

UNIVERSITE DU QUEBEC

THESE PRESENTEE A  
L'UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE POUR L'OBTENTION  
DU DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE

PAR  
MARC BEAUREGARD

BACCALAUREAT ES SCIENCES (CHIMIE, UQTR)

MODULATION DE L'ACTIVITE ET DE LA STRUCTURE DU  
PHOTOSYSTEME II PAR LES IONS SULFITE ET SULFATE.

SEPTEMBRE 1988

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## RESUME

La thèse présentée traite de l'étude de certains mécanismes qui régissent l'activité du complexe chlorophylle-protéine photosystème II (PSII) du chloroplaste. Elle consiste en une investigation biochimique, électrochimique et spectroscopique de l'impact des ions sulfate et sulfite sur le PSII. Mon travail démontre que l'inhibition de l'activité du PSII par l'ion sulfate consiste en une compétition entre les ions sulfate et les ions chlorures liés au complexe de dégagement d'oxygène (CDO). L'enlèvement des chlorures par le sulfate conduit à un blocage total d'une partie de la population des PSII, plutôt qu'à un blocage partiel de tous les PSII. J'ai démontré que le sulfate affecte principalement l'activité photochimique du PSII<sub>a</sub> et entraîne ainsi la perte du dégagement d'oxygène détecté. Le travail présenté révèle que l'inhibition du CDO par le sulfate à haute concentration est accompagné du largage des polypeptides de 23 et 18 kDa. Les polypeptides de 23 et 18 kDa sont enlevés du PSII à pH supérieur à 7 et cet enlèvement est stimulé par la présence de sulfate. Les traitements au sulfate ont donc deux conséquences: l'enlèvement des chlorures et le largage de polypeptides impliqués dans la fonction des chlorures. La photoactivation du PSII qui implique la fixation de ces polypeptides est aussi sensible à la présence des ions sulfate. Je n'ai détecté aucun rôle des chlorures dans le maintien des liens entre ces

polypeptides et le PSII. Mes résultats indiquent que les polypeptides de 23 et 18 kDa seraient liés au PSII via des interactions électrostatiques. Dans le cas de la protéines de 33 kDa, mes travaux supportent l'existence de ponts hydrogènes et suggèrent que les ponts disulfures ont aussi un rôle à jouer dans le maintien des liens entre la protéine et le PSII. Le travail présenté démontre que le PSII est aussi sensible à l'incubation avec l'ion sulfite. En solution, le sulfite s'oxyde rapidement pour diminuer la quantité d'oxygène dissout et se transformer en sulfate. La nature de l'inhibition au sulfite est donc très complexe ce qui explique le débat existant sur l'effet du sulfite. L'instabilité du sulfite et l'inhibition réversible du CDO dans le PSII par le sulfate semble expliquer plusieurs observations faites à partir d'expériences de fumigation au  $\text{SO}_2$  sur des plantes entières in vivo. Je propose que l'inhibition du PSII par le sulfate est un mode d'action du  $\text{SO}_2$  et des pluies acides sur la photosynthèse des plantes. Les résultats de mes travaux m'ont aussi permis de proposer un modèle décrivant la chimie des ions sulfate et sulfite dans le chloroplastes et de rationaliser l'impact de différents facteurs sur la sensibilité du PSII face à ces ions.

## REMERCIEMENTS

A Radovan Popovic, mon directeur de thèse mais surtout mon ami, complice et conseiller, je redis ma reconnaissance pour le soutien professionnel et personnel constant qu'il m'a accordé si généreusement. Radé, ce n'est pas facile de satisfaire à tes exigences, mais aujourd'hui je suis heureux de regarder le travail réalisé ensemble. A ton image, je tenterai moi aussi d'insufler l'énergie et l'enthousiasme aux jeunes chercheurs qui me seront éventuellement confiés.

A mes amis du 2007, Jean-Claude, Pascal; Guy et Luc, merci pour l'amitié dont vous m'avez honoré. Merci aussi pour l'atmosphère incomparable que vous avez contribué à donner à notre milieu de travail.

A mes parents, qui ont su m'apporter le support moral et financier en temps heureux et moins heureux, je vous dis mon succès est le vôtre.

A ma grande amie Hélène, merci pour ta compréhension face aux multiples contraintes que mes études ont pu nous apporter.

A M. J.R. Parent, ainsi qu'aux organismes gouvernementaux qui m'ont appuyé financièrement, merci pour votre confiance.

TABLE DES MATIERES

	page
RESUME.....	i
REMERCIEMENTS.....	iii
TABLE DES MATIERES.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES ABREVIATIONS.....	xv
CHAPITRES 1.	
<u>INTRODUCTION</u> .....	1
1.1. La photosynthèse.....	1
1.1.1. Le chloroplaste.....	2
1.1.2. Les complexes chlorophylle-protéine.....	4
1.1.2.1. Capture de l'énergie lumineuse.....	4
1.1.2.2. Antennes des photosystèmes I et II....	6
1.1.2.3. Centres réactionnels I et II.....	9
1.1.3. Séparation de charges, transport d'électrons..	9
1.1.3.1. Transport dans le photosystème II.....	9
1.1.3.2. Transport secondaire.....	11
1.1.3.3. Transport dans le photosystème I.....	11
1.1.4. Photophosphorylation.....	11
1.1.5. Assimilation du CO <sub>2</sub> .....	12
1.2. Vision détaillée du photosystème II.....	13
1.2.1. Fonctions du photosystème II.....	13

1.2.2.	Composition et structure du photosystème II..	15
1.2.3.	Le complexe de dégagement d'oxygène.....	19
1.2.4.	Fluorescence variable du photosystème II.....	26
1.3.	But du travail.....	30
1.3.1.	Pollution par le SO <sub>2</sub> versus photosynthèse...	30
1.3.2.	Objectifs et importance du projet de thèse...	35
CHAPITRE 2.		
	<u>METHODOLOGIE EXPERIMENTALE.....</u>	38
2.1.	Choix et préparation du matériel biologique.....	38
2.1.1.	Isolation des chloroplastes.....	38
2.1.2.	Extraction de membranes enrichies en photosystème II.....	40
2.1.3.	Cultures des algues <u>Dunaliella bardawil</u> .....	41
2.2.	Traitements au sulfite et au sulfate.....	42
2.3.	Méthodes analytiques.....	43
2.3.1.	Séparation des protéines par électrophorèse..	43
2.3.2.	Dégagement d'oxygène par polarographie en continu et par éclairs.....	45
2.3.3.	Transport d'électrons par colorimétrie.....	48
2.3.4.	Activité photochimique par fluorescence.....	49
	variable	
2.3.5.	Transfert d'énergie par fluorospectroscopie..	51
CHAPITRE 3.		
	<u>RESULTATS ET INTERPRETATIONS.....</u>	53
3.1.	Effets du sulfite sur le photosystème II.....	53

3.1.1. Inhibition du dégagement d'oxygène du photosystème II par l'ion sulfite.....	53
3.1.2. Enlèvement des polypeptides du complexe de dégagement d'oxygène par le sulfite de sodium.....	60
3.2. Effets du sulfate sur le photosystème II.....	67
3.2.1. Inhibition du dégagement d'oxygène du photosystème II par l'ion sulfate.....	67
3.2.2. Enlèvement des polypeptides du complexe de dégagement d'oxygène par le sulfate de sodium.....	75
3.2.3. Effet du sulfate sur le PSII dans les thylacoïdes.....	84
3.2.4. Effet de l'ion sulfate sur l'activité photochimique des photosystèmes II a et b....	90
3.2.5. Réversibilité de l'inhibition du photosystème II par le sulfate dans l'algue marine <u>Dunaliella bardawil</u> .....	99
3.2.6. Inhibition du processus de photoactivation du CDO par le sulfate de sodium.....	113
CHAPITRE 4.	
<u>CONCLUSIONS</u> .....	125
4.1. Aspects fondamentaux.....	125
4.2. Aspects pratiques.....	127
BIBLIOGRAPHIE.....	132

