ce fait est en accord avec l'idée que DPN, en tant qu'accepteur d'électrons, facilite l'expulsion des électrons de la chlorophylle excitée, d'où oxydation accrue des cytochromes par restitution d'électrons à la chlorophylle oxydée. L'addition de  $DPNH_2$ , au contraire, amène une réduction des cytochromes et, en particulier, une réduction plus accentuée du cytochrome  $b_3$  que du cytochrome *f*, d'où l'idée que ce cytochrome  $b_3$  serait le point de jonction entre la partie réductrice du cycle (chlorophylle → PN → cofacteur) et la partie oxydante (cytochromes → chlorophylle).

Enfin, l'addition d'ATP à des chloroplastes illuminés se traduit par une moindre oxydation du cyto-

chrome *f* : l'ATP freine le passage des électrons de ce cytochrome *f* à la chlorophylle oxydée. Ce fait milite en faveur de l'existence d'un site de phosphorylation entre le cytochrome *f* et la chlorophylle oxydée, en accord avec les idées d'Arnon.

#### Nombre de phosphorylations.

Dans le schéma de la figure 9, deux phosphorylations sont représentées pour un tour complet de l'électron. L'une est couplée à l'oxydation du cytochrome terminal par la chlorophylle oxydée ( $Chl^+$ ). L'autre a lieu lorsque l'électron passe de la vitamine K réduite (ou de cofacteurs analogues) aux cytochromes oxydés.

L'existence d'au moins deux phosphorylations par cycle est basée sur les résultats suivants de Tsujimoto, Hall et Arnon (voir Arnon, 1961 a).

Aux faibles intensités lumineuses, lorsque la lumière est limitante, les chloroplastes forment davantage d'ATP en présence de vitamine K ou de FMN qu'en présence de PMS. Aux fortes intensités lumineuses, c'est l'inverse ; la vitamine K et le FMN sont alors des cofacteurs beaucoup moins efficaces pour la phosphorylation (fig. 10).

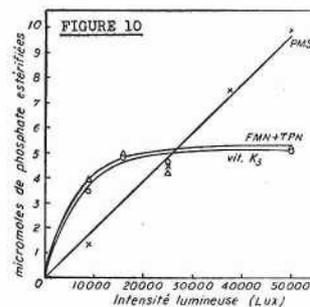


FIG. 10. — Effet de l'intensité lumineuse sur la photophosphorylation cyclique anaérobie par les systèmes PMS, FMN, et vitamine K (Arnon, 1961 a).

Cette moindre efficacité de la vitamine K et du FMN, quand la lumière n'est pas limitante, suggère que la phosphorylation associée à ces cofacteurs est freinée par un facteur limitant qui n'intervient pas dans la phosphorylation associée à PMS. Avec PMS tout se passe comme si les électrons expulsés de la chlorophylle pouvaient parcourir leur cycle un plus grand nombre de fois par unité de temps. A condition qu'il y ait de nombreux électrons disponibles (lumière non limitante), le système PMS phosphorylera davantage par unité de temps que les autres. Mais lorsque le nombre des électrons expulsés est limitant (lumière limitant) l'expérience montre que les systèmes FMN et vitamine K phosphorylent beaucoup mieux que le système PMS. Ce résultat peut s'expliquer aisément en admettant que deux phosphorylations sont associées avec les systèmes vitamine K ou FMN (fig. 9) et une seule avec le système PMS (fig. 11).

La phosphorylation couplée au passage de l'électron du cytochrome réduit à la chlorophylle oxydée (Chl)<sup>+</sup> est vraisemblablement celle qui est commune à tous les systèmes de phosphorylation cyclique. C'est elle qui est représentée dans le schéma de la figure 11,

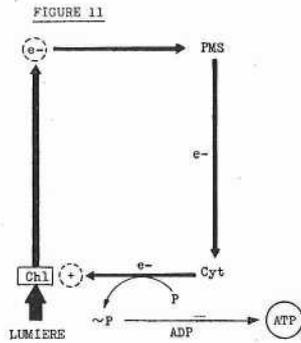


FIG. 11. — Photophosphorylation cyclique anaérobie du type PMS (« système » PMS) (Arnon, 1961 a).

pour le système PMS. Arnon la situe à cet endroit, et la couple à l'oxydation du dernier cytochrome qui transfère son électron à la chlorophylle oxydée, par analogie avec la phosphorylation oxydative, d'après Lehninger (Lehninger, 1958). Mais il n'est pas encore absolument certain que cette phosphorylation soit située entre les cytochromes et la chlorophylle. Pendant longtemps, Arnon l'a située entre (H) et les cofacteurs (fig. 5, 6, 7 ou 8). C'était à l'époque où il admettait encore l'hypothèse de la photolyse de l'eau. Avron et Jagendorf la placent toujours à cet endroit (fig. 12).

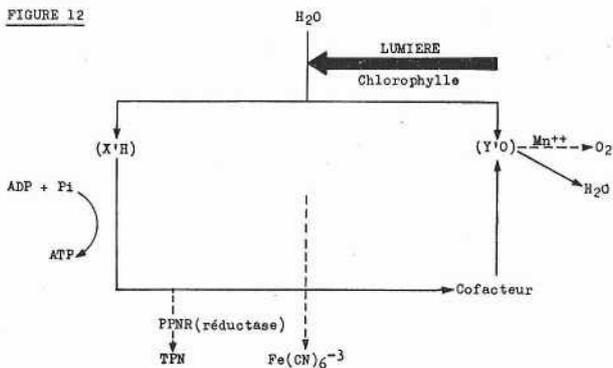


FIG. 12. — Schéma de la Photophosphorylation suivant Avron et Jagendorf (Avron, 1959).

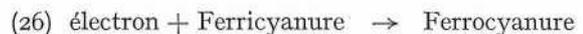
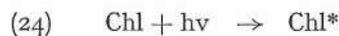
Lundegårdh, d'après ses travaux récents sur les changements d'oxydo-réduction des cytochromes dans les chloroplastes, en réponse à l'addition de divers co-

facteurs, conclut à l'existence de trois sites de phosphorylation : le premier entre la chlorophylle oxydée et le cytochrome *f*, le deuxième entre le cytochrome *f* et le cytochrome *b<sub>3</sub>*, le troisième entre le cytochrome *b<sub>3</sub>* et le cofacteur cyclique (FMN, vitamine K) (Lundegårdh, 1961). Le premier et le troisième de ces sites sont ceux-là mêmes postulés par Arnon. Quant au site de phosphorylation supplémentaire entre le cytochrome *b<sub>3</sub>* et le cytochrome *f*, nous verrons ce qu'il faut en penser au paragraphe suivant.

b) *Phosphorylation photosynthétique non cyclique chez les chloroplastes.*

Nous venons de voir que le nouveau schéma d'Arnon (fig. 9) rend parfaitement compte de la photophosphorylation photosynthétique cyclique, non seulement chez les bactéries photosynthétiques, mais également chez les plantes vertes. Au moment où ce schéma fut élaboré (1958-1959), seule la photophosphorylation cyclique était connue chez les bactéries photosynthétiques et le nouveau schéma suffisait à rendre compte de toute la photosynthèse chez les bactéries. Mais il n'en allait pas de même chez les plantes vertes, dont les chloroplastes étaient capables d'effectuer une réaction de Hill et une phosphorylation non cyclique. Comment est-ce que le nouveau schéma pouvait expliquer la réaction de Hill et la phosphorylation non cyclique couplée ?

Dans l'hypothèse de la photolyse de l'eau, la réaction de Hill s'effectuait par un transport d'hydrogène non cyclique. Dans la nouvelle hypothèse, la réaction de Hill sera caractérisée par un transport d'électrons non cyclique. L'acte photochimique primaire reste le même que dans la photophosphorylation cyclique : la chlorophylle, en absorbant un photon, devient excitée et expulse un électron (réactions 24 et 25). Mais cet électron, au lieu de retourner à la chlorophylle par voie cyclique est capté par l'oxydant de la réaction de Hill (TPN, ferricyanure, ...) et le réduit (réaction 26).



Pour que le système chlorophyllien puisse continuer à fonctionner, il faut continuellement restituer à (Chl)<sup>+</sup> des électrons, car ceux qui ont été expulsés ont servi à réduire le ferricyanure. Arnon admet que les électrons nécessaires sont fournis par les ions hydroxyls

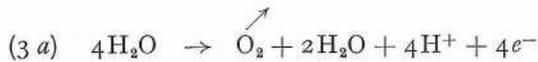
OH<sup>-</sup>, provenant d'une dissociation purement chimique de l'eau :



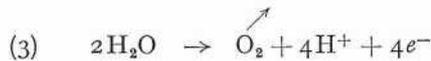
C'est par l'intermédiaire de la chaîne des cytochromes que les électrons des ions hydroxyles arrivent à la chlorophylle. En même temps que les OH<sup>-</sup> cèdent leurs électrons aux cytochromes, ils donnent lieu à un dégagement d'oxygène :



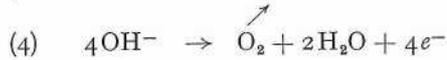
Dans cette hypothèse, pour que les ions hydroxyles puissent céder leurs électrons aux cytochromes, autrement dit pour qu'ils puissent être oxydés par ces cytochromes, il faudrait que le potentiel d'oxydo-réduction de ces cytochromes (ou d'un complexe chlorophylle-cytochrome) fût supérieur à 0,815 v, le potentiel normal à 25° et à pH 7 du système eau-oxygène, c'est-à-dire de la réaction :



que l'on peut encore écrire de la façon suivante :



ou encore, en remplaçant dans (3 a) 4 H<sub>2</sub>O par 4 OH<sup>-</sup> + 4 H<sup>+</sup>



Or, le potentiel normal du plus oxydant des cytochromes connus, présents dans les chloroplastes, le cytochrome *f*, n'est que de + 0,365 v à pH 7 et à 25°. C'est pourquoi Arnon supposa d'abord que les plantes vertes possédaient un cytochrome spécial, non encore mis en évidence, suffisamment oxydant pour utiliser l'eau comme donneur d'électrons avec dégagement simultané d'oxygène (Arnon, 1959 *b*). Les bactéries photosynthétiques, incapables de dégager de l'oxygène, n'eussent pas renfermé ce cytochrome. Ensuite, Arnon vint à admettre que le transport des électrons de OH<sup>-</sup> aux cytochromes pouvait nécessiter l'apport d'une certaine quantité d'énergie, sans toutefois préciser la nature de cette énergie (Arnon, 1961 *a*).

La figure 13 résume les considérations précédentes et schématise la phosphorylation non cyclique chez les chloroplastes dans le cas où TPN est l'accepteur d'électron ; c'est en réalité le schéma de la réaction de Hill au TPN avec phosphorylation couplée. On voit

que l'eau est toujours la source de l'oxygène dégagé, mais l'hypothèse de la photolyse de l'eau est exclue. La formation d'ATP est supposée être couplée au passage des électrons des cytochromes à la chlorophylle. Le site de cette phosphorylation est le même que dans le système PMS (fig. 11).

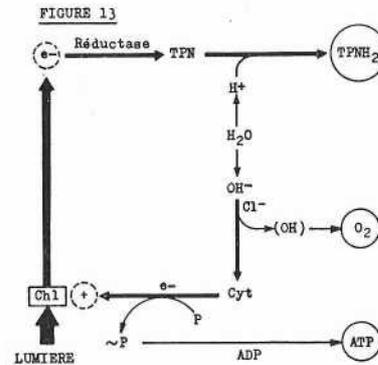


FIG. 13. — Phosphorylation non cyclique chez les chloroplastes.

La chlorophylle, en absorbant un photon, devient excitée et expulse un électron. L'électron expulsé réduit le TPN avec participation d'un proton, H<sup>+</sup>, provenant d'une ionisation purement chimique de l'eau. L'autre produit de cette ionisation, l'ion hydroxyl OH<sup>-</sup>, restitue à la chlorophylle les électrons qu'elle a perdus et donne lieu à un dégagement d'oxygène. La phosphorylation est couplée au passage des électrons des cytochromes à la chlorophylle (Arnon, 1961 *a*).

Lundegårdh semble trouver, dans ses récents travaux (Lundegårdh, 1961), des indications quant à l'existence de trois sites de phosphorylation. Nous avons vu, au paragraphe précédent, que deux de ces sites sont ceux-là même que postule Arnon dans la phosphorylation cyclique avec FMN ou vitamine K ; le troisième site serait situé entre le cytochrome *b<sub>3</sub>* (*b<sub>2</sub>*) et le cytochrome *f*. Si l'existence de ce site était confirmée, il semblerait nécessaire d'exclure le cytochrome *b<sub>3</sub>* (*b<sub>2</sub>*) de la chaîne de transport non cyclique. En effet, si cette chaîne comprenait tout le maillon (cytochrome *b<sub>3</sub>*, cytochrome *f*, chlorophylle oxydée) deux sites de phosphorylation lui seraient associés. Or, la stœchiométrie bien établie des réactions 21 ou 22 (1 ATP pour 2 électrons transportés) oblige à n'admettre qu'un seul site de phosphorylation. Dans ces conditions, le cytochrome *b<sub>3</sub>* ne participerait qu'au transport cyclique.

c) Photooxydation de l'eau par les chloroplastes.  
Existence de deux réactions lumineuses  
chez les plantes vertes.

