

Viellissement de l'appareil photosynthétique II. Effet synergique de la lumière et du vieillissement *in vitro* sur les activités photochimiques de chloroplastes isolés d'épinard

PAUL-ANDRÉ SIEGENTHALER

Laboratoire de Physiologie végétale, Institut de Botanique, Université de Neuchâtel, 2000 Neuchâtel 7, Suisse

(Reçu le 24 Mai 1969)

Ageing of the photosynthetic apparatus II. Synergetic effect of light and ageing in vitro on the photochemical activities of isolated spinach chloroplasts

The consequences of chloroplast ageing *in vitro* were further investigated, especially on the photochemical activities of these organelles.

Ageing of chloroplasts in dark was accompanied by decreases in activities for photohydrolysis and cyclic and non-cyclic syntheses of ATP, photoreduction of NADP⁺ and O₂ evolution; but there was no decrease in ferricyanide photoreduction. The rates of decrease in these activities were comparable to the rate of increase in chloroplast volume. Complete inhibitions were reached when maximum chloroplast swelling had occurred, *i.e.* after 5 to 6 hr of incubation at 20°C in a Tris-NaCl (pH 8) medium. Ageing in the light resulted in much accelerated decreases in activities tested; the loss of capacity for light-induced shrinkage was also accelerated by the light during ageing. Thus, light acts synergetically towards the ageing process. Moreover, light and, to a less extent, dark ageing, resulted in an uncoupling of chloroplast photophosphorylation and associated electron flow measured by ferricyanide photoreduction. The part of the electron flow which is induced by coupling (+ ADP, Pi, MgCl₂, pH 8) or by uncoupling (+ NH₄Cl, pH 7) was found to be very sensitive to light ageing. The NADP⁺ photoreduction loss was restored by addition of the ascorbate-DCPIP electron donor system, suggesting that ageing interferes with the integrity of photosystem II.

In many respects, these effects of ageing are comparable with the action of detergents and fatty acids on the structure and photochemical activities of chloroplasts, especially in that they attack the energy transducing mechanism in chloroplasts.

Dans un article précédent (1), nous avons montré que les chloroplastes isolés d'épinard subissent, à l'obscurité et au pH optimum de 8, un lent gonflement. Parallèlement à l'augmentation de volume des chloroplastes, la capacité de ces organites à se contracter sous l'action de la lumière diminue. Nous avons aussi montré que la lumière se comporte comme un agent de synergisme qui a pour effet d'accélérer le processus de gonflement qui se déroule lentement à l'obscurité et d'accentuer, dans une même proportion, l'inhibition de la capacité de contraction des chloroplastes. Ces observations nous ont conduit à formuler l'hypothèse que le gonflement des chloroplastes pourrait être une expression du vieillissement de ces organites *in vitro*. En effet, le gonflement des chloroplastes est accompagné d'une détérioration de l'appareil photosynthétique comme le témoignent les examens

au microscope électronique (2, 3). La désorganisation du réseau lamellaire semble aussi avoir pour conséquence une diminution des activités photosynthétiques de ces organites dont la capacité à se contracter sous l'action de la lumière ne représenterait que l'un des aspects (1). Le présent travail est consacré à l'étude de l'évolution des principales activités photochimiques chez des chloroplastes isolés en voie de vieillissement.

Matériel et méthodes

L'isolement des chloroplastes et la détermination quantitative des chlorophylles sont effectués comme nous l'avons décrit précédemment (1). Le vieillissement des chloroplastes *in vitro* est obtenu par un séjour prolongé de ces organites (1 mg de chlorophylle/ml), à l'obscurité ou à la lumière, dans un milieu contenant du NaCl (175 mM) et du Tris-HCl (100 mM, pH 8). L'éclairage est fourni par une lampe à incandescence Philips Comptalux de 150 w ($3,45 \times 10^5$ ergs·cm⁻²·sec⁻¹). C'est au cours de ce vieillissement, aux temps d'incubation indiqués dans chacune des expériences, que des prélèvements de chloroplastes sont effectués pour la détermination des diverses activités photochimiques. Pour obtenir le maximum d'activité, celles-ci sont déterminées dans un mélange réactionnel hypotonique contenant généralement 35 mM de NaCl et 20 mM de Tris-HCl (pH 8), à une température de 20°C et en présence de lumière (lampe à incandescence de 150 w) dont l'intensité est égale à $3,45 \times 10^5$ ergs·cm⁻²·sec⁻¹.