## LISTE DES TABLEAUX

## Tableaux

1. Les composantes du PSII (adapté de Ghanotakis et Yocum, 1985).....17
2. Effet de l'incubation au sulfate de sodium sur la quantité relative de protéines de 23 et 18 kDa liée au PSII... ..72
3. Effet du sulfate (50 mM) sur l'activité du PSII après différentes périodes d'incubation des thylacoïdes.....85
4. Paramètres fonctionnels de l'activité des PSII a et b dans les thylacoïdes traités avec le sulfate.....96
5. Transport d'électron des PSII non-photoactivés et photoactivés par colorimétrie de DCPIP.....115
6. Effet de l'infiltration avec différents sels sur la photoactivation de feuilles cultivées sous éclairs.....122

## LISTE DES FIGURES

## Figures

1. Structure du chloroplaste.....3
2. Structure de la membrane du thylacoïde.....4
3. Représentation schématique des pigments antennes  
du PSII.....6
4. Spectre d'émission de fluorescence du chloroplaste  
à basse température.....8
5. Représentation imagée de la structure des  
thylacoïdes et de leurs complexes protéiques.....10b
6. Schéma en Z indiquant les potentiels  
d'oxido-réduction au point milieu pour les  
composantes du transport d'électrons du  
thylacoïde.....11b
7. Cycle de Calvin.....12b
8. Transport d'électrons dans le PSII.....14

9.	Centre réactionnel de <u>Rhodospseudomonas viridis</u> (d'après Deisenhofer <u>et coll.</u> 1985).....	18
10.	Polypeptides du PSII.....	19b
11.	Intensité du dégagement d'oxygène induit par éclairs.....	24
12.	Cycle des états S du dégagement d'oxygène.....	24b
13.	Modèle de coordination des atomes de manganèse par les atomes d'oxygène pendant l'oxidation de l'eau.....	25
14.	Fluorescence variable mesurée sur différentes échelles de temps avec l'inscription des transients caractéristiques.....	28
15.	Partie supérieure: induction de fluorescence en présence de DCMU. Partie inférieure: Analyse logarithmique de la différence entre le niveau F <sub>max</sub> et la fluorescence au temps t.....	29
16.	Absorption du SO <sub>2</sub> et du sulfate par les plantes....	32

17.	Entrée du sulfate et du sulfite dans la cellule végétale.....	34
18.	A) Préparation des chloroplastes brisés; B) Extraction des MEPSII.....	40b
19.	Séparation des protéines des chloroplastes brisés (thyl) et des MEPSII (PSII).....	41b
20.	Fluorescence variable de chloroplastes traités au DCMU et aire complémentaire.....	50
21.	Effet du sulfite de sodium sur le dégagement d'oxygène des thylacoïdes.....	55
22.	Effet du sulfite sur la concentration de l'oxygène en solution en présence ou non d'accepteurs artificiels.....	56
23.	Effet du pH sur la concentration d'oxygène en solution en présence de 10 mM sulfite de sodium....	57
24.	Dépendance entre la concentration de l'accepteur p-BQ, la concentration en sulfite et l'activité apparente en dégagement d'oxygène dans les chloroplastes brisés.....	58

25. Comparaison de l'activité mesurée en présence de sulfite et en absence de sulfite dans la suspension de chloroplaste.....59
26. Enlèvement des polypeptides de 23 et 18 kDa par le sulfite de sodium à pH 8.0.....63
27. Effet de l'incubation à pH 9.8 avec et sans sulfite de sodium sur la composition en protéines des MEPSII.....64
28. Effet de la concentration de sulfite de sodium sur l'enlèvement de la protéine de 33 kDa.....66
29. Inhibition de l'activité en dégagement d'oxygène du PSII par le sulfate de sodium.....69
30. Effet de la lumière sur l'inhibition de l'activité du PSII par le sulfate de sodium.....70
31. Densitogrammes des patrons de séparation des polypeptides des échantillons contrôles et traités avec 50 mM sulfate de sodium.....71

32. Comparaison de l'effet du sulfate sur l'activité en dégagement d'oxygène et sur l'enlèvement des polypeptides de 23 et 18 kDa du PSII.....73
33. Enlèvement des polypeptides de 23 et 18 kDa par le sulfate de sodium à pH 7.25.....78
34. Effet de l'incubation au sulfate (pH 7.25) sur le dégagement d'oxygène et le contenu de protéine de 23 et 18 kDa des MEPSII.....79
35. Effet du sulfate de sodium sur la proportion de polypeptides de 23 et 18 kDa liés au PSII à différent pH d'incubation.....80
36. Effet du sulfate de sodium sur l'activité des PSII après incubation à différents pH.....81
37. Fluorescence normalisée de thylacoïdes traités avec 100 mM sulfate et avec différentes concentrations de chlorure de sodium.....87
38. Effet de l'incubation de thylacoïdes dans 100 mM sulfate sur le dégagement d'oxygène induit par éclair.....88

39. Effet du sulfate sur la fluorescence normalisée des thylakoides mesurée en absence de DCMU .....93
40. Graphique semi-logarithmique de l'accroissement de l'aire au-dessus de la courbe de fluorescence enregistrée en présence de DCMU traités avec le sulfate de sodium.....94
41. Graphique semi-logarithmique de l'accroissement de l'aire au-dessus des courbes de fluorescence mesurées en présence de DCMU après traitement avec 100 mM sulfate et différentes concentrations de chlorure de sodium.....97
42. Effet de la concentration en sulfate sur la croissance des algues Dunaliella bardawil.....103
43. Recouvrement de la fluorescence variable des algues incubées dans 0.75 M sulfate de sodium.....105
44. Effet de la concentration de sulfate de sodium sur la fluorescence au niveau P après différentes périodes d'incubation.....106

45. Spectre d'émission de fluorescence à basse température des algues après 24 heures de croissance dans différentes concentrations de sulfate de sodium.....109
46. Effet du sulfate de sodium sur la photoactivation de feuilles cultivées sous éclaircs détectée par fluorescence variable.....116
47. Effet du sulfate de sodium sur la photoactivation de feuilles partiellement photoactivées.....119
48. Modification du spectre de fluorescence pendant la photoactivation à température de la pièce.....120
49. Modèle de l'effet du SO<sub>2</sub> sur le PSII in vivo....130

LISTE DES ABBREVIATIONS

- ADP: adénosine diphosphate
- ATP; adénosine triphosphate
- CCL: complexes capteurs de lumière (LHC)
- CDO: complexe de dégagement d'oxygène
- chl: chlorophylle
- Cyt: cytochrome
- D: donneur d'électrons auxiliaire du photosystème II
- DCBQ: 2,5-dichlorobenzoquinone
- DCMU: 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthyl urée
- DCPIP: dichlorophénol-indophénol
- DPC: diphényl carbazide
- FeCN: ferricyanure de potassium (Fe III)
- Hepes: acide N-2-hydroxyethylpipérazine-N'-2-ethanesulfonique
- kD, kDa: kiloDaltons
- MEPSII: membranes enrichies en photosystème II
- Mn: atomes de manganèse (état d'oxydation non-défini)
- Mes: acide 2[N-morpholino]éthane sulfonique
- NADPH: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
- O,I,D,P,S,M: Niveaux caractéristiques de fluorescence variable
- pBQ: p-benzoquinone
- PQ: plastoquinone
- phéo: phéophytine, premier accepteur d'électrons du  
photosystème II

PSI: photosystème I

PSII: photosystème II

P680: centre réactionnel du PSII

P700: centre réactionnel du PSI

Qa et Qb: accepteurs primaire et secondaire du PSII

Temed: N,N,N',N'-tétraméthyl-éthylène diamine

tris, Trizma: tris(hydroxyméthyl)aminométhane

Z: donneur d'électrons du PSII

## CHAPITRE I

INTRODUCTION

Le procédé le plus fondamental et essentiel de la biologie s'est développé il y a plus de trois milliards d'années, peu après l'apparition des premiers organismes vivants. La photosynthèse, mécanisme par lequel la lumière solaire est transformée en énergie utilisable par les êtres vivants, demeure la clef de voûte de toute la vie sur Terre. L'énergie lumineuse captée 'nourrit' non seulement les organismes photosynthétiques, mais aussi indirectement les autres êtres vivants qui se nourrissent de ces organismes, et ainsi de suite tout au long de la chaîne alimentaire.