Dans le concept illustré par la figure 13, la difficulté résidait dans l'utilisation des électrons de OH<sup>-</sup> pour

ramener la chlorophylle de son état oxydé (Chl)<sup>+</sup> à son état normal (Chl). Arnon avait été amené à faire l'hypothèse d'un cytochrome spécial chez les plantes, possédant un pouvoir oxydant suffisant pour arracher les électrons de l'eau ; il convenait même qu'une certaine quantité d'énergie pouvait être nécessaire pour pousser cette réaction. Ces difficultés et ces incertitudes viennent d'être balayées par l'équipe même d'Arnon. Ils ont pu montrer que l'utilisation de l'eau comme donneur d'électrons avec dégagement simultané d'oxygène nécessitait bien un apport d'énergie et que cette énergie était fournie par la lumière (Losada, 1961). Ils mettaient ainsi en évidence une deuxième réaction lumineuse chez les plantes vertes et ils appelèrent « photooxydation de l'eau » cette deuxième réaction. La photooxydation de l'eau est une réaction lumineuse auxiliaire grâce à laquelle les plantes vertes sont capables d'utiliser l'eau comme donneur d'électron. La figure 14 schématise cette photooxydation de l'eau.

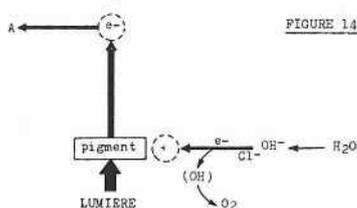


FIG. 14. — Schéma de la photooxydation de l'eau par les chloroplastes (Losada, 1961).

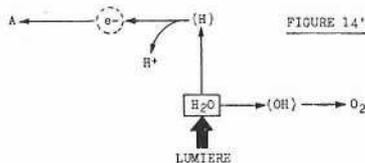


FIG. 14'. — La « deuxième » réaction lumineuse sous la forme d'une photolyse de l'eau.

La figure 15 représente le schéma complet de la phosphorylation non cyclique chez les plantes, qui combine à la fois la réaction lumineuse auxiliaire des plantes vertes (photooxydation de l'eau) et la première réaction lumineuse, celle qui est commune à tous les organismes photosynthétiques.

Dans le schéma de la figure 15, « B » est l'accepteur d'électrons de la première réaction lumineuse. Dans les conditions physiologiques, c' est le TPN, mais il peut être remplacé par le ferricyanure dans une réaction non physiologique *in vitro*. « A » est l'accepteur d'électron de la deuxième réaction lumineuse, la photooxydation de l'eau ; dès que « A » est réduit, il devient

le donneur d'électron de la première réaction lumineuse. « A » est, pour ainsi dire le point de jonction entre les deux réactions lumineuses.

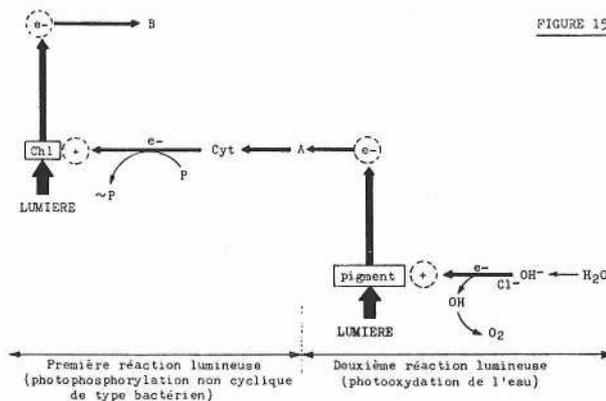


FIG. 15. — Schéma de la phosphorylation non cyclique chez les plantes vertes (Losada, 1961).

La photooxydation de l'eau est une réaction dans laquelle les électrons issus de l'eau sont amenés à un potentiel réducteur plus grand grâce à l'énergie lumineuse. Il convient de remarquer ici que cette définition peut s'appliquer aussi à cette réaction hypothétique dont nous avons tant parlé : la photolyse de l'eau. Rien ne nous empêche d'écrire la deuxième réaction lumineuse sous forme de photolyse de l'eau (fig. 14'). Photooxydation de l'eau, photolyse de l'eau, sont en réalité des noms sous lesquels se cache notre ignorance du mécanisme exact. Quoi qu'il en soit, le fait important c'est qu'il existe deux réactions lumineuses dont l'une, photooxydation ou photolyse de l'eau, est une réaction auxiliaire, caractéristique et spécifique des plantes, qui leur permet d'utiliser l'eau comme donneur d'électron.

Arnon et son équipe n'ont pas été les premiers à envisager la participation de *plusieurs* réactions lumineuses dans la photosynthèse chez les plantes vertes. Plusieurs faits expérimentaux obtenus dans divers laboratoires ne pouvaient s'interpréter qu'en faisant intervenir plus d'une réaction lumineuse.

Citons ici les travaux de Warburg (Warburg, 1955), d'Emerson (Emerson, 1958), de Myers et French (Myers, 1959). Emerson avait observé que la photosynthèse de chlorelles en lumière rouge était stimulée par de la lumière de plus courte longueur d'onde. Comme aux grandes longueurs d'onde (lumière rouge), seule la chlorophylle *a* absorbe la lumière, il concluait que le plein rendement de la photosynthèse à ces grandes longueurs d'onde dépendait de l'absorption d'une lumière de plus courte longueur d'onde par un pigment accessoire : chlo-

rophyllé *b* chez les chlorelles, ou phycobiline chez d'autres algues (Emerson, 1958). Hill et Bendall, d'après les propriétés des cytochromes dans les plantes, avaient également suggéré un mécanisme de la photosynthèse où intervenaient deux réactions lumineuses (Hill, 1960).

Les arguments d'Arnon quant à l'existence de deux réactions lumineuses ne sont pas seulement basés sur le fait qu'il est possible de les séparer l'une de l'autre, ainsi que nous le verrons plus bas, mais aussi sur des expériences effectuées en lumière monochromatique, destinées à déterminer les longueurs d'onde optima à laquelle se déroulent, d'une part la photooxydation de l'eau et, d'autre part la première réaction lumineuse (Arnon, 1961 c). L'équipe d'Arnon a pu établir que les longueurs d'onde optima ne sont pas les mêmes pour les deux réactions lumineuses et, d'après ces résultats, le pigment actif dans la photooxydation de l'eau serait plutôt la chlorophylle *b*. La chlorophylle *a*, chez les plantes, ou la bactériochlorophylle chez les bactéries seraient, elles, actives dans la première réaction lumineuse. Allen et coll. ont aussi trouvé deux réactions lumineuses chez l'algue verte *Chlorella pyrenoidosa*; l'une implique la chlorophylle *a*, l'autre la chlorophylle *b* (Allen, 1961). De même French et Fork viennent de présenter des arguments en faveur de deux réactions lumineuses chez une algue rouge *Porphyridium cruentum*; la chlorophylle *a* est active dans l'une, dans l'autre intervient un pigment accessoire, la phycoerythrine (French, 1961).

Duysens, Ames et Kamp, travaillant sur la même algue rouge, ont mis en évidence deux systèmes photochimiques, l'un responsable de la réduction des cytochromes (photooxydation suivant Arnon) et l'autre responsable de leur oxydation (première réaction lumineuse suivant Arnon) (Duysens, 1961) Witt et ses collaborateurs ont également montré spectrophotométriquement l'existence de deux réactions photochimiques dans les cellules vertes (Witt, 1961 a et 1961 b).

Tous ces résultats confirment l'existence de deux réactions lumineuses, l'une d'elles est caractérisée par la chlorophylle *a* (plantes vertes et algues) ou la bactériochlorophylle, très voisine de la chlorophylle *a* (bactéries photosynthétiques); l'autre fait intervenir la chlorophylle *b* (plantes et algues vertes) ou un pigment accessoire phycoerythrine, phycocyanine (algues rouges...)

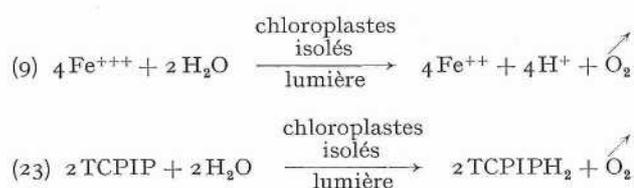
Nous allons voir maintenant comment l'équipe d'Arnon a pu séparer ces deux réactions l'une de l'autre, au moyen de chloroplastes d'épinards.

#### d) Séparation des deux réactions lumineuses chez les chloroplastes.

##### α) Déroulement de la seule photooxydation de l'eau.

L'idée de faire se dérouler la seule photooxydation de l'eau, en l'absence de l'autre réaction lumineuse, est venue à Arnon à la suite de ses expériences propres, mais

aussi grâce à certains résultats obtenus auparavant dans d'autres laboratoires. Krogmann et Vennesland (Krogmann, 1959 a) ainsi que Krogmann et Jagendorf (Krogmann, 1959 b) avaient montré que le 2,3',6-trichlorophénolindophénol (TCPIP) peut jouer le rôle d'un oxydant de Hill, c'est-à-dire qu'il est réduit à la lumière par les chloroplastes avec dégagement d'oxygène, mais qu'aucune phosphorylation n'était associée à cette réaction (Krogmann, 1959 a). (Le TCPIP à l'état oxydé est bleu en solution dans l'eau; à l'état réduit il est incolore). Pour pouvoir mesurer avec précision le dégagement d'oxygène au cours d'une réaction de Hill dans l'appareil de Warburg, il faut que la quantité totale d'oxygène dégagée au cours de la réaction soit suffisante, mettons de l'ordre de 1 micromole au minimum, cela correspond à 4 micromoles de ferricyanure d'après la réaction (9) ou à 2 micromoles de TCPIP d'après la réaction (23)



Or, 2 micromoles de TCPIP dans un volume total de 3 ml par fiole de Warburg sont une quantité trop grande: le colorant absorbe beaucoup trop de lumière au détriment des chloroplastes et, partant, il ne peut pas être réduit.

Arnon et ses collaborateurs ont tourné la difficulté d'une façon élégante, en utilisant des quantités catalytiques de TCPIP en présence de quantités non catalytiques de ferricyanure. C'est ce qui est montré dans les expériences du tableau III:

TABLEAU III  
PHOTOOXYDATION DE L'EAU (LOSADA 1961).

N°	CONDITIONS	ACCEPTEUR D'ÉLECTRON	OXYGÈNE DÉGAGÉ (microatomes)	ATP FORMÉ (micromoles)
1	ferricyanure	ferricyanure	3,3	3,5
2	ferricyanure + TCPIP	TCPIP	3,5	0,8

L'expérience 1 est une réaction de Hill classique au ferricyanure avec phosphorylation couplée; on obtient, comme nous le savons, une réduction du ferricyanure, un dégagement d'oxygène (3,3 microatomes) et une formation d'ATP (3,5 micromoles). L'expérience 2 ne diffère de l'expérience 1 que par la présence dans le mélange réactionnel d'une quantité catalytique de TCPIP (0,2 micromoles/3 ml), mais les résultats de cette expérience

sont très différents de l'expérience 1 : il y a toujours dégagement d'oxygène (3,5 microatomes) mais la phosphorylation est presque complètement supprimée (0,8 micromole contre 3,5 dans l'expérience 1). Dans l'expérience 2, l'accepteur d'électrons effectif est TCPIP, mais dès qu'il se réduit, le ferricyanure l'oxyde à nouveau par une réaction non enzymatique et indépendante de la lumière ; la réaction s'arrêtera quand tout le ferricyanure présent aura été utilisé. Les résultats de l'expérience 2 sont identiques à ceux obtenus par Krogmann et Venesland (TCPIP seul présent, pas de ferricyanure) ; en particulier la formation d'ATP est négligeable. Donc, l'expérience 2 est essentiellement une réaction de Hill avec TCPIP comme oxydant.

Quelle est la signification de cette expérience 2 au cours de laquelle il y a bien dégagement d'oxygène, alors qu'il n'y a pas phosphorylation ? S'il y a dégagement d'oxygène, c'est que l'eau est donneur d'électrons. S'il n'y a pas phosphorylation, c'est qu'il n'y a pas de transport d'électron entre les cytochromes et  $(Chl)^+$  où se trouve le site de la phosphorylation : TCPIP doit donc accepter les électrons de l'eau avant qu'ils n'atteignent les cytochromes.