Le flux d'électrons est mesuré par la capacité des chloroplastes à photoréduire le ferricyanure de K ou le NADP⁺ dans le mélange réactionnel de base (MR) suivant: NaCl (35 mM); Tris-HCl (20 mM, pH 8); MgCl₂ (5 mM); chloroplastes (12 µg de chlorophylle/ml); ferricyanure de K (0,5 mM) ou NADP⁺ (0,2 mM) + ferredoxine en excès. Le temps de réaction est de 7 mn. à 20°C.

La photophosphorylation est déterminée dans le mélange réactionnel suivant: NaCl (35 mM); Tris-HCl (20 mM, pH 8); MgCl₂ (5 mM); KH₂PO₄ (0,5 mM); ADP (0,5 mM); chloroplastes (50 µg de chlorophylle/ml); phénazine méthosulfate (20 µM) pour des conditions cycliques et ferricyanure de K (0,5 mM) pour des conditions non cycliques. Les réactions sont effectuées à 20°C et pendant 2 mn.

L'adénosine triphosphatase (ATPase) est déterminée dans le mélange réactionnel suivant: NaCl (35 mM); Tris-HCl (20 mM, pH 8); MgCl₂ (5 mM); l-cystéine (50 mM); ATP (1 mM); chloroplastes (50 µg de chlorophylle/ml). La réaction se déroule pendant 15 mn. à 20°C et comme dans le cas de la photophosphorylation est arrêtée par addition d'acide trichloracétique (7%). La libération de P_i (ATPase) ou la disparition de P_i (photophosphorylation) est estimée d'après la méthode de HORWITT (4).

Le dégagement d'O₂ est mesuré polarographiquement à l'aide d'une électrode à O₂ (type de CLARK) reliée à un enregistreur, dans le mélange réactionnel suivant: NaCl (35 mM); Tris-HCl (20 mM, pH 8); MgCl₂ (5 mM); ferricyanure de K (1,0 mM); chloroplastes (50 µg de chlorophylle/ml).

La ferredoxine est préparée à partir de feuilles d'épinard par précipitations successives à l'acétone puis isolée sur une colonne de DEAE-cellulose (5).

Résultats

La Fig. 1 montre quelle est l'influence d'une incubation prolongée des chloroplastes sur l'activité de photoréduction du ferricyanure en fonction du temps d'incubation. Les chloroplastes séjournant à l'obscurité commencent par subir une activation de leur capacité de photoréduction qui au delà de 45 mn. d'incubation, diminue lentement pour atteindre une inhibition de l'ordre de 20% après 5 à 6 h. A la lumière, la capacité de photoréduction des chloroplastes, d'abord stable pendant 45 mn., diminue régulièrement pour atteindre 45% d'inhibition après 5 à 6 h. d'incubation. Placés dans les mêmes conditions, les chloroplastes subissent une inhibition plus rapide de leur capacité à dégager l'oxygène; cette inhibition atteint 95% après un séjour de 5 h. d'incubation à l'obscurité et de 2 h. seulement à la lumière (Fig. 2). La lumière a donc un effet synergique prononcé sur la diminution du dégagement d'O₂ qui se produit à l'obscurité.