Une vue générale du procédé de la photosynthèse est présentée en première partie du présent chapitre, de façon à situer le sujet de recherche de cette thèse. Une discussion détaillée du photosystème II, ainsi que la présentation du but du travail suivront en seconde et dernière partie de l'introduction.

1.1. La photosynthèse: La photosynthèse peut se résumer de la façon suivante: l'énergie lumineuse, absorbée par la chlorophylle (chl), est utilisée pour tirer les électrons de l'eau et augmenter leur potentiel réducteur à un niveau requis pour la réduction du dioxyde de carbone. Dans ce procédé, le phosphate inorganique forme un esther avec l'adénosine diphosphate (ADP) pour donner l'adénosine triphosphate (ATP)

qui sera utilisé, conjointement au potentiel réducteur créé sous forme de NADPH, pour la réduction du CO<sub>2</sub> en sucres via le cycle de 'Calvin' (Arnon 1987). Grossièrement, la réaction globale peut s'exprimer par l'équation suivante:



Les multiples entités biochimiques et les mécanismes de réactions auxquels elles prennent part sont localisés dans le chloroplaste.

1.1.1. Le chloroplaste: Dans les algues et les plantes vertes, la photosynthèse s'opère dans un organe de la cellule appelé chloroplaste. La fonction unique et d'importance capitale du chloroplaste est la transformation de l'énergie lumineuse premièrement en énergie électrique, puis en énergie chimique. Dans les systèmes biologiques, l'énergie électrique peut être sous forme de gradients de potentiel qui résultent d'une séparation de charges et/ou d'une concentration sélective d'ions de part et d'autre d'une membrane. La structure la plus simple permettant la production et le maintien d'un gradient ionique est une membrane fermée semi-perméable à travers laquelle on peut pomper des espèces ioniques. Dans le chloroplaste, cette structure se présente sous forme de saccules aplatis appelés thylacoïdes (Hooper 1984). Le chloroplaste est séparé du cytosol par une enveloppe externe formée de deux feuilletts. L'espace délimité par l'enveloppe du chloroplaste, appelé le stroma, contient les enzymes nécessaires au métabolisme du carbone et autres

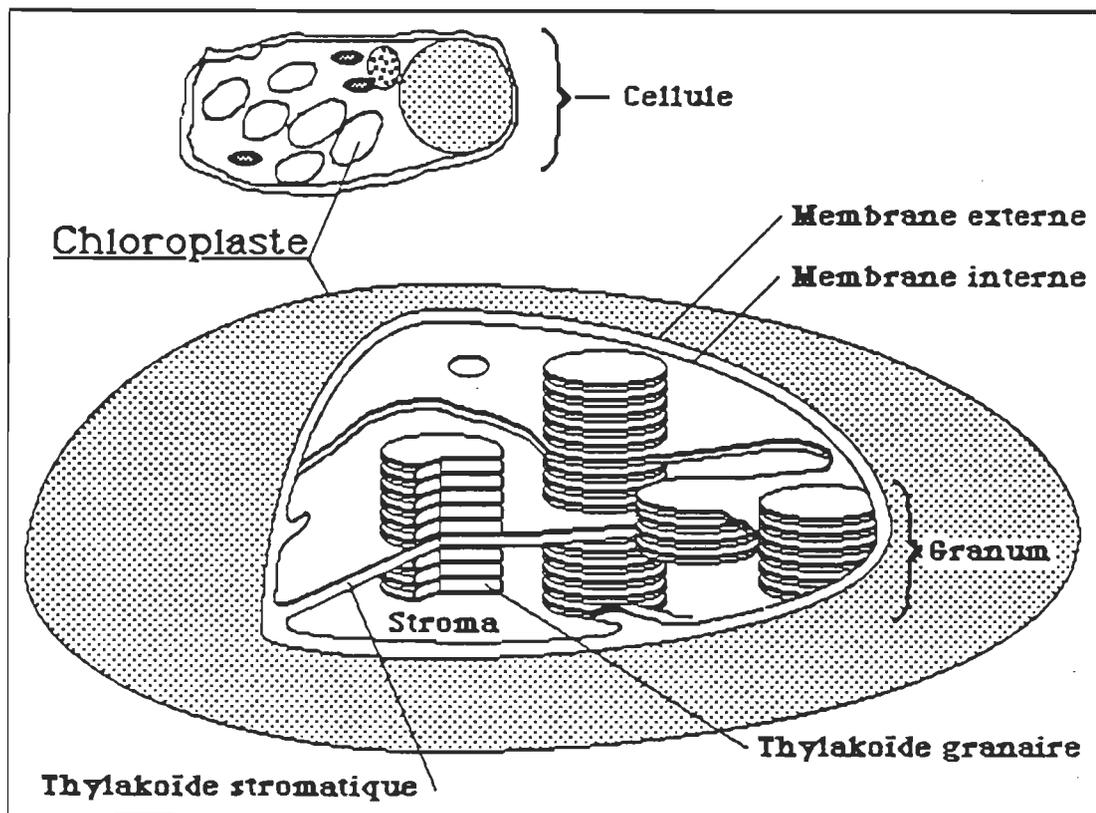


Figure 1. Structure du chloroplaste.

composés. C'est aussi dans le compartiment du stroma que l'on trouve le système de thylacoïdes (voir Fig. 1). Ils sont différenciés par le fait que certains sont empilés et forment les granums, tandis que les thylacoïdes non-empilés qui relient les granums sont les thylacoïdes du stroma. Les thylacoïdes contiennent des lipides et des protéines dans un rapport 1:1. Les lipides sont arrangés en double couche ayant leur groupe polaire et hydrophile du côté externe de la double couche. L'intérieur de la membrane est donc hydrophobique dû à la présence des sections non-polaires (chaines grasses) des lipides dans cette région. On retrouve dans la membrane des protéines dites intrinsèques et à la surface de la membrane

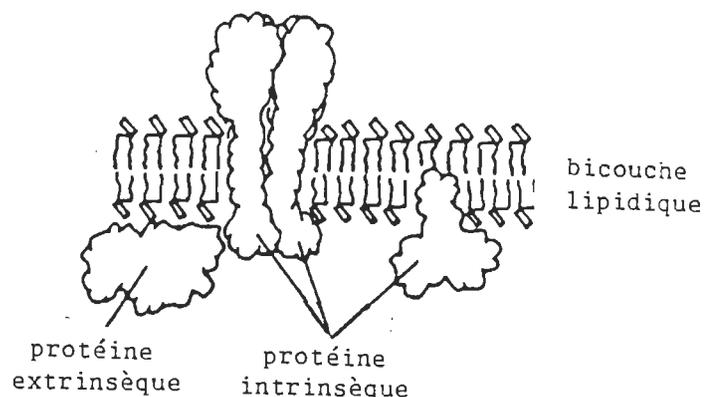


Figure 2. Structure de la membrane du thylacoïde.

sont associés d'autres polypeptides hydrosolubles (voir fig 2). Ils sont dénotés extrinsèques dans ce cas. Notons que les protéines du thylacoïde sont celles qui sont associées aux pigments photosynthétiques et qui sont responsables de la transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique. Ces systèmes pigmentaires sont dédiés au processus primaire de la photosynthèse.