Cette réduction de TCPIP par les électrons de l'eau ne se fait qu'à la lumière. Il existe donc une réaction lumineuse qui précède l'étape des cytochromes : c'est la photooxydation de l'eau, et le schéma de la figure 14 en découle.

β) *Déroulement de la seule phosphorylation non cyclique de type bactérien.*

Ayant réussi, comme nous venons de le voir, à faire se dérouler la photooxydation de l'eau sans que la première réaction lumineuse prenne place, Arnon et son équipe allaient, pour vérifier le bien-fondé de leur raisonnement, essayer de réaliser la proposition com-

plémentaire : faire se dérouler la première réaction lumineuse en l'absence de la photooxydation de l'eau : c'est ce que nous allons voir maintenant.

Pour amener les chloroplastes à n'effectuer que la première réaction lumineuse, il faut d'abord supprimer la photooxydation de l'eau et ensuite substituer à l'eau un autre donneur d'électron.

*Suppression de la photooxydation de l'eau.*

Il existe plusieurs moyens d'inhiber la photooxydation de l'eau. Le test de cette inhibition, c'est l'absence de dégagement d'oxygène. Parmi les inhibiteurs qui suppriment l'évolution d'oxygène, sans toutefois inhiber les réactions de phosphorylation proprement dites, autrement dit dont l'action s'exerce spécifiquement sur la seule photooxydation de l'eau, citons les deux herbicides : 3-(p-chlorophényl)-1,1-diméthylurée (CMU ou Monuron) et 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée (DCMU ou Diuron) dont l'action herbicide s'explique vraisemblablement d'ailleurs par l'inhibition de la photosynthèse au niveau de la photooxydation de l'eau. Un autre moyen d'empêcher la photooxydation de l'eau d'avoir lieu, c'est d'effectuer l'expérience en l'absence des ions chlorure (voir IV, 3, 1). L'expérience 2 du tableau IV montre l'effet combiné de la présence de CMU et de l'absence de  $Cl^-$  sur la réaction de Hill au TPN avec phosphorylation couplée ; par rapport à l'expérience 1 où  $Cl^-$  est présent et où CMU est absent (conditions normales), il n'y a plus, dans cette expérience 2, ni dégagement d'oxygène, ni réduc-

TABLEAU IV

PHOSPHORYLATION NON CYCLIQUE DE TYPE BACTÉRIEN CHEZ LES CHLOROPLASTES (LOSADA, 1961).

N°	CONDITIONS	DONNEUR D'ÉLECTRON « A »	OXYGÈNE DÉGAGÉ (microatomes)	TPN réduit (micromoles)	ATP formé (micromoles)
1	Absence du CMU ..... Addition de $Cl^-$ .....	$H_2O$	3,0	3,4	2,4
2	Addition de CMU ..... Absence de $Cl^-$ .....	Pas de donneur d'électron	0	0,5	0,2
3	Addition de CMU et de DCPIP réduit (*) Absence de $Cl^-$ .....	DCPIP réduit	0	3,2	3,4

(\*) En pratique, on utilise des quantités catalytiques de DCPIP que l'on maintient réduit au moyen de quantités non catalytiques d'ascorbate. La réaction s'arrêtera lorsque tout l'ascorbate aura donné ses électrons.

tion de TPN, ni phosphorylation couplée. Ces résultats s'expliquent aisément : l'utilisation des électrons de l'eau est bloquée par l'absence de  $\text{Cl}^-$  et la présence de CMU ; il n'y a donc pas transport d'électrons de  $\text{OH}^-$  à « B » (fig. 15) : TPN (« B » dans la figure 15) ne peut être réduit et il ne peut y avoir phosphorylation.

#### *Phosphorylation non cyclique de type bactérien.*

Ayant ainsi supprimé l'utilisation des électrons de l'eau pour la réduction ultime de « B » (fig. 15) il faut trouver un autre donneur d'électron. Grâce aux travaux de Krogmann et Vennesland (Krogmann, 1959 a), de Jagendorf et Margulies (Jagendorf, 1960), et de Vernon et Zaugg (Vernon, 1960) de tels corps sont connus : ce sont le 2,6-dichlorophénol-indophénol réduit (DCPIP- $\text{H}_2$ ) et le 2,6,3' trichlorophénol-indophénol réduit (TCPIP- $\text{H}_2$ ).

En pratique, au lieu d'utiliser le DCPIP réduit en quantités suffisantes, non catalytiques, on utilise des quantités catalytiques de DCPIP que l'on maintient réduit au moyen de quantités non catalytiques d'ascorbate. L'expérience 3 du tableau IV montre que, dans ces conditions, c'est-à-dire lorsque le système DCPIP + ascorbate fournit les électrons à la place de l'eau dont la photooxydation est bloquée par CMU et l'absence de  $\text{Cl}^-$ , il y a réduction du TPN et phosphorylation, sans dégagement d'oxygène.

La figure 16 schématise le transport des électrons et la phosphorylation couplée dans l'expérience 3. Dans ce schéma, « A<sup>-</sup> » joue le rôle de DCPIP- $\text{H}_2$  et « B » celui de TPN.

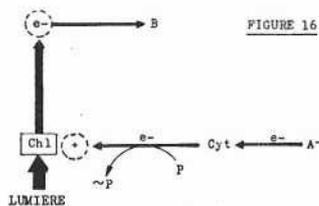


FIG. 16. — Schéma de la photophosphorylation non cyclique de type bactérien (Losada, 1961).

Dans cette expérience 3, le transport des électrons est non cyclique : ils sont donnés par le DCPIP réduit et acceptés par le TPN ; la phosphorylation, elle aussi, est non cyclique, mais la nouveauté, par rapport au transport non cyclique que nous avons rencontré jusqu'à présent, c'est qu'il n'y a plus dégagement d'oxygène. *La particularité principale de la photosynthèse chez les plantes vertes, le dégagement d'oxygène, est perdu.* Cette absence de dégagement d'oxygène fait

immédiatement penser aux bactéries photosynthétiques chez lesquelles il n'y a jamais production d' $\text{O}_2$ . Ainsi ces chloroplastes qui, partiellement diminués, par un artifice expérimental (présence de CMU et absence de  $\text{Cl}^-$ ), ne sont plus capables d'émettre de l'oxygène, mais qui possèdent toujours le pouvoir de réduire le TPN et de former de l'ATP, ne seraient-ils pas à l'image de ce que sont en réalité les chromatophores des bactéries photosynthétiques ?

Effectivement, Arnon et ses collaborateurs ont pu montrer que les chromatophores de *Rhodospirillum rubrum* ont le pouvoir de réduire le TPN à la lumière, à condition de leur fournir un donneur d'électrons tel que le succinate (Arnon, 1961 b). Ils ont ainsi réalisé avec des chromatophores un transport d'électrons non cyclique absolument semblable à celui obtenu avec des chloroplastes « diminués » utilisant le DCPIP réduit comme donneur d'électron à la place de l'eau. De plus, des expériences très récentes de l'équipe d'Arnon ont indiqué que ce transport d'électron non cyclique dans les chromatophores de *R. rubrum* donne lieu à une formation couplée d'ATP. Le schéma de la phosphorylation non cyclique de la figure 16 s'applique donc aussi bien aux chromatophores bactériens qu'aux chloroplastes. C'est pourquoi cette formation d'ATP a été dénommée *photophosphorylation non cyclique de type bactérien* par Arnon. C'est elle qui constitue le dénominateur commun de la photosynthèse chez les plantes vertes et chez les bactéries. La différence fondamentale entre ces deux catégories d'organismes réside dans la photooxydation de l'eau. Grâce à cette réaction lumineuse auxiliaire, les plantes vertes peuvent utiliser l'eau comme donneur d'électron, pour la réduction de TPN, alors que les bactéries photosynthétiques, dépourvues des pigments et des enzymes nécessaires à la photooxydation de l'eau, doivent utiliser d'autres donneurs d'électrons. Nous allons maintenant examiner de plus près la nature de ces donneurs d'électrons bactériens et la façon dont ils sont utilisés par les bactéries photosynthétiques.

#### e) *Les réducteurs des bactéries photosynthétiques.*

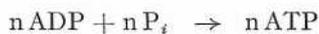
Nous avons déjà vu, dans la première partie de cet article, et nous l'avons répété ici, que les bactéries photosynthétiques ont besoin, dans leur milieu nutritif, d'un réducteur. Nous savons maintenant pourquoi : elles ont l'infériorité, par rapport aux plantes vertes, de ne pouvoir utiliser les électrons de  $\text{OH}^-$  pour la réduction des pyridines nucléotides (DPN ou TPN) et elles sont obligées d'avoir recours à d'autres réducteurs. Les réducteurs qu'elles peuvent utiliser

sont nombreux. Ainsi *Chromatium* se développe sur l'hydrogène gazeux, le thiosulfate, le succinate... Grâce à ces réducteurs, DPN (ou TPN) sera réduit en DPNH<sub>2</sub> (ou TPNH<sub>2</sub>). Ces pyridines nucléotides réduits, en conjonction avec l'ATP formé par phosphorylation photosynthétique, vont permettre l'assimilation du CO<sub>2</sub>.

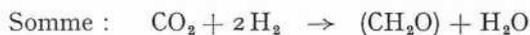
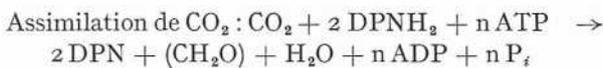
Quand l'hydrogène gazeux est utilisé comme réducteur, la réduction des pyridines nucléotides peut s'accomplir à l'obscurité. En effet, Ogata, Nozaki et Arnon ont montré que les chromatophores de *Chromatium* contiennent une hydrogénase qui réduit DPN ou TPN au moyen de H<sub>2</sub> à l'obscurité (voir Arnon, 1961 a). Donc *Chromatium* n'a pas besoin de lumière pour réduire les pyridines nucléotides quand l'hydrogène gazeux est utilisé comme réducteur. Le rôle de la lumière dans ce cas se réduit à la formation d'ATP par photophosphorylation cyclique. La photosynthèse de *Chromatium*, en présence de H<sub>2</sub>, peut donc être résumée de la façon suivante :

*Phase lumineuse :*

Phosphorylation cyclique :



*Phase obscure :*



C'est ce que nous avons déjà vu dans le tableau II.

L'hydrogène gazeux peut réduire DPN ou TPN à l'obscurité, c'est-à-dire sans apport supplémentaire d'énergie, parce que c'est un réducteur plus « fort » que DPNH<sub>2</sub> ou TPNH<sub>2</sub> : le potentiel normal, à pH 7, du système H<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> est de -0,42 v ; celui du système DPNH<sub>2</sub>/DPN est de -0,32 v.

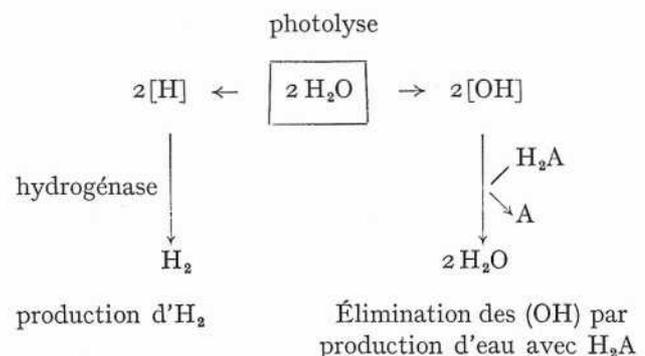
Il n'en est pas de même avec d'autres réducteurs tels que thiosulfate et succinate, qui sont dans l'impossibilité de réduire les pyridines nucléotides à l'obscurité ; les électrons fournis par ces substances ont un potentiel réducteur insuffisant. Ces réducteurs peuvent néanmoins servir à réduire les pyridines nucléotides grâce au transport non cyclique de type bactérien (Arnon, 1961 b). Dans ce cas, le thiosulfate ou le succinate jouent le rôle du donneur d'électrons « A<sup>-</sup> » de la figure 16 et, par l'intermédiaire des cytochromes, ils servent à ramener la chlorophylle oxydée (Chl)<sup>+</sup> à

l'état normal. A l'appui de ce mécanisme, Nozaki, Ogata et Arnon ont montré que les chromatophores de *Chromatium* contiennent la succinate-déshydrogénase et que, grâce à cette enzyme, le succinate peut réduire, à l'obscurité, les cytochromes de *Chromatium* (voir Arnon, 1961 a). Le thiosulfate également peut réduire les cytochromes à l'obscurité (Arnon, 1961 b). Les cytochromes ainsi réduits peuvent alors réduire à leur tour la chlorophylle oxydée qui, ainsi revenue à son état fondamental, peut à nouveau absorber un photon et expulser un électron : le succinate ou le thiosulfate sont à l'origine de cet électron. Le thiosulfate peut également réduire les cytochromes à l'obscurité (Arnon, 1961 b).