Le phénomène de contraction des chloroplastes est intimement lié au transfert d'énergie dans les thylakoides (6, 7). Or, sachant que la capacité des chloroplastes à se contracter sous l'action de la lumière diminue fortement en fonction de la durée d'incubation des plastides (1), nous l'avons comparée, dans les mêmes conditions expérimentales, à l'activité de photophosphorylation. La Fig. 3 montre que la photophosphorylation cyclique des chloroplastes incubés à l'obscurité subit une

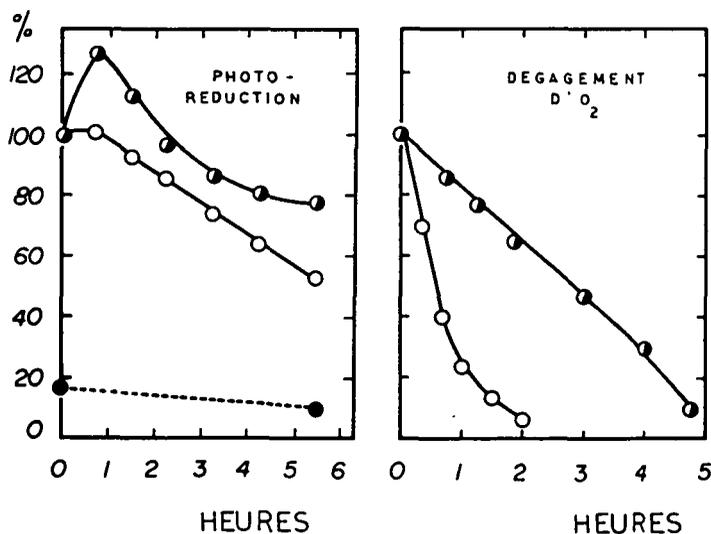


Fig. 1 (à gauche). Influence d'un séjour prolongé de chloroplastes *in vitro* à l'obscurité (●) et à la lumière (○), sur la capacité de photoréduction du ferricyanure. Réduction du ferricyanure à l'obscurité par des chloroplastes ayant séjourné à obscurité et à la lumière (●). La valeur 100% correspond à 588 μmoles de ferricyanure réduit/mg de chlorophylle/h. (moyenne de 10 expériences).

Fig. 2 (à droite). Influence d'un séjour prolongé de chloroplastes *in vitro* sur la capacité à dégager de l'O₂. Les symboles sont les mêmes que dans la Fig. 1. La valeur 100% correspond à 72 μmoles d'O₂ dégagé/mg de chlorophylle/h. (moyenne de 5 expériences).

inhibition régulière qui est totale après 5 h. Celle-ci est beaucoup plus rapide pour des chloroplastes ayant séjourné à la lumière; après 2 h. d'incubation dans ces conditions, la synthèse d'ATP est pratiquement nulle. L'hydrolyse de l'ATP sous l'action de la lumière est, elle aussi, inhibée par une incubation prolongée des plastides. Mais la différence entre l'activité des chloroplastes provenant de l'obscurité et de la lumière est nettement moins marquée que dans le cas de la photophosphorylation (Fig. 4). Il est intéressant de noter que l'activité ATPasique mesurée à l'obscurité n'est que peu modifiée par un séjour prolongé des chloroplastes à 20°C. Il existe donc une activité adénosine triphosphatase rémanente qui n'est pas affectée par le traitement considéré.

Les résultats précédents indiquent que le vieillissement des chloroplastes *in vitro* altère davantage le mécanisme de transfert de l'énergie (photophosphorylation, ATPase, phénomène de contraction) que celui du transfert d'électrons *per se*. Le Tableau 1 présente la différence de sensibilité de la phosphorylation cyclique et non cyclique vis-à-vis du vieillissement des chloroplastes *in vitro*. Cette différence est particulièrement nette après une incubation de 45 mn. où l'on peut noter une inhibition beaucoup plus grande de la photophosphorylation non cyclique. Cette différence s'amenuise au cours du temps et disparaît après 195 mn. période au bout de laquelle l'activité est pratiquement nulle. Cependant, pour les 2 types de phosphorylation, une incubation à la lumière est, dans une première phase, plus inhibitrice qu'une incubation à l'obscurité.