#### 1.1.2. Les complexes chlorophylle-protéine:

1.1.2.1. Capture de l'énergie lumineuse: Chaque thylacoïde contient à peu près 100000 molécules de pigments (Witt 1975) qui sont des chlorophylles et des caroténoïdes. Les plantes supérieures contiennent la chlorophylle-a et la chlorophylle-b, les deux formes ayant le rôle prépondérant d'absorber la lumière et de la transformer en énergie

électrique utile pour la photosynthèse primaire du chloroplaste. La chlorophylle et les autres pigments accessoires ont des maximums d'absorption de longueur d'onde différentes, qui s'échellonnent de 400 à 750nm. Cependant, l'absorption de lumière est maximale à environ 435 et 680 nm à cause des propriétés photophysiques de la chlorophylle. L'absorption d'un photon par une chlorophylle se traduit par une transition électronique partant du niveau fondamental à un niveau excité. L'état fondamental de la chlorophylle est généralement l'état singulet et l'absorption d'un photon produit le premier état singulet excité. Ceci se fait en quelque  $10^{-15}$ s (Pearlstein 1982). L'excitation est alors transférée par migration excitonique ou par transfert d'énergie de résonance ( type Forster) à travers le système de chlorophylle antenne vers les centres réactionnels des photosystèmes I et II (PSI et PSII) (Forster 1965, Franck et Teller 1938). Une partie de l'énergie captée n'est cependant pas utilisée efficacement pour la séparation de charge. La perte de l'énergie excitonique peut se faire par émission de chaleur (Popovic et coll., 1987b) ou par réémission de lumière sous forme de fluorescence et phosphorescence (Lavorel et coll., 1986). La fluorescence implique la lumière émise lors d'une désexcitation radiative d'un état singulet excité et se produit dans un délai de moins de  $10^{-8}$ s. La phosphorescence est l'émission de lumière due à la relaxation d'états métastables ayant des temps de vie plus élevés (états triplets). Malgré les mécanismes compétitifs à l'utilisation

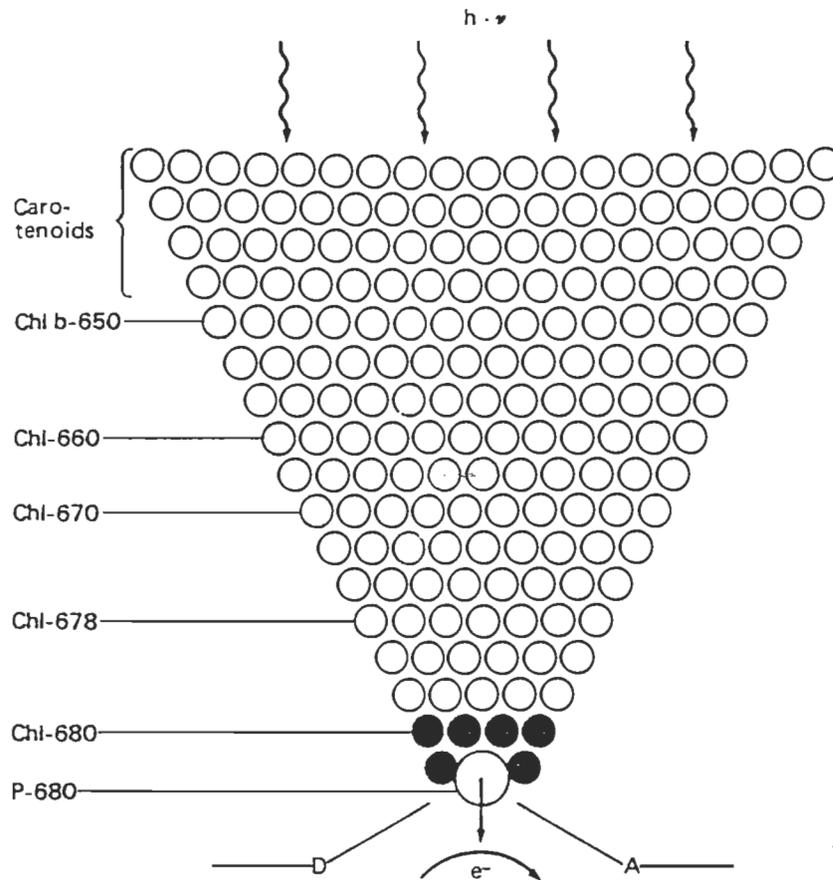


Figure 3. Représentation schématique des pigments antennes du PSII.

efficace de l'énergie excitonique, le transfert d'énergie des complexes chlorophylle-protéine antennes vers les PSI et PSII est très efficace (98%) (Danks 1983).

#### 1.1.2.2. Antennes des photosystèmes I et II:

Environ 99% de la population totale de chlorophylle sert à capter l'énergie lumineuse et à l'acheminer sous forme excitonique aux deux centres réactionnels appartenant aux PSI et PSII où s'opère la séparation de charge (Sauer 1981). La

figure 3 montre un modèle théorique de l'arrangement "énergétique" des pigments dans un photosystème. Ces chlorophylles 'antennes' sont associées à d'autres pigments accessoires tels les caroténoïdes dans des structures protéiques membranaires. Il existe plusieurs variétés de protéines ayant pour rôle la capture de l'énergie lumineuse. Les complexes chlorophylle-protéines associés au PSI sont de deux genres. L'antenne "intime" du PSI est formée de 130 chlorophylle-a associées à un tétramère de protéines de 70 kDaltons. Le second niveau d'antenne est dans le complexe capteur de lumière du PSI (CCL I) qui est composé de polypeptides de 20-25 kDaltons et apporte une contribution de 80 chlorophylles (60 chl-a, 20 chl-b) à l'antenne du PSI (Glazer et Melis 1987). Comme le révèle la figure 4, à basse température, les chlorophylles antennes du PSI émettent la fluorescence dont la longueur d'onde approximative est de 735 nm (Krause et Weis 1984).

Pour le photosystème II, on dénombre trois types de chlorophylle-protéines. Le premier type est formé par les polypeptides de 47 et 43 kDalton qui retiennent environ 50 chl-a et qui sont les antennes intimes du PSII. Le second niveau de capture de lumière est dans les complexes capteurs de lumière (CCL) intrinsèques au PSII. Les CCL-II sont formés de polypeptides de 25-30 kDa et contribuent à augmenter le nombre de chlorophylle du PSII de 80 molécules, contingent formé par la chlorophylle-a et b. Le troisième type de chlorophylle-protéine chargé de fournir les excitons