Ainsi donc les réducteurs des bactéries photosynthétiques peuvent être répartis en deux catégories. Ceux de la première, tels que l'hydrogène gazeux et le malate, peuvent réduire le pyridine nucléotide à l'obscurité ; ceux de la deuxième, tels que succinate et thiosulfate, sont incapables de réduire le pyridine nucléotide sans un apport d'énergie lumineuse. Dans ce dernier cas, l'énergie lumineuse ne sert pas seulement à former des liaisons phosphates à haute énergie de l'ATP, mais encore à élever les électrons du succinate ou du thiosulfate à un potentiel réducteur beaucoup plus élevé, équivalant à celui de l'hydrogène gazeux.

#### f) Photoproduction d'hydrogène chez les bactéries photosynthétiques.

La notion de transport d'électrons non cyclique chez les bactéries photosynthétiques (fig. 16) s'est révélée extrêmement fructueuse pour expliquer certains faits expérimentaux et en découvrir d'autres. Parmi ces faits, il y avait celui de la production d'hydrogène moléculaire, H<sub>2</sub>, par les bactéries photosynthétiques éclairées (Gest, 1949). On pensait que cet hydrogène provenait de la photolyse de l'eau de la manière suivante (Gest, 1957, p. 252) :



Dans la théorie du transport d'électron suivant Arnon la photolyse de l'eau n'intervient pas. D'après cette théorie, l'hydrogène gazeux ne peut donc pas provenir de H<sub>2</sub>O. Par contre, le transport d'électron non cyclique de type bactérien (fig. 16) offre une explication aisée de la photoproduction d'hydrogène, les électrons expulsés de la chlorophylle (après absorption d'un photon) sont utilisés à réduire les ions H<sup>+</sup> ; cette réduction est médiée par l'hydrogénase. En d'autres mots, ce sont les ions H<sup>+</sup> qui, ici, jouent le rôle de l'accepteur « B » de la figure 16. Le donneur d'électron (A<sup>-</sup> dans la figure 16) peut être le succinate, mais aussi le thiosulfate, et c'est l'équipe d'Arnon qui a montré pour la première fois qu'un réducteur inorganique, tel que le thiosulfate, pouvait être utilisé pour une photoproduction d'hydrogène (Arnon, 1961 b). Jusque-là, on pensait que la présence d'un réducteur organique était indispensable à la production d'hydrogène. La figure 17 schématise le dégagement d'hydrogène suivant la théorie du transport d'électrons.

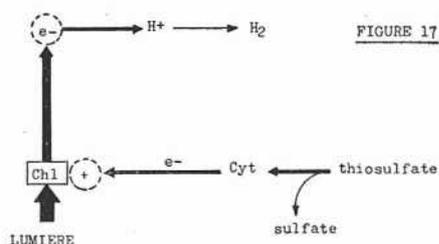


FIG. 17. — Photoproduction d'hydrogène chez *Chromatium*.

Dire, comme nous l'avons fait quelques lignes plus haut, que l'hydrogène dégagé ne provient pas de H<sub>2</sub>O n'est pas rigoureusement correct : les ions H<sup>+</sup> peuvent provenir de l'eau par ionisation mais les électrons nécessaires à la réduction des ions H<sup>+</sup> en hydrogène gazeux ne viennent pas de l'eau : ils sont fournis par le succinate, le thiosulfate, ...

g) *Photofixation d'azote*  
chez les bactéries photosynthétiques.

La photofixation d'azote par les bactéries photosynthétiques peut s'expliquer également par le mécanisme du transport d'électrons. Dans ce cas, l'accepteur d'électrons (« B » dans la figure 16) est l'azote ; le donneur d'électron (A<sup>-</sup> dans la figure 16) est, comme au paragraphe précédent, le thiosulfate ou le succinate (Arnon, 1961 b). Avec le thiosulfate, la photofixation d'azote par *Chromatium* est grandement stimulée par la présence d'oxalacétate qui sert très vraisemblable-

ment d'accepteur pour le groupement — NH<sub>2</sub>, produit de la fixation d'azote. Le succinate, au contraire, fournit à la fois l'électron pour la fixation d'azote et le squelette carboné sur lequel — NH<sub>2</sub> pourra se fixer.

h) *Les réactions lumineuses non cycliques*  
chez les bactéries photosynthétiques et les plantes vertes :  
résumé.

Par le mécanisme du transport d'électrons non cyclique, les bactéries photosynthétiques sont donc capables, grâce à l'énergie lumineuse, d'utiliser des réducteurs tels que le thiosulfate et le succinate pour la réduction du pyridine nucléotide, la production d'hydrogène gazeux et la fixation d'azote. La figure 18

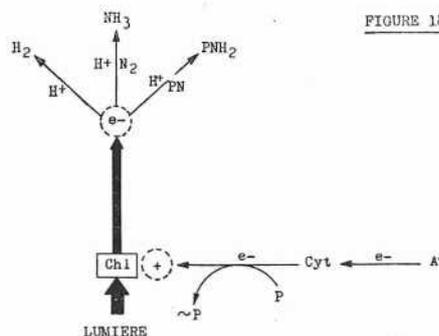


FIG. 18. — Schéma du transport d'électrons non cyclique chez *Chromatium* (Arnon, 1961 b).

schématise l'ensemble de ces trois réactions. Elle montre que l'électron expulsé de la chlorophylle peut réduire PN, H<sup>+</sup> ou N<sub>2</sub>. Chez les plantes vertes, l'absorption d'un photon par la chlorophylle résulte également en l'expulsion d'un électron, mais alors que cet électron peut réduire les pyridines nucléotides, il ne peut pas servir à la réduction de H<sup>+</sup> ou de N<sub>2</sub>, car les plantes vertes ne possèdent pas les enzymes qui y sont nécessaires, hydrogénase ou nitrogénase (\*). Par contre, les plantes vertes possèdent une réaction lumineuse auxiliaire, la photooxydation de l'eau, qui leur permet d'utiliser H<sub>2</sub>O comme donneur d'électron ; cette réaction n'existe pas chez les bactéries photosynthétiques.

(\*) Arnon et ses collaborateurs ont réussi très récemment à obtenir un dégagement d'hydrogène gazeux avec des chloroplastes isolés en leur ajoutant l'hydrogénase extraite de *Chromatium* (Arnon D. I., Mitsui A., et Faneque A., Science, 134 (1961) 1425). Cette expérience apporte un argument puissant en faveur de la théorie d'Arnon suivant laquelle l'acte photochimique primaire est essentiellement le même chez les plantes vertes et chez les bactéries photosynthétiques.

i) *Photophosphorylation catalysée par l'oxygène chez les chloroplastes : photophosphorylation pseudo-cyclique aérobie.*

Lorsque Arnon et ses collaborateurs découvrirent la phosphorylation photosynthétique cyclique, ils trouvèrent que cette réaction était grandement stimulée par l'oxygène. Ensuite, en effectuant la réaction dans des conditions améliorées, en présence de cofacteurs nouvellement mis en évidence (FMN, vit. K,  $Mg^{++}$ ), ils s'aperçurent que la photophosphorylation se déroulait parfaitement bien en atmosphère d'azote et ils conclurent que la formation d'ATP par les chloroplastes était une réaction anaérobie, indépendante de l'oxygène. En 1959, Nakamoto, Krogmann et Venesland expliquèrent ces résultats en mettant en évidence que l'oxygène stimule la phosphorylation cyclique catalysée par FMN lorsque ce cofacteur est présent en très faibles quantités, en concentrations suboptima ( $10^{-5}$  M), alors que cette stimulation disparaît aux concentrations optima du cofacteur ( $2 \cdot 10^{-4}$  M). La figure 19 résume ces résultats (Nakamoto, 1959).

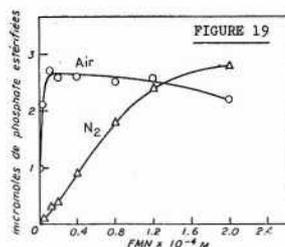


FIG. 19. — Effet de l'oxygène de l'air sur la photophosphorylation catalysée par FMN, en fonction de la concentration de FMN (d'après NAKAMOTO, 1959).

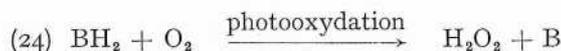
Une caractéristique remarquable de ce système, c'est que la stimulation exercée par l'oxygène n'est pas accompagnée d'une absorption apparente de ce gaz : pendant que la réaction se déroule dans la fiole de Warburg, on n'observe aucune variation dans le manomètre rattaché à cette fiole.

Tous ces résultats peuvent s'expliquer aisément de la façon suivante :

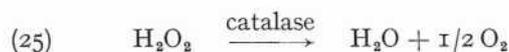
En présence de faibles quantités de certains cofacteurs (FMN, vitamine K, ...) l'oxygène sert à réoxyder la forme réduite du cofacteur qui, ainsi oxydé, peut à nouveau accepter les électrons expulsés de la chlorophylle. Dans le schéma du transport d'électrons cyclique anaérobie (fig. 9) ce sont les cytochromes qui, normalement, réoxydent le cofacteur. Pour que les cytochromes se montrent pleinement efficaces dans cette réoxydation du cofacteur, il faut que ce dernier

soit présent en quantité suffisante, optimum pour le transport d'électrons cyclique anaérobie. En présence de quantités suboptima de cofacteur, l'oxygène se montre beaucoup plus efficace que les cytochromes dans cette réoxydation (\*).

Trebst et Eck ont précisé, très récemment, le mécanisme par lequel l'oxygène réoxyde le cofacteur (Trebst, 1961 b). Il ne s'agit pas d'une réaction enzymatique, mais d'une photooxydation sensibilisée par la chlorophylle. Cette photooxydation donne lieu à une formation d'eau oxygénée,  $H_2O_2$ , suivant la réaction (24) où  $BH_2$  représente le cofacteur réduit :

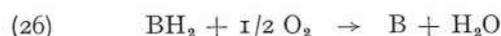


Dans un deuxième temps,  $H_2O_2$  est décomposé en eau et oxygène, suivant la réaction (25), grâce à la catalase présente dans les chloroplastes :



La formation d'eau oxygénée par les chloroplastes illuminés a été observée pour la première fois par Mehler. Cette réaction porte le nom de réaction de Mehler (Mehler, 1951).

Dans la réaction (24) une molécule d'oxygène est absorbée ; dans la réaction (25) une demi-molécule d'oxygène est dégagée. Globalement, cela se traduit par la disparition d'une demi-molécule d'oxygène, comme le montre la réaction (26), somme de (24) et de (25) :



On voit qu'en définitive les électrons expulsés de la chlorophylle ont servi à réduire l'oxygène pour donner de l'eau ; ils ne peuvent donc pas retourner à la chlorophylle. Pour que le système chlorophyllien puisse continuer à fonctionner, il faut lui restituer des électrons : c'est là le rôle de la photooxydation de l'eau, dont le déroulement se traduit par un dégagement d'oxygène. Ainsi donc, à l'une des extrémités de la chaîne de transport (fig. 15, côté « B »), il y a absorption d'oxygène ; à l'autre extrémité il y a dégagement d'oxygène, et la quantité dégagée est exactement égale à la quantité absorbée ; il ne peut donc y avoir variation de pression. Tout se passe comme si aucun échange gazeux n'intervenait ; il semble que

(\*) Il semble bien que cette plus grande efficacité de l'oxygène à réoxyder les cofacteurs réduits ne se manifeste pas seulement aux faibles concentrations des cofacteurs mais aussi à des concentrations plus élevées, de l'ordre de celles qui, sous atmosphère d'azote, catalysent le transport d'électron cyclique anaérobie.

l'on ait affaire à un transport d'électrons cyclique, alors qu'en réalité il s'agit d'un transport non cyclique. Des expériences au moyen d'oxygène enrichi en isotope lourd  $^{18}\text{O}_2$  ont montré l'exactitude de cette explica-

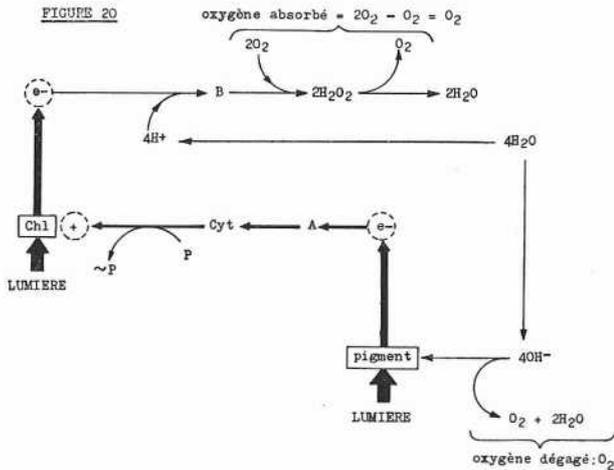


FIG. 20. — Photophosphorylation non cyclique catalysée par l'oxygène. Photophosphorylation pseudocyclique aérobie.

tion (Nakamoto, 1960; Krall, 1961). La figure 20 schématise la phosphorylation « cyclique » catalysée par l'oxygène. Nous l'appellerons désormais « photophosphorylation pseudo-cyclique aérobie ».