Nous avons vu que le vieillissement des chloroplastes *in vitro* a pour conséquence

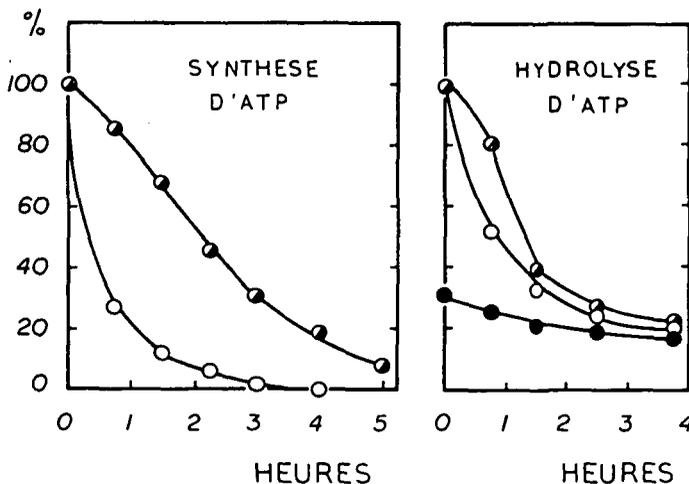


Fig. 3 (à gauche). Influence d'un séjour prolongé de chloroplastes *in vitro* sur la phosphorylation cyclique. Les symboles sont les mêmes que dans la Fig. 1. La valeur 100% correspond à 171 μ moles de phosphate estérifié/mg de chlorophylle/h. (moyenne de 5 expériences).

Fig. 4 (à droite). Influence d'un séjour prolongé de chloroplastes *in vitro* sur l'activité adénosine triphosphatase. Les symboles sont les mêmes que dans la Fig. 1. La valeur 100% correspond à 34 μ moles de phosphate hydrolysé/mg de chlorophylle/h. (moyenne de 4 expériences).

Tableau 1
Influence d'un séjour prolongé de chloroplastes isolés sur la capacité de photophosphorylation cyclique et non cyclique

Conditions ^a	Photophosphorylation en pour cent d'inhibition par rapport à l'activité initiale en fonction du temps d'incubation préliminaire (min)				
	0	45	90	135	195
<i>CYCLIQUE</i>					
Incubation à l'obscurité	(141) ^b	24	68	85	91
Incubation à la lumière	(141)	47	88	93	96
<i>NON CYCLIQUE</i>					
Incubation à l'obscurité	(78)	56	70	78	86
Incubation à la lumière	(78)	86	90	95	99

^a Les conditions d'incubation des chloroplastes et de photophosphorylation sont décrites dans la section **Matériel et méthodes**.

^b Les chiffres () correspondent à la quantité de P_i estérifié en μmoles de P_i/mg de chlorophylle /h. au début de l'expérience (temps 0).

d'inhiber davantage le mécanisme de synthèse d'ATP que celui du transport d'électrons. Il était donc intéressant de déterminer si la part du flux d'électrons induite par un couplage (+ P_i, ADP et Mg⁺⁺) ou par un découplage (+ NH₄Cl) est aussi sensible à un vieillissement que la photophosphorylation ou, au contraire, présente une résistance comparable à celle du transport d'électrons. Conformément à ce que l'on pouvait attendre, une addition de phosphate ou de phosphate et d'ADP, à pH 8, stimule la photoréduction du ferricyanure (Tableau 2). Le même effet est obtenu à pH 7 en présence de NH₄Cl. Cette stimulation du flux d'électrons est maintenue, voire accentuée lorsque les chloroplastes séjournent à l'obscurité

Tableau 2
Influence d'un séjour prolongé de chloroplastes isolés sur l'augmentation de la photoréduction due à un couplage ou à un agent découplant

Composés ajoutés ^a	pH	Photoréduction du ferricyanure en pour cent du contrôle pour une incubation des chloroplastes					
		Obscurité			Lumière		
		0	45 (min)	225	0	45 (min)	225
Aucun	8,0	100 ^b	140	80	100 ^b	92	56
Phosphate	8,0	215	276	108	215	80	54
Phosphate, ADP	8,0	276	284	88	276	108	64
Aucun	7,0	160	304	161	160	64	48
NH ₄ Cl	7,0	352	393	148	352	80	57

^a Les conditions d'incubation des chloroplastes et de photoréduction du ferricyanure sont décrites dans la section **Matériel et méthodes**. Les autres mélanges réactionnels contiennent en outre, comme indiqué, KH₂PO₄ (5 mM, pH 8), ADP (2 mM) ou NH₄Cl (2 mM).