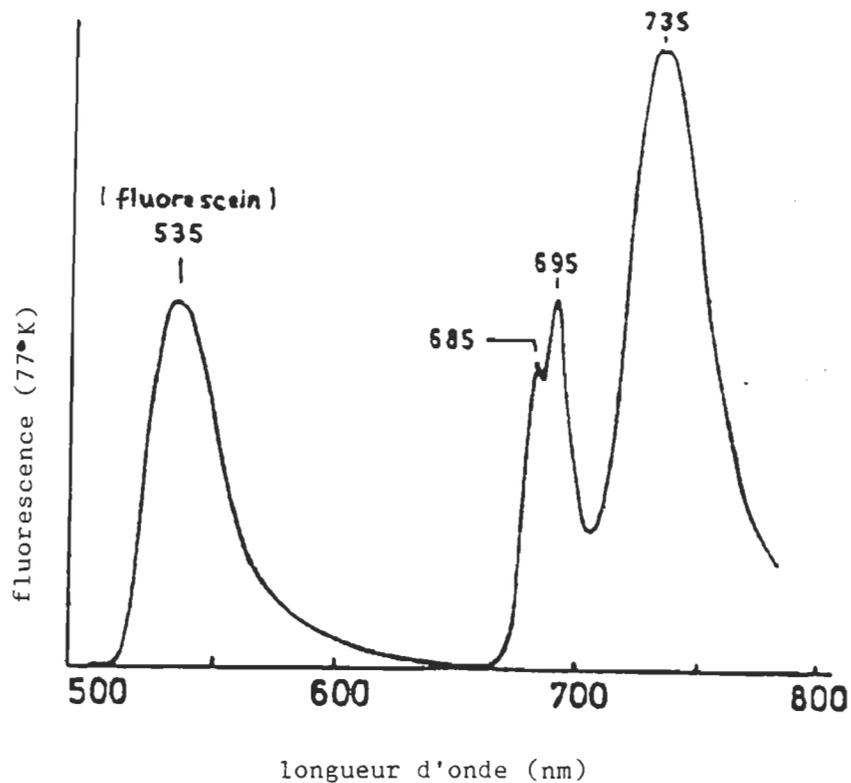


Figure 4. Spectre d'émission de fluorescence du chloroplaste à basse température.

au PSII est le CCL-II extrinsèque. Les polypeptides du CCL-II extrinsèques ont 25-30 kDa en masse apparente, et portent 13 chl par polypeptides (chl<sub>a</sub>/b = 1/4). L'association des CCL-II au PSII augmente de 120 chl (variable) sa capacité antenne (Glazer et Melis 1987). L'émission de fluorescence à basse température (voir la figure 4) pour les chlorophylles antennes "intimes" se fait à 695 nm tandis que celle des CCL-II est centrée sur 685 nm (Krause et Weis 1984). Bien que la structure des complexes antennes ne soit pas déterminante dans le contexte du travail, une représentation physique de

leur proximité avec les centres réactionnels est donnée sur la figure 5.

1.1.2.3. Centre réactionnels I et II: La petite fraction des chlorophylles restante, 1%, n'a pas de rôle 'antenne'. Cette population de chlorophylle se retrouve dans les PSI et PSII où elle forme les centre réactionnels. Dans ce cas, les chl-a sont liées dans un environnement spécial qui leur permet de piéger l'énergie transférée par leur antenne intime et leurs CCL. Les chlorophylles formant le centre réactionnel sont sous forme dimérique (Diner 1986) et sont appelées P680 dans le cas du PSII à cause de son maximum d'absorption à environ 680nm (Doring 1969). Le centre réactionnel du PSI (RC I) aussi un dimère de chlorophylle-a montre un changement d'absorption à 700 nm lorsqu'il est photooxydé et est nommé P700 (Watanabe et coll., 1985).

1.1.3. Séparation de charges, transport d'électrons:  
L'énergie transférée des pigments antennes vers les centres réactionnels provoque l'élévation à l'état excité dénoté P680\* et P700\* pour les PSII et PSI respectivement. Quelques picosecondes après la transition électronique, un électron du centre réactionnel est capté par une molécule voisine du centre réactionnel que l'on désigne l'accepteur. Cet accepteur est une phéophytine (phéo) pour le PSII et une chlorophylle pour le PSI (Klimov 1977, Mansfield et coll., 1985).

1.1.3.1. Transport dans le photosystème II: Dans le

PSII, une fois que le centre réactionnel a perdu un électron il devient un oxydant puissant ( $P680^+$ ) capable d'extraire un électron du donneur primaire (Z) et recouvrer la configuration électronique fondamentale. Le donneur primaire oxydé ( $Z^+$ ) est réduit par le complexe de dégagement d'oxygène (CDO). Le mécanisme par lequel le CDO oxyde l'eau conséquemment à la séparation de charge dans le centre réactionnel sera discuté plus loin. Du côté réducteur du P680, l'électron est transféré rapidement à un accepteur intermédiaire, qui est une phéophytine. C'est l'accepteur primaire Qa qui oxyde la phéophytine réduite et envoie la charge négative à un bassin de plastoquinone. Le schéma en Z, tel que présenté en figure 6 montre à ce stade la possibilité que l'électron soit retourné au centre réactionnel via les cyt b559. Ce modèle semble être fidèle à la fonction réelle du cyt b559 dans le transport d'électrons dans le PSII (McCauley et coll., 1987). Le transport linéaire qui implique que la charge s'éloigne du centre réactionnel poursuit son cours via le bassin de plastoquinones membranaires. Ce bassin de plastoquinones localisé dans la membrane du thylacoïde passe de la forme quinone à hydroquinone (quinol) à mesure qu'il est réduit par Qa et sert de navette pour le transport des électrons du PSII vers le PSI (Govindjee et coll., 1985). Cette fonction est déterminante puisque les PQ assurent le contact "électrique" entre les PSII concentrés dans les granums et les PSI, qui eux sont localisés dans les thylacoïdes stromatiques (Staehelein 1986).

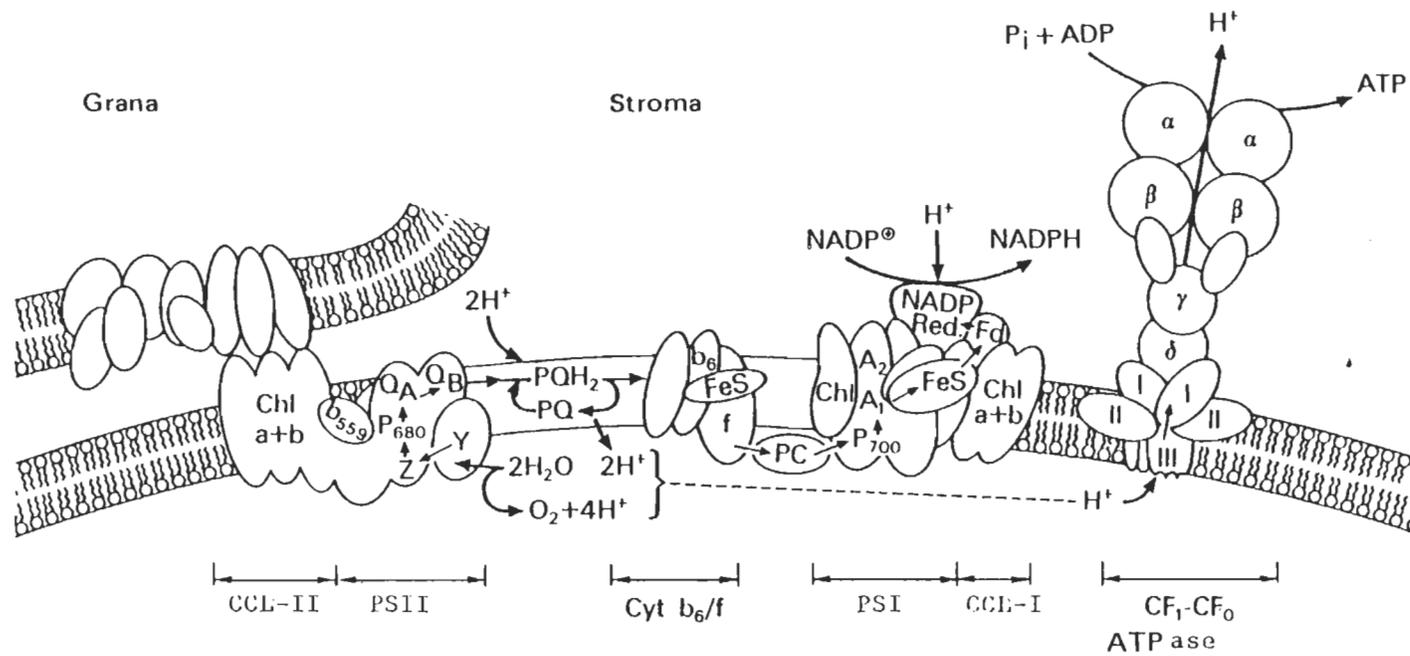


Figure 5. Représentation imagée de la structure des thylacoïdes et de leurs complexes protéiques.