Nous avons vu précédemment que le CMU et l'o-phénanthroline inhibent la photooxydation de l'eau (IV, 3, d). Ces composés doivent donc inhiber également la photophosphorylation pseudo-cyclique aérobie, puisque la photooxydation de l'eau fait partie intégrante de ce système. C'est effectivement ce que l'expérience a révélé (Nakamoto, 1959; voir Arnon, 1961 a; Trebst, 1961 b).

Par contre, en l'absence d'oxygène (1), le CMU ou l'o-phénanthroline n'inhibent pas la phosphorylation car, dans ces conditions, le transport d'électrons est cyclique et ne fait pas intervenir la photooxydation de l'eau (Nakamoto, 1959; voir Arnon, 1961 a; Trebst, 1961 b).

Nous verrons plus loin (IV, 3, l) que l'ion chlorure est un cofacteur de la photooxydation de l'eau. Son absence inhibe cette réaction. L'expérience montre que, comme il faut s'y attendre, l'absence des ions chlorures inhibe également la photo-phosphorylation pseudo-cyclique aérobie (voir Arnon, 1961 a).

FMN, vitamine K, sont des cofacteurs qui peuvent catalyser aussi bien la photophosphorylation cyclique

anaérobie (fig. 9) que la photophosphorylation pseudo cyclique aérobie (fig. 20). Quelles sont les conditions sous lesquelles ces cofacteurs catalyseraient l'une de ces phosphorylations sans catalyser l'autre et vice versa? En l'absence d'oxygène, sous atmosphère d'azote par exemple, il est bien évident que le système pseudo-cyclique, aérobie par nature, ne peut avoir lieu. L'azote utilisé pour réaliser une atmosphère anaérobie peut cependant renfermer des traces d'oxygène comme impureté. Il semblerait très probable que ces faibles quantités d'oxygène suffisent déjà à faire fonctionner le système pseudo-cyclique avec certains cofacteurs, tels que FMN. En présence d'oxygène, le système cyclique anaérobie, aussi bien que le système pseudo-cyclique aérobie, sont théoriquement en mesure de fonctionner. Mais il semble bien que ce soit le système pseudo-cyclique aérobie qui l'emporte sur le système cyclique anaérobie, non pas seulement aux très faibles concentrations des cofacteurs, mais aussi pour des concentrations plus grandes, de l'ordre de celles qui sont optima pour la phosphorylation cyclique anaérobie.

#### j) Rôle des phénol indophénols.

Nous avons déjà parlé à plusieurs reprises du DCPIP et du TCPIP. Ainsi nous savons que ces colorants sont réduits par les chloroplastes à la lumière et qu'au cours de cette réaction, il n'y a pas phosphorylation (IV, 3, d). C'est d'ailleurs ce résultat qui a suggéré à Arnon l'idée de la photo-oxydation de l'eau. Pour lui, TCPIP et DCPIP sont réduits directement par les électrons provenant de la photo-oxydation de l'eau: ces colorants jouent le rôle de « A » dans la figure 14.

Trebst vient de mettre en évidence une deuxième fonction pour ces colorants (Trebst, 1961 b). Il a pu montrer que ces corps sont des cofacteurs de la phosphorylation cyclique anaérobie à condition qu'ils soient utilisés sous leur forme réduite.

Normalement, le DCPIP et le TCPIP se présentent sous la forme oxydée qui, en solution, donne une coloration bleue. Pour utiliser ces colorants comme cofacteurs d'une phosphorylation cyclique anaérobie (fig. 9) il faut les réduire au préalable. Cette réduction peut être effectuée de diverses manières: on peut réduire DCPIP ou TCPIP, comme nous venons de le rappeler, par les chloroplastes à la lumière suivant le schéma de la figure 14 (photo-oxydation de l'eau) ou bien on peut les réduire chimiquement, par l'ascorbate par exemple. Dès que la réduction est achevée, autrement dit dès que la coloration bleue du mélange réactionnel a disparu, la phosphorylation cyclique commence. Aussi longtemps que le mélange reste bleu, donc aussi longtemps qu'il subsiste du phénol indophénol sous la forme oxydée, il n'y a pas phosphorylation. (Dire que les phénol-indophénols agissent ici par leur forme réduite n'exclut pas qu'une très faible quantité de ces corps existe sous la forme oxydée; cela est même indispensable à leur fonctionnement comme transporteur d'électrons.)

(1) Et à condition que le cofacteur de phosphorylation soit présent sous sa forme réduite. (Voir IV, 3, k).

Les phénol-indophénols peuvent jouer un troisième rôle : ils peuvent catalyser une phosphorylation pseudo-cyclique aérobie ; dans ce système, c'est également la forme réduite qui est active. L'idée que les phénol-indophénols réduits catalysent le système pseudo-cyclique est basée sur la stimulation qu'exerce, sur la phosphorylation, une atmosphère d'oxygène par rapport à une atmosphère d'azote. Cette stimulation a d'abord été étudiée par Krogmann et Venesland (Krogmann, 1959 a) ; ils appelaient phosphorylation photosynthétique « oxydative » ce système qui n'est en réalité rien d'autre qu'un système pseudo-cyclique. Dans leur cas, il n'y avait pas phosphorylation en l'absence d'oxygène : il leur semblait que l'oxygène était un facteur indispensable pour leur phosphorylation. Trebst a pu montrer qu'il n'en est pas tout à fait ainsi : la phosphorylation est plus que doublée en présence d'oxygène, mais elle atteint néanmoins une valeur appréciable sous azote (Trebst, 1961 b). En présence d'oxygène, on a affaire essentiellement à un système pseudo-cyclique aérobie, alors qu'en atmosphère d'azote c'est le système cyclique anaérobie qui se déroule.

Les phénol-indophénols peuvent tenir un quatrième rôle : nous l'avons décrit en détail à l'occasion de la phosphorylation non cyclique anaérobie de type bactérien (fig. 16) : les phénol-indophénols réduits peuvent servir de donneurs d'électrons pour la « première » réaction lumineuse, à la place de la photo-oxydation de l'eau inhibée expérimentalement. Dans le schéma de la figure 16, « A » représente DCPIP ou TCPIP réduits ; « B » tient la place du TPN ; précisons à nouveau que, dans ce système, la photo-oxydation de l'eau est inhibée par CMU et l'absence des ions chlorure. C'est ce système que l'équipe d'Arnon a utilisé pour séparer la première réaction lumineuse de la photo-oxydation de l'eau. Remarquons que dans ce système c'est encore la forme réduite du phénol-indophénol qui intervient : le colorant (0,2 micro-moles) est maintenu réduit par la présence d'ascorbate en excès (20 micro-moles). De plus, dans ce système, TPN est indispensable ; il sert d'accepteur d'électrons (B dans la figure 16) ; en l'absence de TPN, il n'y a pas phosphorylation. Cette absence de phosphorylation est parfaitement en accord avec l'idée que TPN est indispensable au fonctionnement du système ; mais elle est, dans une certaine mesure, en contradiction avec la notion que les phénol-indophénols réduits catalysent une phosphorylation cyclique anaérobie. En effet, en l'absence de TPN, les autres conditions étant maintenues (rappelons-les :

— présence de DCPIP réduit (0,2 micro-moles) et d'un large excès d'ascorbate (20 micro-moles) ;

— présence de CMU et absence de  $\text{Cl}^-$  : photo-oxydation de l'eau impossible ;

— atmosphère d'azote)

dans ces conditions, les chloroplastes devraient donner lieu à une photophosphorylation anaérobie catalysée par DCPIP réduit (Trebst, 1961 b). Or, il n'en est rien. Il semble que ce soit le trop grand excès d'ascorbate (réducteur du DCPIP) qui inhibe la photophosphorylation dans ce cas. Une inhibition analogue a déjà été signalée par Krogmann (Krogmann, 1960). Quand l'ascorbate n'est pas en grand excès par rapport au DCPIP réduit (1 micro-moles d'ascorbate pour 0,5 micro-moles de DCPIP), la photophosphorylation cyclique anaérobie a lieu (Trebst, 1961 b).

Cette photophosphorylation cyclique ainsi obtenue, en présence de CMU et sous atmosphère d'azote peut aussi se dérouler à l'air comme le montrent les résultats de Trebst (Trebst, 1961 b). Ainsi donc DCPIP réduit peut catalyser, en présence de CMU, une photophosphorylation cyclique de type anaérobie, aussi bien à l'air que sous atmosphère d'azote. La photophosphorylation cyclique de type anaérobie obtenue en présence d'oxygène constituerait d'après Trebst, ce que Krogmann (Krogmann, 1959 a) a appelé photophosphorylation photosynthétique oxydative en présence de CMU. Krogmann parle aussi de phosphorylation photosynthétique oxydative en l'absence de CMU ; nous avons vu plus haut qu'il s'agit très probablement, dans ce cas, de la photophosphorylation pseudo-cyclique aérobie. Cette expression « phosphorylation photosynthétique oxydative », prête donc à confusion puisqu'elle couvre deux systèmes différents (Trebst, 1961 b).

En résumé :

1) le DCPIP, sous la forme oxydée, peut jouer le rôle d'accepteur d'électrons dans la photooxydation de l'eau (A. dans la figure 14). Aucune phosphorylation n'accompagne cette réaction.

2) DCPIP, sous sa forme réduite, peut jouer le rôle de donneur d'électrons pour la « première » réaction lumineuse ( $\text{A}^-$  dans la figure 16). Il y a phosphorylation concomitante (photophosphorylation non cyclique de type bactérien).

3) DCPIP sous sa forme réduite peut jouer le rôle de cofacteur de la phosphorylation pseudo-cyclique aérobie (fig. 20).

4) DCPIP, sous sa forme réduite, constitue un cofacteur pour la photophosphorylation cyclique anaérobie. Cette phosphorylation n'est pas inhibée par CMU ni sous atmosphère d'azote ni en présence d'oxygène.

k) *Les cofacteurs du transport d'électrons et de la phosphorylation photosynthétiques : différences et similitudes (\*)*.

Nous avons vu, au paragraphe précédent, la nécessité d'utiliser les phénol-indophénols sous leur forme réduite pour obtenir une phosphorylation cyclique anaérobie. Cela est vrai non seulement pour les phénol-indophénols, mais aussi pour les autres cofacteurs : vitamine K, FMN... (Trebst, 1961 b). Quand on utilise ces cofacteurs pour une phosphorylation cyclique anaérobie, ils doivent d'abord être réduits au cours d'une réaction de Hill par les chloroplastes illuminés pour ensuite pouvoir catalyser, sous leur forme réduite, une phosphorylation cyclique anaérobie. En présence de CMU la réduction du cofacteur par réaction de Hill est inhibée et, partant, la phosphorylation cyclique anaérobie ne peut démarrer. En utilisant directement les cofacteurs sous leur forme

(\*) La consultation de la figure 23 facilitera la lecture de ce paragraphe.

TABLEAU V

Cofacteurs	Type	Potentiel E m 7 (volts)	Réduction à la lumière	(Réaction de Hill) Dégagement positif d'oxygène (augmentation de pression à l'appareil de Warburg)		Photo- phosphorylation pseudo-cyclique aérobie	Dégagement positif d'oxygène et photo- phosphorylation pseudo-cyclique aérobie simultanés	Photo- phosphorylation cyclique anaérobie
				avec phosphorylation (photo-oxydation de l'eau + photo- phosphorylation du type bactérien)	sans phosphorylation (photo-oxydation de l'eau)			
				Réaction effectuée sous azote (*)	Réaction effectuée sous azote (*)			
Ferricyanure. . . . .	I	+ 0,460 <sup>(2)</sup>	+	+		—	—	—
<i>p</i> -benzoquinone. . . . .	II	+ 0,293 <sup>(1)</sup>	+	+		+	—	—
Acide benzoquinone 2,5 diacétique. Triméthylbenzoquinone. . . . . 2,6-diméthoxyméthylbenzoquinone..	III	+ 0,167 <sup>(1)</sup> + 0,102 <sup>(1)</sup> + 0,053 <sup>(1)</sup>	+	+	+	+	+	— — —
Acide 2-hydroxybenzoquinone 5- propionique . . . . .	IV	+ 0,027 <sup>(1)</sup>	+	—		+	—	—
Vitamine K <sub>3</sub> . . . . . PMS (phénazine méthosulfate) . . . . . FMN (flavine mononucléotide) . . . . . Acide anthraquinone 2-sulfonique. . . . .	V	— 0,010 <sup>(1)</sup> — 0,080 <sup>(3)</sup> — 0,180 <sup>(2)</sup> — 0,250 <sup>(1)</sup>	+	—	—	+	—	+
TPN (triphosphopyridine nucléotide)	VI	— 0,320 <sup>(2)</sup>	+	+		—	—	—
TCPIP (2,6,3-trichlorophénol-indo- phénol). . . . .	VII	+ 0,219 <sup>(3)</sup>	+		+	+	—	+

(1) Trebst, 1961 a. (2) Kandler, 1960. (3) Clark, 1960.