^b 100% correspond, suivant l'époque de l'année à 80-600 μmoles de ferricyanure réduit par mg de chlorophylle et par h.

Tableau 3
*Restauration de la photoréduction de NADP⁺ en présence d'ascorbate (+DCPIP) chez
 des chloroplastes vieillis à l'obscurité ou à la lumière*

Conditions ^a	μmoles de NADPH formées/mg de chlorophylle/h. en fonction du temps d'incubation préliminaire (min)			
	0	45	90	300
Chloroplastes incubés à l'obscurité				
MR seul	83	82	81	42
MR + ascorbate-DCPIP	72	65	67	59
Rapport des activités	0,87	0,79	0,83	1,40
Chloroplastes incubés à la lumière				
MR seul	83	14	14	1
MR + ascorbate-DCPIP	72	68	68	39
Rapport des activités	0,87	4,86	4,86	39,00

^a Les conditions d'incubation des chloroplastes et de photoréduction de NADP⁺ sont décrites dans la section **Matériel et méthodes**. Dans les mélanges réactionnels complets, la quantité de chloroplastes correspond à 15 μg de chlorophylle/ml et les concentrations d'ascorbate et de dichlorophenol-indophenol (DCPIP) sont de 0,67 mM et de 33,3 μM, respectivement.

pendant 45 mn. Il faut attendre 225 mn. d'incubation pour que la stimulation de photoréduction due au couplage ou à l'action découplante de NH₄Cl disparaisse. Ainsi, un séjour des chloroplastes à l'obscurité n'altère que lentement le mécanisme responsable du couplage et du découplage. Contrairement à ce qui se passe à l'obscurité, ce mécanisme est extrêmement sensible à l'action d'un séjour prolongé des chloroplastes à la lumière. En effet, après 45 mn. déjà, toute la part du flux d'électrons due à un couplage et à un découplage a disparu.

Lorsque le ferricyanure est utilisé comme accepteur d'électrons, la photoréduction des chloroplastes n'est que peu sensible au vieillissement *in vitro*, à l'obscurité (v. Fig. 1). Un séjour prolongé à la lumière n'accentue que dans une faible mesure l'inhibition de l'activité de photoréduction. Lorsque le NADP⁺ est utilisé comme accepteur d'électrons (Tableau 3) l'activité de photoréduction des chloroplastes incubés à l'obscurité diminue faiblement et dans les mêmes proportions que celles observées en présence de ferricyanure. Pour les chloroplastes ayant séjourné à la lumière, il en va tout autrement: la capacité de réduction du NADP⁺ est fortement inhibée et devient nulle après 45 mn. déjà. Celle-ci peut être restaurée en présence d'un donneur d'électrons, par exemple, le couple ascorbate-DCPIP. La restauration de l'activité est particulièrement remarquable dans le cas des chloroplastes ayant séjourné à la lumière; le rapport des activités atteint 39 après 5 h. d'incubation.

Discussion

L'étude du gonflement des chloroplastes *in vitro* (8) nous a amené à considérer ce phénomène comme le résultat de processus attribuables au vieillissement (1, 9). A l'origine, cette hypothèse de travail nous a été suggérée par le fait que l'architecture structurale des chloroplastes isolés ayant subi un gonflement, soit par une

hypotonicité accrue du milieu de suspension, soit sous l'action prolongée de la lumière, est désorganisée (2, 3) d'une manière comparable à celle de chloroplastes âgés *in situ* ou carencés en azote au cours de leur croissance (10). En outre, la désorganisation de l'ordonnance des lamelles plastidiales, notamment en présence de lumière, est associée à des réactions de peroxydation (11) et de lyse des lipides (12) qui, précisément caractérisent les systèmes membranaires de particules cytoplasmiques en voie de vieillissement ou de détérioration (13).