1.1.3.2. Transport secondaire: Entre le bassin de plastoquinones et le PSI on retrouve un complexe intrinsèque formé d'un cytochrome f, un cytochrome b<sub>6</sub> (cyt 563) et une protéine Fe-S. Ce complexe aussi appelé centre Rieske possède un site le lien pour la plastoquinone, situé probablement sur la protéine Fe-S. Pendant l'oxydation de la plastoquinone par ce complexe, deux protons sont largués à l'intérieur du thylacoïde (Trebst 1978). Ceci contribuant au gradient de protons soutenu par l'oxydation de l'eau par le PSII. Le transport de l'électron se poursuit du centre Rieske vers la plastocyanine, une protéine contenant du cuivre qui sert de donneur pour le PSI (voir la figure 4).

1.1.3.3. Transport dans le photosystème I: Dans le PSI, le centre réactionnel P700 réduit l'accepteur A<sub>1</sub>, une chlorophylle-a, pour ensuite réduire l'accepteur primaire A<sub>2</sub>, une vitamine K<sub>1</sub>. L'électron est ensuite accepté par les complexes fer-soufre liés à la membrane notés Fe-S A et Fe-S B sur les figures 5 et 6 (Heathcote et coll., 1978). Le prochain accepteur est la ferredoxine (Fd) située à la surface externe du thylacoïde (Fig. 5). Finalement, l'enzyme NADP reductase catalyse la réduction du NADP par la ferredoxine, ce qui termine le transport linéaire d'électrons dans le thylacoïde (Hooper 1984) tel que résumé en figure 6.

1.1.4. Photophosphorylation: Le flux d'électrons au niveau de la membrane du thylacoïde donne lieu à la synthèse de l'ATP. L'enzyme responsable de la synthèse de l'ATP est l'ATPase (appelé aussi facteur de couplage), complexe lié à la

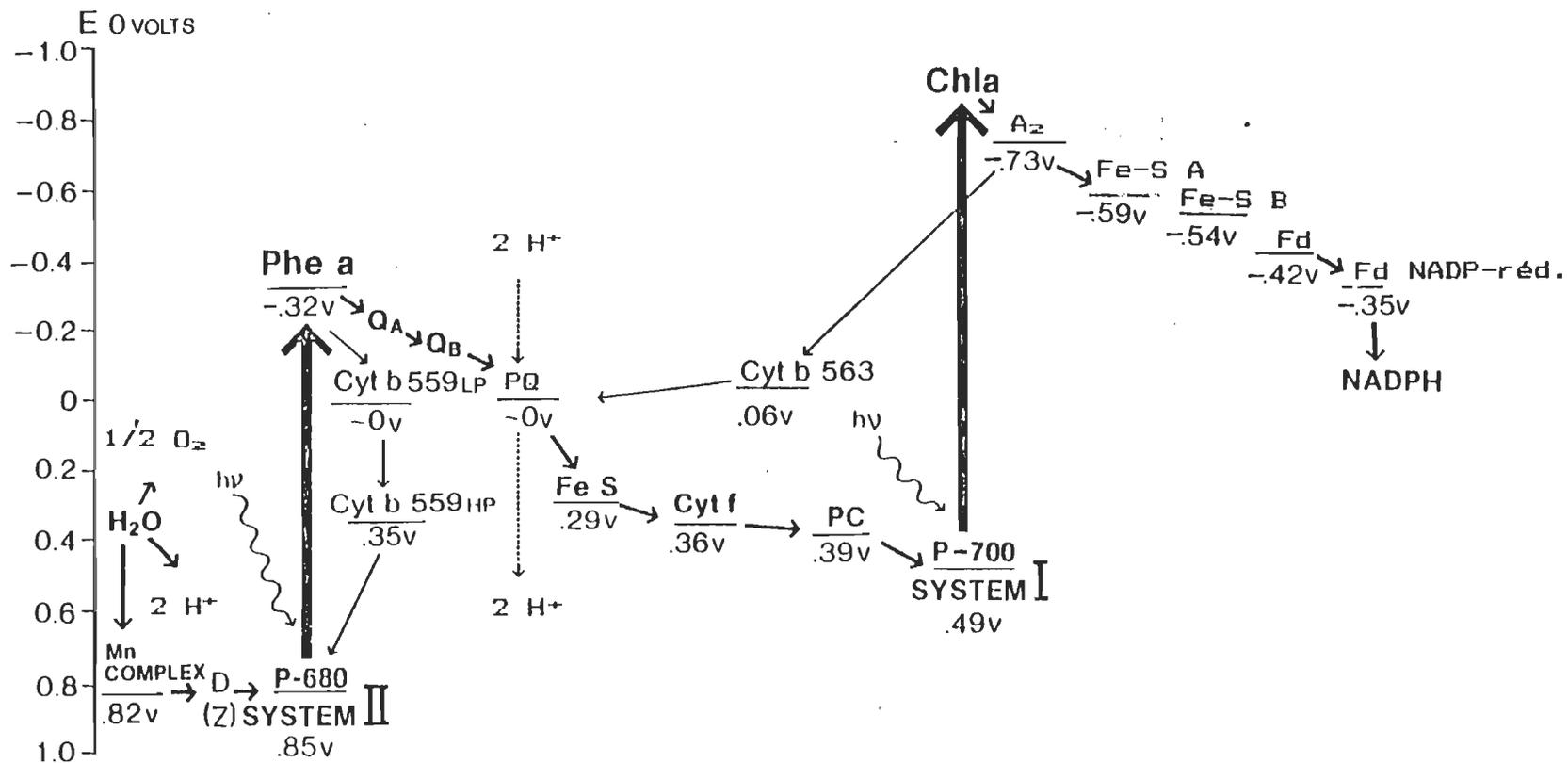


Figure 6. Schéma en Z indiquant les potentiels d'oxido-réduction au point milieu pour les composantes du transport d'électrons du thylacoïde.

membrane du thylacoïde (Nelson 1988, Theg et coll., 1988). L'ATPase est composée de deux sections dont l'une est hydrophile (facteur de couplage 1:  $CF_1$ ) et est liée à la surface externe du thylacoïde. L'autre partie ( $CF_0$ ) est hydrophobe et traverse la membrane du thylacoïde pour former le lieu d'ancrage de la section hydrophile (voir Fig.5). Le segment responsable de la synthèse de l'ATP est le segment externe ( $CF_1$ ). Plus précisément, les sous-unités bêta comportent les sites enzymatiques (Nelson, 1988). L'autre section ( $CF_0$ ) forme un canal laissant passer les protons à travers la membrane photosynthétique. Il semble que le gradient de proton généré par l'oxydation de l'eau et l'oxydation des plastoquinones par le centre Rieske est la source d'énergie chimique utilisée pour la synthèse de l'ATP (Mitchell 1961, Theg et coll., 1988). La translocation des protons à travers l'ATPase produirait un changement conformationnel dans cette enzyme qui activerait la phosphorylation de l'ADP en ATP. Cependant, on en sait très peu quant au mécanisme enzymatique impliqué (Nelson 1988). Notons qu'à part sa fonction, la synthèse de l'ATP sert aussi à neutraliser le gradient de protons généré par le transport d'électrons (Fig 5).