(\*) L'azote constitue l'atmosphère gazeuse au début de la réaction; mais au fur et à mesure que la réaction se déroule, l'oxygène apparaît.

réduite, la réaction de Hill n'est plus requise pour les réduire et dans ces conditions la présence de CMU n'inhibe pas la phosphorylation cyclique anaérobie.

Dans le mécanisme d'action des cofacteurs de la phosphorylation cyclique anaérobie tel que nous venons de le préciser, au cours d'une première étape donc, ces cofacteurs sont réduits par une réaction de Hill : ils fonctionnent comme des réactifs de Hill ; ensuite, dans une deuxième étape, ils catalysent le transport d'électrons cyclique. N'a-t-on pas l'impression, à la suite de cette explication, que la distinction entre réactifs de Hill et cofacteur du transport d'électrons cyclique est devenue ambiguë ? Précisons donc cette distinction.

Dans quelle mesure un corps est-il un réactif de Hill, tel que le ferricyanure, ou un cofacteur du transport d'électron cyclique tel que FMN, vitamine K, PMS, TCPIP, etc... On peut poser la question différemment : Pourquoi certains corps, tels que FMN, vit. K, etc..., peuvent-ils fonctionner comme réactifs de Hill et ensuite, sous leur forme réduite, comme cofacteur de la phosphorylation cyclique, alors que d'autres, comme le ferricyanure, ne sont que des réactifs de Hill et ne peuvent pas catalyser un transport cyclique quand ils sont réduits ? Ces différences sont dues, en grande partie, aux potentiels d'oxydo-réduction de ces corps, et à la plus ou moins grande facilité avec laquelle leur forme réduite peut être réoxydée par l'oxygène. Le tableau V groupe quelques-uns des cofacteurs du transport d'électrons photosynthétique ; ils sont rangés par potentiel décroissant (potentiel normal d'oxydo-réduction à pH 7, Em 7), exception faite du TPN et du TCPIP, placés au bas du tableau, qui constituent des cas particuliers. On peut distinguer ainsi sept types de cofacteurs (colonnes horizontales). Chaque colonne verticale indique si les divers cofacteurs sont capables, oui (+) ou non (—), de catalyser la réaction mentionnée en haut de la colonne.

Nous voyons que tous les corps qui servent d'une façon ou d'une autre de transporteurs d'électrons en photosynthèse sont réduits à la lumière, mais tous ne peuvent pas servir de réactif de Hill, c'est-à-dire donner lieu à un dégagement positif d'oxygène (augmentation de pression à l'appareil de Warburg) et se poursuivant aussi longtemps que toute la forme oxydée du réactif de Hill n'a pas été réduite. Seuls les corps dont le potentiel est suffisamment positif sont de tels « oxydants » pour la réaction de Hill avec ou sans phosphorylation couplée (types I, II, III et VII). Le TPN constitue la seule exception à cette règle : bien que dans la zone des potentiels assez négatifs, il est un oxydant de Hill dans la même mesure que le ferricyanure dont le potentiel se trouve au contraire parmi les plus positifs.

La perte de la faculté de fonctionner comme oxydant de Hill est compensée par le pouvoir de catalyser le transport d'électrons et, partant, la phosphorylation, cycliques anaérobies : c'est le cas des corps du type V dont les potentiels sont tous négatifs. Ces corps ont un potentiel suffisamment bas pour pouvoir céder leurs électrons à un composant de la chaîne de transport cyclique, probablement le cytochrome *b* oxydé (Em 7 = 0 v.) : les électrons sont ainsi déviés du transport non cyclique de la réaction de Hill vers le transport cyclique de la photophosphorylation cyclique anaérobie.

Les corps du type III, au contraire, ont un potentiel

trop élevé pour pouvoir réduire le cytochrome *b* et ne peuvent donc pas catalyser le transport d'électron cyclique : le transport d'électron reste non cyclique.

L'acide 2-hydroxybenzoquinone 5-propionique (type IV) fait la transition entre les corps du type III et ceux du type V ; il ne donne plus lieu à un dégagement positif d'oxygène mesurable à l'appareil de Warburg, mais il ne catalyse pas encore la phosphorylation cyclique anaérobie (Trebst, 1961 a). La raison de ce comportement doit être recherchée dans le rôle que peut jouer l'oxygène. Les corps du type IV ne donnent plus lieu à un dégagement positif d'oxygène, car ils sont d'excellents cofacteurs de la photophosphorylation pseudo-cyclique aérobie ; quoi qu'il paraisse, ces corps sont bien des oxydants de Hill : ils sont réduits à la lumière ; mais l'oxygène ainsi produit réoxyde immédiatement la forme réduite obtenue simultanément ; il y a bien phosphorylation (pseudo-cyclique aérobie), mais il n'y a pas de dégagement positif d'oxygène mesurable par augmentation de pression à l'appareil de Warburg, car l'oxygène absorbé compense exactement l'oxygène dégagé.

La tension d'oxygène nécessaire pour réoxyder la forme réduite des cofacteurs du type IV est très faible : la très petite quantité d'oxygène produite pendant les premiers instants où les chloroplastes sont illuminés suffit déjà à la réoxydation. La tension d'oxygène nécessaire à une telle réoxydation semble d'autant plus grande que le potentiel du cofacteur est plus élevé. Ainsi les corps du type III dont le potentiel est plus élevé que celui de l'acide 2-hydroxybenzoquinone 5-propionique ont besoin d'une tension d'oxygène plus grande. L'oxygène nécessaire à cette tension plus élevée est fournie par la réaction de Hill elle-même : celle-ci se déroule normalement jusqu'à ce que la tension requise soit atteinte ; puis une partie de l'oxygène, qui continue à se dégager, sert à réoxyder une partie correspondante du cofacteur réduit : il y a superposition d'une phosphorylation pseudo-cyclique à une réaction de Hill. Cela se traduit par la formation d'une quantité plus grande d'ATP que d'oxygène dégagé ; la quantité d'oxygène en déficit par rapport à la quantité d'ATP formé va en augmentant au fur et à mesure que les potentiels diminuent en se rapprochant de celui de l'acide 2-hydroxybenzoquinone 5-propionique pour lequel le dégagement positif d'oxygène a totalement disparu en faveur de la phosphorylation pseudo-cyclique aérobie.

Au contraire, à l'autre extrémité de l'échelle des potentiels, la *p*-benzoquinone et le ferricyanure sont incapables d'utiliser l'oxygène produit pendant la réaction de Hill pour catalyser une phosphorylation pseudo-cyclique aérobie. La *p*-benzoquinone peut cependant catalyser cette phosphorylation pseudo-cyclique aérobie à condition que la tension d'oxygène soit suffisante : pour cela la réaction doit être effectuée à l'air. Le ferricyanure, même à l'air, est incapable de catalyser une phosphorylation pseudo-cyclique aérobie.

La phosphorylation pseudo-cyclique aérobie est également possible avec les corps dont le potentiel est négatif (type V). Ces corps peuvent donc catalyser et la phosphorylation pseudo-cyclique aérobie et la phosphorylation cyclique anaérobie. Quand ils sont cofacteurs de la phosphorylation cyclique anaérobie leur concentration doit atteindre une certaine valeur optimum, en dessous

de laquelle la réoxydation de leur forme réduite par le système cytochrome-cytochrome réductase devient facteur limitant ; la phosphorylation diminue. A ces faibles concentrations, la vitesse de réoxydation du cofacteur réduit par l'oxygène peut ne pas encore être limitante : dans ce cas on observe la stimulation exercée par l'oxygène suivant le mécanisme de la phosphorylation pseudo-cyclique anaérobie. La tension d'oxygène nécessaire à cette stimulation et la concentration de cofacteur à laquelle elle s'exerce varient avec les corps du type V :

Dans le cas des quinones du type V, l'oxygène stimule la phosphorylation à des concentrations de cofacteur d'autant plus petites que le potentiel d'oxydo-réduction du cofacteur est moins négatif. Le système FMN semble beaucoup plus sensible à l'oxygène que les systèmes vitamine K ou PMS : la phosphorylation cyclique anaérobie catalysée par FMN semble pouvoir être déviée très aisément vers la phosphorylation pseudo-cyclique aérobie ; des traces d'oxygène y suffiraient déjà. Ce serait la raison pour laquelle il est parfois difficile de mettre en évidence une phosphorylation cyclique anaérobie avec FMN.

Les phénol-indophénols comme le TCPIP (type VII) se rapprochent par leur potentiel ( $E_m 7 \approx + 0,2 v$ ) des corps du type III : comme eux, ils sont réduits à la lumière avec un dégagement simultané d'oxygène (sans phosphorylation toutefois). Comme eux, ils catalysent une phosphorylation pseudo-cyclique aérobie mais, contrairement aux corps du type III, cette phosphorylation ne débute qu'au moment où pratiquement toute la forme oxydée du phénol-indophénol a été réduite. Ce qui distingue plus nettement encore ces phénol-indophénols des corps du type III, c'est leur pouvoir de catalyser, sous leur forme réduite, la phosphorylation cyclique anaérobie : par là ils se rapprochent, bien qu'ayant un potentiel positif ( $+ 0,2 v$ ), des corps du type V dont le potentiel est négatif. Ces phénol-indophénols constituent ainsi, par leur potentiel positif, une nouvelle classe de cofacteurs de la phosphorylation cyclique anaérobie (Trebst, 1961 b). Vu leur potentiel élevé, il ne semble pas probable que, dans la chaîne de transport d'électrons cyclique, ils réduisent le cytochrome *b* ( $E_m 7 \approx 0 v$ ) : ils réagissent sans doute avec le cytochrome *f* ( $E_m 7 \approx + 0,37 v$ ).

### 1) Le rôle de l'ion chlorure en photosynthèse.

En 1946, Warburg et Luttgens publièrent une découverte remarquable : ils venaient de mettre en évidence que l'ion chlorure,  $Cl^-$ , était indispensable à la réaction de Hill (Warburg, 1946). Ils n'hésitèrent pas à donner à l'ion chlorure le nom de coenzyme de la photosynthèse. Arnon et Whatley confirmèrent le travail de Warburg (Arnon, 1949), mais ils n'étaient pas enclins à considérer le chlore comme un élément indispensable aux végétaux et, à l'époque, pratiquement rien ne le justifiait. Cependant quelques années plus tard, Broyer et ses collaborateurs à Berkeley (Broyer, 1954), puis Martin et Lavollay à Paris (Martin, 1958), mirent

en évidence que le chlore était bien un élément indispensable pour les plantes vertes. Warburg avait donc eu raison d'appeler l'ion chlorure un coenzyme. Arnon et son équipe se mirent alors à réétudier le rôle de l'ion chlorure en photosynthèse. Ils montrèrent que  $Cl^-$  était indispensable, non seulement pour le transport d'électron de la réaction de Hill, mais encore pour le transport d'électron catalysé par FMN. En l'absence de  $Cl^-$ , le transport d'électron était bloqué et, partant, la phosphorylation ne pouvait avoir lieu.  $Cl^-$  n'était pas requis pour le système vitamine K ni le système PMS. Ainsi donc il semblait que tous les systèmes non cycliques (Ferricyanure, TPN) nécessitaient la présence de  $Cl^-$  ; l'un des systèmes cycliques, le système FMN, requerrait également  $Cl^-$ , alors que les deux autres, les systèmes vitamine K et PMS, en étaient indépendants. L'action de  $Cl^-$  introduisait ainsi une distinction entre d'une part le système FMN, dépendant de  $Cl^-$  et d'autre part les systèmes vitamine K et PMS, indépendants de  $Cl^-$ . Cette distinction venait renforcer celle qui était basée sur une sensibilité différente de ces deux types de systèmes envers TPN et certains inhibiteurs (Whatley, 1959).