Il est bien clair que les modifications structurales et biochimiques qui accompagnent le gonflement des chloroplastes *in vitro* vont à leur tour affecter les activités photosynthétiques des chloroplastes. En effet, qu'il s'agisse de la synthèse (v. Fig. 3) ou de l'hydrolyse d'ATP (v. Fig. 4), de la capacité des chloroplastes à se contracter sous l'action de la lumière (1), du dégagement d'O₂ (v. Fig. 2) ou de la photoréduction de NADP⁺ (v. Tableau 3), ces activités sont déprimées dans les chloroplastes ayant séjourné à l'obscurité. La durée du séjour nécessaire à l'obtention d'une inhibition complète varie de 4 à 6 h., temps qui est généralement requis pour un gonflement maximum des chloroplastes à l'obscurité (1). Un séjour des plastides isolés *en présence de lumière* accélère non seulement le gonflement des chloroplastes mais, simultanément, l'inhibition des activités étudiées. La lumière est donc un agent de synergisme.

De toutes les activités photochimiques mesurées chez des chloroplastes ayant séjourné à l'obscurité et à la lumière, la photoréduction du ferricyanure constitue une exception. En effet, cette activité est beaucoup plus résistante que les autres à une incubation prolongée des chloroplastes (v. Fig. 1). Ainsi, dans nos conditions, le vieillissement des chloroplastes *in vitro* a pour effet de découpler le flux d'électrons et la photophosphorylation qui lui est associée. Ce découplage explique probablement l'apparente accélération de la photoréduction du ferricyanure chez des chloroplastes ayant séjourné à l'obscurité (v. Fig. 1). Cet effet de découplage est encore plus prononcé lorsque les chloroplastes vieillissent en présence de lumière (comparer les données des Tableaux 1 et 2).

Les changements de structure et des activités photochimiques des chloroplastes au cours de leur vieillissement *in vitro* sont comparables, à bien des égards, à ceux qui résultent d'une fragmentation des chloroplastes par sonication (14) ou par un traitement aux détergents (15-17). En ce qui concerne la structure tout d'abord, plusieurs auteurs ont montré que des détergents comme le dodécylbenzène sulfonate (15), les acides alkenylsucciniques (16) et le Triton-X (17) provoquent un gonflement des chloroplastes. En outre, il est intéressant de relever que ces détergents ont été reconnus comme des inhibiteurs de la contraction des chloroplastes. Ainsi, les détergents et le vieillissement à l'obscurité ont, apparemment du moins, le même effet sur la structure des chloroplastes. Dans le cas du vieillissement, l'action synergique de la lumière peut être comparée à l'effet d'une concentration croissante du détergent ou à une durée d'incubation plus longue des chloroplastes en sa présence.

En ce qui concerne les activités photochimiques, la même similitude peut être établie entre les conséquences d'un vieillissement des chloroplastes *in vitro* et l'action des détergents. Par exemple, ANDERSON et BOARDMAN (18) ont montré qu'en fonction du temps d'incubation dans 0,5% de digitonine, les chloroplastes présentent une activité de photoréduction du ferricyanure plus résistante que celle du NADP⁺.

Les mêmes résultats sont obtenus chez des chloroplastes vieillissant (comparer les données de la Fig. 1 et du Tableau 3) ou ayant subi une sonication (19). Mais la similitude la plus remarquable concerne sans doute l'effet découplant provoqué par un vieillissement des chloroplastes *in vitro* (v. Fig. 1, Tableaux 1 et 2) et celui qu'entraîne une sonication (14) ou un traitement des chloroplastes par le Triton-X à 0,007% (17). La grande sensibilité du mécanisme de la photophosphorylation vis-à-vis d'un vieillissement *in vitro* est en outre illustrée par le fait que la part du flux d'électrons due à un couplage en présence des réactifs de la photophosphorylation (ADP, P_i , Mg^{++}) ou à un découplage en présence de NH_4Cl est très rapidement inhibée (v. Tableau 2). En effet, un séjour des chloroplastes pendant 45 mn. à la lumière suffit à abaisser le flux d'électrons à son niveau initial. Un effet analogue, provoqué par des concentrations croissantes de digitonine a été observé par IZAWA et GOOD (20) sur la réaction de HILL en présence et en absence de l'agent découplant, méthylamine.