1.1.4. Assimilation du  $CO_2$ : L'énergie accumulée dans la synthèse de l'ATP (énergie qui provient du déplacement de l'équilibre ATP/ADP) ainsi que le pouvoir réducteur du NADPH (accepteur terminal réduit de la chaîne de transport

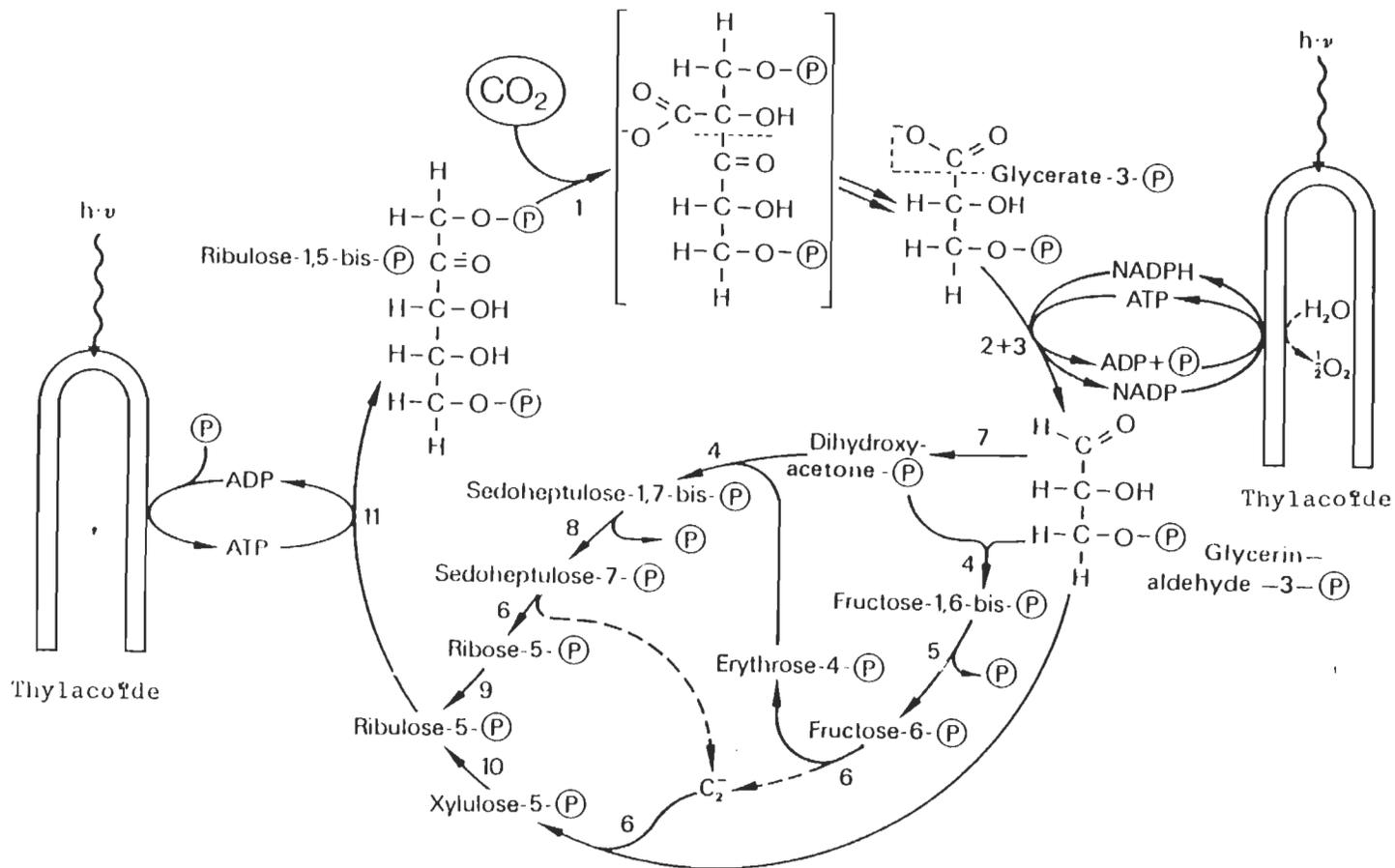
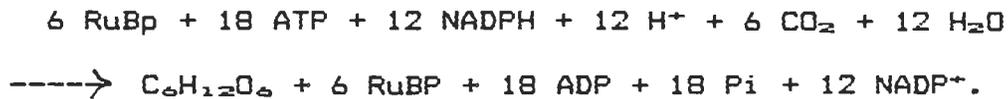


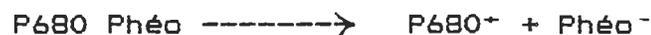
Figure 7. Cycle de Calvin. Les numéros indiquent une enzyme: 1, ribulose diphosphate carboxylase; 2, phosphoglycérate kinase; 3, glycérinaldéhyde phosphate déshydrogénase, 4, aldolase; 5 et 8, phosphatases; 7, triosephosphate isomérise; 9 et 10, pentosephosphate isomérases; 11, ribulosephosphate kinase.

d'électrons) sont utilisés et emmagasinés par les réactions de la phase obscure de la photosynthèse: le cycle de Calvin. L'énergie de ces métabolites (ATP et NADPH) est exploitée pour la formation de sucres à partir du CO<sub>2</sub> par ce cycle au niveau du compartiment stromatique (Arnon 1987). Le cycle de Calvin est représenté en Fig. 7. La première enzyme (numérotée 1 en figure 7) du cycle est la ribulose diphosphate (RuBP) carboxylase qui lie le CO<sub>2</sub>. Cet enzyme est le facteur de contrôle principal du cycle de Calvin. Chaque molécule de CO<sub>2</sub> utilisée pour la synthèse du glucose demande la participation de 2 NADPH et 3 ATP. La réaction globale pour la synthèse d'une molécule de glucose est la suivante:



## 1.2. Vision détaillée du photosystème II:

1.2.1. Fonctions du photosystème II: La première réaction photochimique ayant lieu dans le PSII est le transfert d'un électron du centre réactionnel excité (P680\*) à l'accepteur phéophytine (Phéo). Cette séparation de charge peut s'écrire tel que:



Le transfert de l'électron de l'état excité P680\* à la Phéo s'effectue en moins de 1 ps (Butler et coll., 1983). La seconde étape consiste au transfert de l'électron à l'accepteur Qa, qui résulte en une stabilisation temporaire de