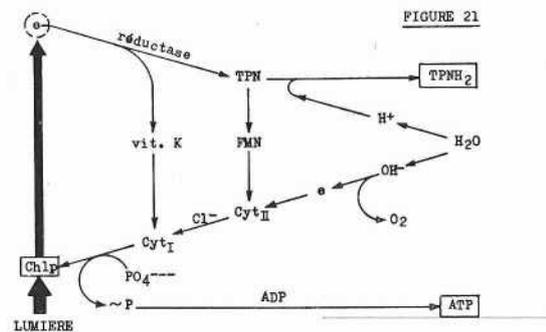


FIG. 21. — Phosphorylation photosynthétique (Arnon, 1959 b).

A la suite de ces résultats Arnon présentait, en 1959, le schéma de la photosynthèse de la figure 21. Ce schéma représente à la fois les systèmes cycliques vitamine K et FMN et le système non cyclique au TPN. Sur ce schéma, le trajet des électrons du système vitamine K est très analogue à celui représenté sur la figure 9. De même, le trajet non cyclique au TPN est fort voisin de celui de la figure 13. La seule différence entre le schéma de la figure 21 et ceux des figures 9 et 13 vient du système FMN. Pour expliquer les différences entre les systèmes FMN et vitamine K, Arnon avait fait l'hypothèse d'un cytochrome (Cyt II sur la figure 21) supplémentaire, spécial, participant au transport des électrons du système FMN, mais non pas à celui du système vitamine K (ou PMS) ;

l'action de l'ion chlorure s'exerçait entre le cytochrome supplémentaire du système FMN (Cyt II) et le cytochrome commun aux deux types de systèmes cycliques (Cyt I).

L'absence de  $\text{Cl}^-$  bloquait le passage des électrons aussi bien dans le système cyclique FMN que dans le système non cyclique TPN. Le rôle de l'ion chlorure aurait été de servir de « pont » à électrons entre les deux cytochromes.

A l'heure actuelle, le schéma de la figure 21 a été abandonné ; nous ne l'avons mentionné ici que pour mieux suivre l'évolution des idées. En effet, les différences entre le système FMN et le système vitamine K reposaient probablement sur un artefact. Dans les conditions de l'expérience, le système FMN nécessitait bien la présence des ions chlorure, mais ce système n'était pas, comme on le pensait, un système uniquement cyclique ; un système non cyclique catalysé par l'oxygène lui était superposé (système pseudo-cyclique : fig. 20). L'azote utilisé pour réaliser des conditions anaérobies au cours des expériences renfermait probablement des traces d'oxygène suffisantes pour dévier une partie des électrons vers le système FMN pseudo-cyclique ; dans ce système la photooxydation de l'eau prend place. C'est justement au niveau de la photooxydation de l'eau que s'exerce l'action des ions chlorures (voir Losada, 1961), d'où la nécessité de  $\text{Cl}^-$  pour le système FMN pseudo-cyclique.

Tous les systèmes qui font intervenir la photooxydation de l'eau nécessitent la présence de  $\text{Cl}^-$ . Les systèmes cycliques par contre sont indépendants de  $\text{Cl}^-$  : Tsujimoto, Hall et Arnon ont montré, sous des conditions spéciales il est vrai, qu'en atmosphère d'azote débarrassé d'oxygène, le système FMN fonctionnait aussi bien en l'absence qu'en présence de  $\text{Cl}^-$  (voir Arnon, 1961 a).

En résumé,  $\text{Cl}^-$  est nécessaire à la photooxydation de l'eau ; son action s'exerce au niveau du dégagement d'oxygène. A l'heure actuelle, le site où  $\text{Cl}^-$  agit, paraît se confondre avec celui où le CMU, le DCMU, l'o-phénanthroline exercent leur inhibition. L'ion manganèse,  $\text{Mn}^{++}$ , indispensable, exerce également son action catalysante à ce même niveau.

#### m) Couplage du transport d'électrons et de la phosphorylation.

Tout au cours du chapitre sur la phosphorylation nous avons parlé de « couplage » de la phosphorylation au transport d'électrons (ou d'hydrogènes) photosynthétique. Il convient de préciser maintenant la nature de ce couplage.

Tout mécanisme devra tenir compte d'un fait expérimental essentiel : la vitesse de la réaction de Hill est grandement augmentée par la présence simultanée des trois composés de la phosphorylation : phosphate inorganique, ADP et ions magnésium (Arnon, 1958 et 1959 a ; voir aussi Jagendorf, 1958). La figure 22 illustre ce fait.

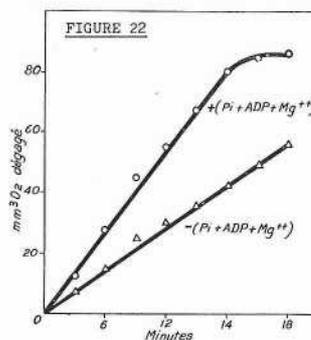
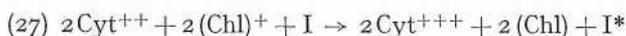


FIG. 22. — Stimulation du dégagement d'oxygène par  $(\text{Pi} + \text{ADP} + \text{Mg}^{++})$  (Arnon, 1958).

Dire que la somme  $(\text{Pi} + \text{ADP} + \text{Mg}^{++})$  stimule la vitesse de la réaction de Hill, c'est dire qu'elle accélère le transport d'électron associé à cette réaction. L'un au moins des éléments, Pi, ADP ou  $\text{Mg}^{++}$  doit donc être engrené dans le transport d'électron. La réaction de Hill sans phosphorylation couplée (absence de Pi, ADP et  $\text{Mg}^{++}$ ), c'est-à-dire la réaction de Hill proprement dite, nous apparaît ainsi, à la suite d'Arnon, comme un système incomplet, comme un système mutilé : c'est ce qui subsiste de la phosphorylation non cyclique (fig. 15) lorsqu'on l'ampute des éléments mêmes de la phosphorylation  $(\text{P}_i + \text{ADP} + \text{Mg}^{++})$ .

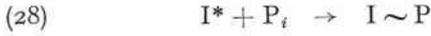
Le mécanisme suivant, d'après Avron et Jagendorf (Avron, 1959 b) tient compte de ces faits ; nous l'avons appliqué au cas très probable où une formation d'ATP a lieu pendant le passage de l'électron du cytochrome réduit à la chlorophylle oxydée (fig. 15) :

Le transfert des électrons du cytochrome réduit à la chlorophylle oxydée est stimulé par la présence d'un intermédiaire « I ». L'énergie libérée pendant le transfert des électrons sert à activer « I » dont l'énergie libre augmente :

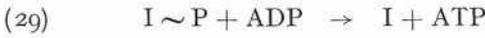


La forme activée  $\text{I}^*$  inhibe la réaction 27 et, partant, toutes les autres réactions de transport d'électrons : le flux des électrons est freiné. Pour que les électrons puissent « s'écouler » normalement, il faut éliminer  $\text{I}^*$  et régénérer I. C'est là le rôle du phosphate inorganique

et de l'ADP ; l'énergie de I\* sert à créer une liaison phosphate à haute énergie :

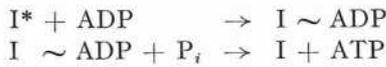


Il se forme un complexe, I ~ P, qui servira à phosphoryler l'ADP :



I est régénéré ; il peut fonctionner à nouveau dans la réaction (27).

On pourrait concevoir un mécanisme où l'ADP interviendrait avant le phosphate inorganique pour donner un complexe I ~ ADP

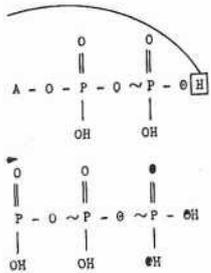


Kahn et Jagendorf (Kahn, 1960) ont montré que c'est le premier mécanisme qui prend place : c'est le complexe I ~ P qui se forme et non pas I ~ ADP, contrairement à ce qu'avaient laissé supposer Avron et Jagendorf (Avron, 1960 b).

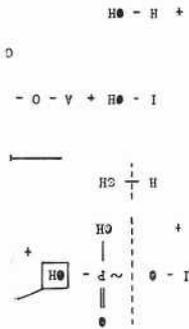
Le Schulz et Boyer (Schulz, 1961) on (Avron, 1960 b) on peut la réaction 29 de la façon

ATUM

AUT



BAS



— le phosphate inorganique perd 2 atomes d'oxygène (●) pendant la formation d'ATP (Avron, 1960) ;  
 — il y a incorporation de l'oxygène de l'eau (⊕) dans l'ATP (Avron, 1960 b)).

Il convient cependant de noter que Schulz et Boyer n'ont pas observé un tel échange.

— l'atome d'oxygène (⊙) qui fait la liaison entre les 2 atomes terminaux de phosphore dans l'ATP pro-

vient de l'ADP et non du phosphate inorganique (Avron, 1960 b ; Schulz, 1961).

n) Mécanisme de la photophosphorylation chez les plantes vertes. Résumé.

La figure 23 résume schématiquement certains des paragraphes précédents : elle représente les réactions photosynthétiques chez les plantes vertes. Les cofacteurs ont été disposés les uns par rapport aux autres en tenant compte de leur potentiel normal d'oxydoréduction à pH 7 ( $E_m$  7). Les potentiels indiqués ici correspondent à des mesures *in vitro* ; il est possible qu'*in vivo* les potentiels ne soient pas les mêmes.

La forme oxydée du pigment impliqué dans la photooxydation de l'eau est placée à un niveau d'oxydo-réduction de + 1,0 v ; de ce fait il peut oxyder  $OH^-$  avec dégagement d'oxygène puisque le potentiel du système  $OH^-/O_2$  est de + 0,815 v.

Après la photooxydation de l'eau, l'électron expulsé du pigment doit avoir un potentiel aux environs de 0 v puisqu'il peut réduire les phénol indophénols (TCPIP) dont le potentiel est d'environ + 0,2 v. La plastoquinone ( $E_m$  7 entre 0 et + 0,1 v) est impliquée dans cette photoréduction (Bishop, 1961 ; Krogman, 1961) : si elle est réduite par l'électron de la photooxydation de l'eau, cela oblige à doter cet électron d'un potentiel inférieur à 0 v, mettons - 0,1 v.

Si l'on admet pour l'électron de la photooxydation de l'eau un potentiel d'environ - 0,1 v, cet électron peut être transféré au cytochrome b. On peut alors envisager la participation du Cyt b dans la chaîne de transport non cyclique. Si, comme l'indique Lundegardh, il existe un site de phosphorylation non seulement entre Cyt f et  $(Chl)^+$ , mais aussi entre Cyt b et Cyt f, la chaîne de transport non cyclique aurait deux sites de phosphorylation. Or, d'après la stœchiométrie de la phosphorylation non cyclique (réactions 21 et 22) on ne peut en envisager qu'un seul à l'heure actuelle. L'existence de la phosphorylation non cyclique du type bactérien ( $Ascorbate \rightarrow TCPIP H_2 \rightarrow Cyt f \rightarrow (Chl)^+ \rightarrow TPN$ ) semble exiger que le site de cette phosphorylation unique soit situé entre  $(Chl)^+$  et Cyt f et non pas entre Cyt b et Cyt f puisque, dans ce transport non cyclique de type bactérien, le cytochrome b, de par son potentiel, semble ne pas pouvoir participer.