Un autre parallélisme frappant peut être établi entre les conséquences d'un vieillissement (à l'obscurité ou à la lumière) et l'action des acides gras sur le volume et les activités photochimiques des chloroplastes. En effet, plusieurs auteurs ont montré que l'hydrolyse enzymatique des lipides endogènes est considérablement accrue chez des chloroplastes sénescents (21) ce qui a pour conséquence d'augmenter la concentration en acides gras libres dans le plastide principalement en acide linoléique (11, 12, 21-23). Or, il a été démontré par GRESSEL et AVRON (14) que la lipase pancréatique et la phospholipase A, ajoutées à des chloroplastes frais, avaient pour conséquence de découpler les photoréactions d'une manière comparable à celle d'un vieillissement *in vitro*. L'augmentation de la teneur en acides gras libres, notamment de l'acide linoléique, dans le chloroplaste au cours du vieillissement pourrait être responsable non seulement de l'effet de découplage observé (21) mais encore du gonflement des chloroplastes (3). Toutefois, en ce qui concerne l'action des acides gras sur le volume des chloroplastes, un point demeure obscur. En effet, MURAKAMI et NOBEL (3) ont montré que les acides laurique, stéarique et oléique se comportaient comme des agents de gonflement des chloroplastes à l'obscurité (pendant les 30 premières minutes d'incubation) mais qu'ils inhibaient le gonflement des chloroplastes à la lumière. Ainsi, le processus de gonflement des chloroplastes activé par la lumière (v. Fig. 1 dans la **Références 1**) ne semble pas pouvoir s'expliquer par une simple amplification par la lumière du phénomène qui se produit à l'obscurité et qui aurait pour cause l'accumulation d'acides gras libres.

Notons enfin que l'activité de photoréduction de $NADP^+$, perdue chez des chloroplastes sénescents, peut-être restaurée par le couple donneur d'électrons ascorbate-DCPIP (v. Tableau 3). Cette observation confirme les résultats de VERNON et ZAUGG (24) et suggère que le vieillissement des chloroplastes, surtout en présence de lumière, perturbe l'intégrité fonctionnelle du photosystème II.

Ce travail a pu être réalisé grâce à l'appui du Fonds national suisse de la recherche scientifique (contrat No 5345) et à la collaboration technique de Melle TJOE TAN.

Références

- (1) SIEGENTHALER, P. A.: Viellissement de l'appareil photosynthétique I. Effet synergique de la lumière et du vieillissement sur les changements de volume de chloroplastes isolés d'épinard. *Plant & Cell Physiol.*, **10**, 801-810 (1969).
- (2) IZAWA, S. and N. E. GOOD: Effect of salts and electron transport on the conformation of isolated chloroplasts II. Electron microscopy. *Plant Physiol.*, **41**, 544-552 (1966).
- (3) MURAKAMI, S. and P. S. NOBEL: Lipids and light-dependent swelling of isolated spinach chloroplasts. *Plant & Cell Physiol.*, **8**, 657-671 (1967).
- (4) HORWITT, B. N.: Determination of inorganic serum phosphate by means of stannous chloride. *J. Biol. Chem.*, **199**, 537-541 (1952).
- (5) SAN PIETRO, A. and H. M. LANG: Photosynthetic pyridine nucleotide reductase I. Partial purification and properties of the enzyme from spinach. *ibid.*, **231**, 211-229 (1958).
- (6) DILLEY, R. A. and L. P. VERNON: Changes in light absorption and light scattering properties of spinach chloroplasts upon illumination: relationship to phosphorylation. *Biochem.*, **3**, 817-824 (1964).
- (7) HIND, G. and A. T. JAGENDORF: Light scattering changes associated with the production of a possible intermediate in photophosphorylation. *J. Biol. Chem.*, **240**, 3195-3201 (1965).
- (8) PACKER, L. and P. A. SIEGENTHALER: Control of chloroplast structure by light. *Int. Rev. Cytol.*, **20**, 97-124 (1966).
- (9) SIEGENTHALER, P. A.: Synergetic effect of light and ageing on the swelling and photochemical activities of isolated chloroplasts. *Experientia*, **24**, 1198-1199 (1968).
- (10) BOURDU, R., M. L. CHAMPIGNY, M. LEFORT, M. MASLOW and A. MOYSE: Structure et activités de l'appareil photosynthétique des feuilles de *Bryophyllum daigremontianum* BERGER, en fonction de leur croissance, de la carence et de la nutrition azotée II. Structure, réaction de HILL et photophosphorylation cyclique des chloroplastes. *Physiol. vég.*, **3**, 355-392 (1965).
- (11) HEATH, R. L. and L. PACKER: Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **125**, 189-198 (1968).
- (12) WINTERMANS, J. F. G.: Observation on changes in lipid components of isolated chloroplasts. Dans *Le Chloroplaste, Croissance et Viellissement*. Edité par C. SIRONVAL. p. 86-90. Masson et Cie, Paris, 1967.
- (13) PACKER, L., D. W. DEAMER and R. L. HEATH: Regulation and deterioration of structure in membranes. *Adv. Gerontol. Res.*, **2**, 77-120 (1967).
- (14) GRESSEL, J. and M. AVRON: The effects of structural degradation on the coupled photochemical activities of isolated chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, **94**, 31-41 (1965).
- (15) ITOH, M., S. IZAWA and K. SHIBATA: Disintegration of chloroplasts with dodecylbenzene sulfonate as measured by flattening effect and size distribution. *ibid.*, **69**, 130-142 (1963).
- (16) SIEGENTHALER, P. A. and L. PACKER: Light-dependent volume changes and reactions in chloroplasts I. Action of alkenylsuccinic acids and phenylmercuric acetate and possible relation to mechanism of stomatal control. *Plant Physiol.*, **40**, 785-791 (1965).
- (17) NEUMANN, J. and A. T. JAGENDORF: Uncoupling photophosphorylation by detergents. *Biochim. Biophys. Acta*, **109**, 382-389 (1965).
- (18) ANDERSON, J. M. and N. K. BOARDMAN: Fractionation of the photochemical systems of photosynthesis I. Chlorophyll contents and photochemical activities of particles isolated from spinach chloroplasts. *ibid.*, **112**, 403-421 (1966).
- (19) KATO, S. and A. TAKAMIYA: Restoration of NADP photoreducing activity of sonicated chloroplasts by plastocyanin. *ibid.*, **99**, 156-160 (1965).
- (20) IZAWA, S. and N. E. GOOD: HILL reaction rates and chloroplast fragment size. *ibid.*, **109**, 372-381 (1965).
- (21) MCCARTHY, R. E. and A. T. JAGENDORF: Chloroplast damage due to enzymatic hydrolysis of endogenous lipids. *Plant Physiol.*, **40**, 725-735 (1965).

- (22) CONSTANTOPOULOS, G. and C. N. KENYON: Release of free fatty acids and loss of HILL activity by ageing spinach chloroplasts. *Plant Physiol.*, **43**, 531-536 (1968).
- (23) MOLOTKOVSKY, Y. G. and I. M. ZHESKOVA: The influence of heating on the morphology and photochemical activity of isolated chloroplasts. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **20**, 411-415 (1965).
- (24) VERNON, L. P. and W. S. ZAUGG: Photoreduction by fresh and aged chloroplasts: Requirement for ascorbate and 2,6-dichlorophenolindophenol with aged chloroplasts. *J. Biol. Chem.*, **235**, 2728-2733 (1960).