Pour tenir compte de ces considérations, nous avons représenté deux trajets éventuels, 1 et 2, pour l'électron issu de la photooxydation de l'eau. L'un, 1, passe

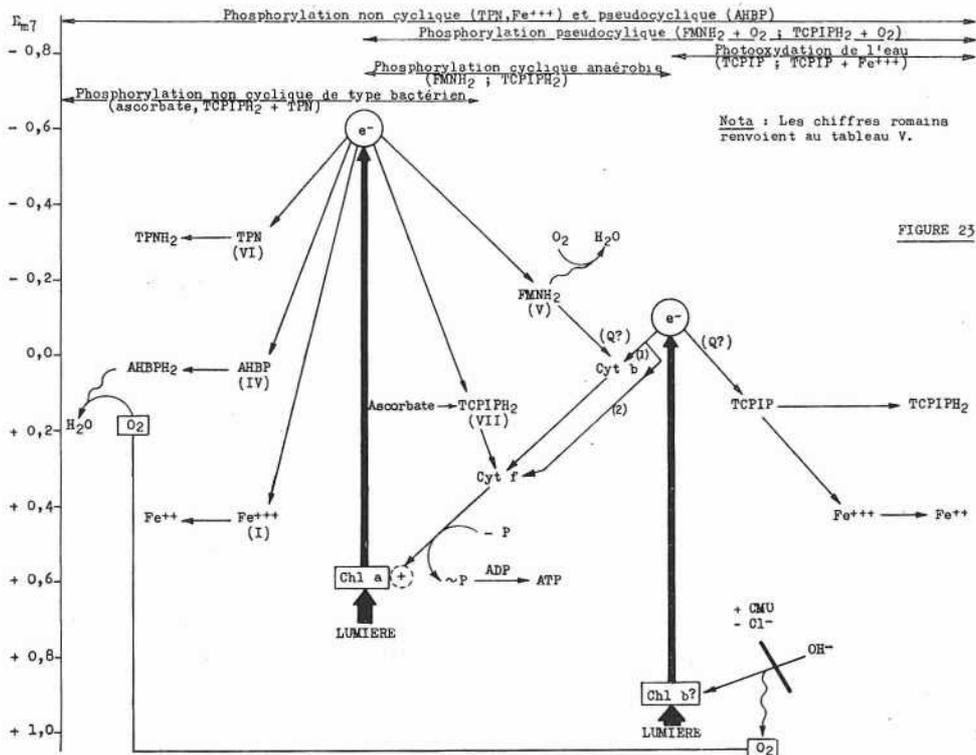


FIG. 23. — Transport d'électron et Phosphorylation photosynthétique.

par le cytochrome b ; dans ces conditions il faut admettre qu'il n'y a pas de site de phosphorylation entre Cyt b et Cyt f. Le deuxième trajet, 2, passe à l'écart du cytochrome b ; dans ce cas, une phosphorylation cyclique pourrait être associée au maillon Cyt b → Cyt f. Le trajet cyclique (via FMN, par exemple) aurait alors trois sites de phosphorylation : les deux précédents, ainsi que celui entre le cofacteur (FMN par exemple) et Cyt b.

Dans la deuxième réaction lumineuse, la forme oxydée de la chlorophylle oxyde le cytochrome réduit ( $E_m 7 \simeq 0,4$ ) d'où le potentiel de + 0,5 à + 0,6 v associé à cette chlorophylle.

L'électron expulsé de la chlorophylle au cours de la deuxième réaction lumineuse peut réduire le TPN ( $E_m 7 \simeq -0,4$  v), d'où le potentiel de - 0,6 attribué à cet électron.

Les potentiels d'oxydoréduction étant ainsi établis on voit que, dans le schéma de la figure 23, les électrons s'écoulent dans le sens normal, c'est-à-dire dans celui des potentiels croissants, sauf dans deux cas : celui des deux réactions lumineuses pendant lesquelles, grâce à l'énergie lumineuse, les électrons sont amenés à des potentiels beaucoup plus négatifs.

Le schéma de la figure 23 n'a évidemment pas la prétention de correspondre exactement à la réalité : il est basé sur des faits, mais aussi sur des hypothèses. Il est forcément incomplet : l'emplacement exact de la plastoquinone, Q dans la figure 23, n'est pas indiqué. Il ne laisse pas soupçonner que  $CO_2$  serait indispensable à la réaction de Hill (Warburg, 1959, Stern, 1960). Mais tel qu'il est, il permet d'expliquer de nombreuses réactions photochimiques des chloroplastes isolés, que nous connaissons aujourd'hui.

*Nous verrons, au cours de la dernière partie de cet article, comment l'énergie chimique de l'ATP et du  $TPNH_2$ , dont nous connaissons maintenant le mode de formation, sera utilisée pour l'assimilation du gaz carbonique en sucres et pour d'autres synthèses cellulaires.*

(A suivre.)

## BIBLIOGRAPHIE

- ALLEN (M. B.), WHATLEY (F. R.) & ARNON (D. I.), 1958. — *Biochim. Biophys. Acta*, 27 (1958), 16-23.
- ALLEN (M. B.), PIETTE (L. H.) & MURCHIO (J. C.), 1961. — *Biochem. Biophys. Research Comm.*, 4 (1961), 271-274.
- ARNON (D. I.), WHATLEY (F. R.), 1949. — *Science*, 110 (1949), 54.
- ARNON (D. I.), ALLEN (M. B.) & WHATLEY (F. R.), 1954. — *Nature*, 174 (1954), 394.
- ARNON (D. I.), WHATLEY (F. R.) & ALLEN (M. B.), 1955. — *Biochim. Biophys. Acta*, 16 (1955), 607-608.
- ARNON (D. I.), WHATLEY (F. R.) & ALLEN (M. B.), 1957. — *Nature*, 180 (1957), 182-185.
- ARNON (D. I.), WHATLEY (F. R.) & ALLEN (M. B.), 1958. — *Science*, 227 (1958), 1026-1034.
- ARNON (D. I.), WHATLEY (F. R.) & ALLEN (M. B.), 1959 a. — *Biochim. Biophys. Acta*, 32 (1959), 47-57.
- ARNON (D. I.), 1959 b. — *Nature*, 184 (1959), 10-21.
- ARNON (D. I.), 1961 a. — *In* : Light and Life, John Hopkins Press, 1961.
- ARNON (D. I.), LOSADA (M.), NOZAKI (M.) & TAGAWA (K.), 1961 b. — *Nature*, 190; 1961, 601-606.
- ARNON (D. I.), 1961 c. — Présenté au 5<sup>e</sup> Congrès International de Biochimie, Symposium VI, Moscou, août 1961.
- AVRON (M.) & JAGENDORF (A. T.), 1956. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 65 (1956), 475.
- AVRON (M.) & JAGENDORF (A. T.), 1959. — *J. Biol. Chem.*, 234 (1959), 1315-1320.
- AVRON (M.) & JAGENDORF (A. T.), 1959 b. — *J. Biol. Chem.*, 234 (1959), 967-972.
- AVRON (M.), 1960. — *Biochim. Biophys. Acta*, 40 (1960), 257-272.
- AVRON (M.) & JHARON (N.), 1960 b. — *Biochem. Biophys. Research Comm.*, 2, (1960) 336-339.
- BISHOP (Norman I.), 1961. — Quinones in electron transport, Churchill LTD, 1961, pages 385-404.
- BOVÉ (J. M.), 1961 a. — *Fruits*, 16 (1961), 89-101.
- BOVÉ (J. M.), 1961 b. — *Fruits*, 16 (1961), 352-364.
- BROYER (T. C.), CARLTON (A. B.), JOHNSON (C. M.) & STOUT (P. R.), 1954. — *Plant Physiol.*, 29 (1954), 526.
- CLARK (N. W.), 1960. — Oxidation-Reduction potentials of organic systems. The Williams & Wilkins Co. Baltimore 1960.
- DUYSSENS (L. N. M.), AMESZ (J.) & KAMP (B. M.), 1961. — *Nature*, 190 (1961), 510-511.
- EMERSON (R.) & CHALMERS (R. V.), 1958. — *Phycol. Soc. Amer. Bull.*, 11 (1958), 51.
- FRENCH (C. S.) & FORK (D. C.), 1961. — Présenté au 5<sup>e</sup> Congrès International de Biochimie, Symposium VI, Moscou, août 1961.
- FRENKEL (A. W.), 1954. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 76 (1954), 5568-5569.
- GEST (H.) & KAMEN (M. D.), 1949. — *J. Bactériol.*, 58 (1949), 239.
- GEST (H.), 1957. — Proc. Int. Symp. Enz. Chem., Tokyo and Kyoto, 1957.
- GRUBE (K. H.), 1953. — *Planta*, 42 (1953), 279-303.
- HILL (R.) & BENDALL (F.), 1960. — *Nature*, 186 (1960), 136-137.
- JAGENDORF (A. T.) & AVRON (M.), 1957. — *J. Biol. Chem.*, 231 (1957) 277-290.
- JAGENDORF (A. T.), 1958. — « The Photochemical Apparatus » Brookhaven National Laboratory, Upton, N. Y., p. 245.
- JAGENDORF (A. T.) & MARGULIES (M.), 1960. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 90 (1960), 184-195.
- KAHN (J. S.) & JAGENDORF (A. T.), 1960. — *Biochem. Biophys. Research Comm.*, 2, (1960) 259-263.
- KANDLER (O.), 1950. — *Z. Naturforschg*, 5 b (1950), 423-437.
- KANDLER (O.), 1960. — *Annual Rev. Plant Phys.*, 1960.
- KRALL (A. R.), GOOD (N. E.) & MAYNE (B. C.), 1961. — *Plant Physiol.*, 36 (1961), 44-47.
- KROGMANN (D. W.) & VENNESLAND (B.), 1959 a. — *J. Biol. Chem.*, 234 (1959), 2205-2210.
- KROGMANN (D. W.) & JAGENDORF (A. T.), 1959 b. — *Plant. Physiol.*, 34 (1959), 277-282.
- KROGMANN (D. W.), 1960. — *J. Biol. Chem.*, 235 (1960), 3630-3634.
- KROGMANN (D. W.), 1961. — *Biochem. Biophys. Research Comm.*, 4 (1961), 275-277.
- LEHNINGER (A. L.), WADKINS (C. L.), COOPER (C.), DEVLIN (T. M.) & GAMBLE (J. L.), 1958. — *Science*, 128 (1958), 450.
- LOSADA (M.), WHATLEY (F. R.) & ARNON (D. I.), 1961. — *Nature*, 190 (1961), 606-610.
- LUNDEGARDH (H.), 1961. — *Nature*, 192 (1961), 243-248.
- MARTIN (G.) & LAVOLLA (J.), 1958. — *Experientia*, 14 (1958), 333.
- MEHLER (A. M.), 1951. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 33 (1951), 65.
- MYERS (J.) & FRENCH (C. S.), 1959. — *Carnegie Inst. Wash. Yearbook*, 58 (1959), 318.
- NAKAMOTO (T.), KROGMANN (D. W.) & VENNESLAND (B.), 1959. — *J. Biol. Chem.*, 234 (1959), 2783-2788.
- NAKAMOTO (T.), KROGMANN (D. W.) & MAYNE (B.), 1960. — *J. Biol. Chem.*, 235 (1960), 1843-1845.
- RABINOWITZ (E. I.), 1953. — *Progress in photosynthesis, Sci. Am.*, 189 (1953), 80-81.
- Research in Photosynthesis, 1957. — Interscience Publishers 1957, p. 294.
- RUBEN (S.), 1943. — *J. Amer. chem. Soc.*, 65 (1943), 279-282.
- SAN PIETRO (A.) & LANG (H. M.), 1956. — *Science*, 124 (1956), 118.
- SAN PIETRO (A.) & LANG (H. M.), 1958. — *J. Biol. Chem.* 231 (1958), 211-229.
- SCHULZ (A. R.) & BOYER (P. D.), 1961. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 93 (1961), 335-337.
- SIMONIS (W.) & GRUBE (K. H.), 1952. — *Z. Naturforschg*, 1 b (1952), 194-196.
- STERN (B. K.) & VENNESLAND (B.), 1960. — *J. Biol. Chem.*, 235 (1960), PC 52, PC 53.
- TREBST (A.) & ECK (H.), 1961 a. — *Z. Naturforschg* 16 b (1961), 44.
- TREBST (A.) & ECK (H.), 1961 b. — *Z. Naturforschg* (1961), 16 b, 455-461.
- VERNON (L. P.) & ZAUGG (W. S.), 1960. — *J. Biol. Chem.*, 235 (1960), 2728-2733.
- VISCHNIAC (W.) & OCHOA (S.), 1952. — *J. Biol. Chem.*, 198 (1952), 501-506.
- WARBURG (O.) & LÜTTGENS (W.), 1946. — *Biochimia*, 11 (1946), 303.
- WARBURG (O.), KRIPPAHL (G.) & SCHRÖDER (W.), 1955. — *Z. Naturforschg*, 10 b (1955), 631.
- WARBURG (O.), KRIPPAHL (G.), GEWITZ (H.) & VOLKER (V.), 1959. — *Z. Naturforschg*, 14 b (1959), 712.
- WHATLEY (F. R.), ALLEN (M. B.) & ARNON (D. I.), 1955. — *Biochim. Biophys. Acta*, 16 (1955), 605-606.
- WHATLEY (F. R.), ALLEN (M. B.), ROSENBERG (L. L.), CAPINDALE (J. B.) & ARNON (D. I.), 1956. — *Biochim. Biophys. Acta*, 20 (1956), 462-468.
- WHATLEY (F. R.), ALLEN (M. B.) & ARNON (D. I.), 1959. — *Biochim. Biophys. Acta*, 32 (1959), 32-46.
- WILLIAMS (A. M.), 1956. — *Biochim. Biophys. Acta*, 19 (1956), 570.
- WITT (H. T.), 1961 a. — Présenté au 5<sup>e</sup> Congrès International de Biochimie, Symposium VI, Moscou, août 1961.
- WITT (H. T.), MÜLLER (A.) & RUMBERG (B.), 1961 b. — *Angew. Chemie*, 73 (1961), 507-508.