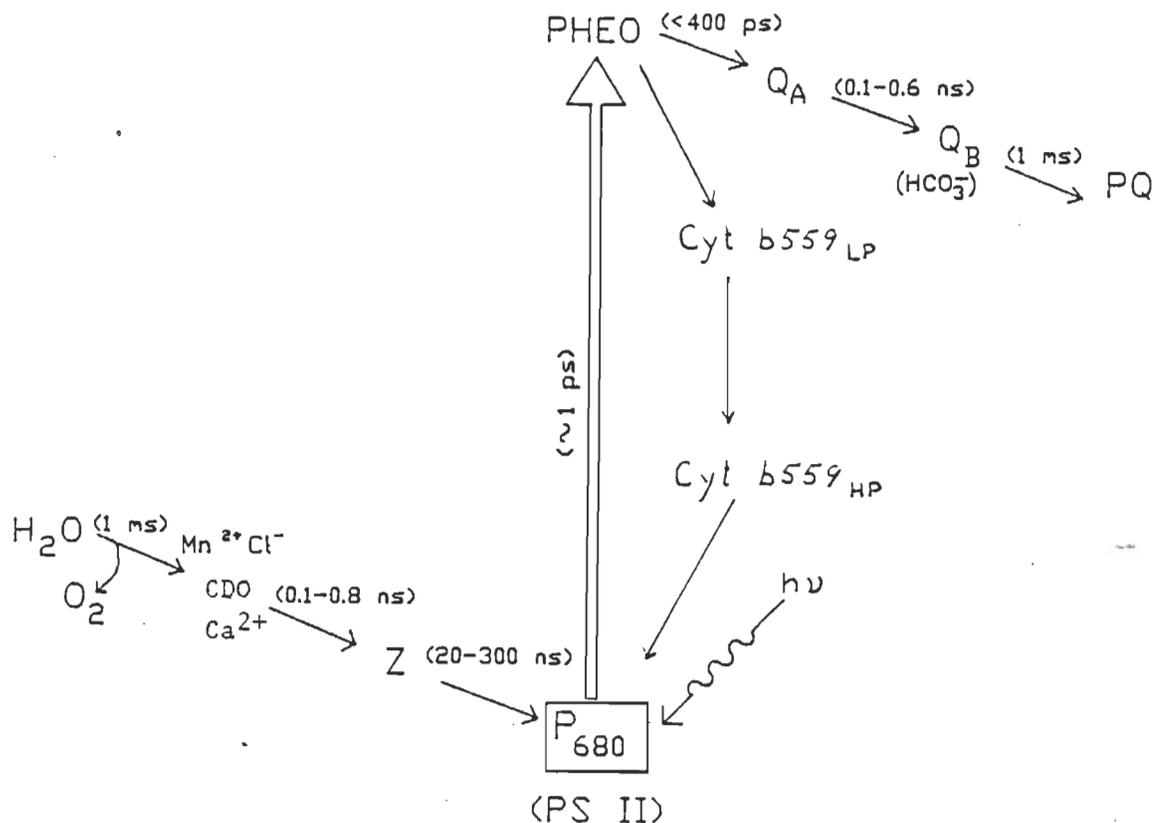
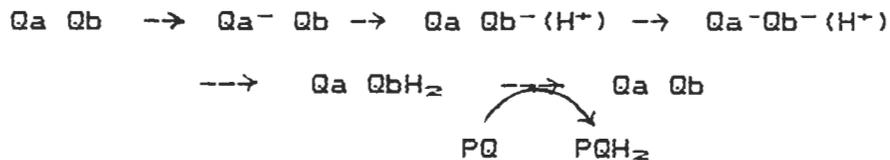


Figure 8. Transport d'électrons dans le PSII.

la charge (Eckert et coll., 1980). Un schéma en Z montrant les différents temps requis pour le transfert de l'électron dans le PSII compose la figure 8. L'accepteur primaire Qa est une molécule de plastoquinone associée à un atome de fer et ancrée à la structure protéique du PSII (Govindjee et coll., 1985). Sur réception de l'électron (1 ns), Qa passe à la forme anionique semiquinone non-protonée (Sato 1985). Subséquemment, Qa est réoxydé par l'accepteur secondaire Qb, qui accepte deux électrons pour former Qb<sup>2-</sup> (Velthuis 1980). L'anion bicarbonate favorise le transfert d'électrons entre Qa et Qb (Govindjee et Eaton-Rye 1986). L'accepteur

$Qb^{2-}$  est neutralisé en acceptant 2 protons de la phase stromatique et devient une plastoquinone (quinol). A ce stade, la plastoquinone est échangée pour une plastoquinone membranaire et le cycle recommence. La réaction est schématisée par l'équation suivante:



Du côté donneur du PSII, le centre réactionnel oxydé est réduit par Z (Barry et coll., 1987). La nature chimique de ce donneur n'est pas établie mais il semble que Z soit un résidu thyrosine (Barry et coll., 1987). Le transfert d'électrons entre Z et P680 est dépendant de l'état d'oxydation du CDO, tel état étant dénoté par  $S_n$ , où  $n=0, 1, 2, 3, 4$  (Brettel et coll., 1984). Après un éclair lumineux, le transfert d'électrons entre Z et P680 se produit en 50 ns (Govindjee et coll., 1985). Le transfert d'électrons entre le CDO et Z se produit en 50 ns à 800 ns dépendamment de l'état 'S' atteint par le CDO (Govindjee et coll., 1985). Une description détaillée du fonctionnement du CDO et des propriétés des états 'S' sera donnée plus loin dans cette même section. Finalement, le dégagement de l'oxygène ne se produit que lorsque 4 électrons ont été tirés du CDO et ne se produit que dans 1 ms après l'oxydation au niveau  $S_4$  (Junge et Jackson 1982). La figure 8 schématise et résume le transport d'électron dans le PSII.

### 1.2.2. Composition et structure du photosystème II: La

composition du PSII (sans les CCL-II) en molécules actives est donnée dans le tableau I. On y retrouve les 50 chlorophylles de l'antenne intime du complexe central ayant fonction de capter la lumière et l'énergie excitonique et évidemment de ce nombre deux chlorophylles forment la paire spéciale P680. Il y aurait aussi 2 molécules de phéophytine, dont au moins une à pour rôle d'accepter l'électron de P680 (Klimov 1977, Ghanotakis et Yocum 1985). Quelques caroténoïdes se retrouvent aussi et leur fonction dans le PSII pourrait être de protéger les chlorophylles contre la photooxydation, ceci s'ajoutant à leur rôle d'antennes accessoires (Anderson et Robertson 1960, Plumley et Schmidt 1987). Les trois molécules de plastoquinone dénombrées par complexe ont les fonctions suivantes: l'accepteur primaire Qa, l'accepteur secondaire Qb et finalement un donneur hypothétique entre le CDO et le P680 nommé D, tel qu'indiqué en figure 8 (Ghanotakis et Yocum 1985; Govindjee et coll., 1985). La structure du centre réactionnel du PSII a reçu beaucoup d'attention récemment à cause de l'avancement énorme réalisé dans l'élucidation de la structure du centre réactionnel de la bactérie pourpre Rhodospseudomonas viridis par Deisenhofer et coll. (1985). L'organisation des pigments dans ce centre réactionnel est montrée en figure 9. La similarité des deux polypeptides portant ces pigments nommés L et M avec deux autres protéines du PSII de masse 32 et 34 kD porte à croire que ces protéines proviennent d'un ancêtre commun (Michel et Deisenhofer 1988).

TABLEAU 1

Les composantes du PSII (adapté de Ghanotakis et Yocum, 1985).

Composantes	Nombre par PSII
Chlorophylle-a	50
Phéophytine-a	2
Caroténoïde	10
Plastoquinone-9	2-3
Cytochrome b559	1-2

La compilation de données spectroscopiques présentée par Diner (1986) permet d'arriver à la conclusion que les composantes P680, Phéo, et Qa avaient la même position dans la membrane que celle montrée pour les composantes similaires dans le centre réactionnel bactérien. Après la réussite récente de Nanba et Satoh (1987) à extraire un complexe formé des polypeptides de 32 et 34 kD et du polypeptide des cyt b559 capable d'activité photochimique, il devint acceptable de considérer la structure présentée en figure 9 comme modèle pour le centre réactionnel du PSII (RCII) (Michel et Deisenhofer 1988).

L'analyse par gel d'électrophorèse de membranes enrichies en PSII (MEPSII) montre la présence d'une dizaine de polypeptides prédominants (Fig.10A). L'identité des bandes

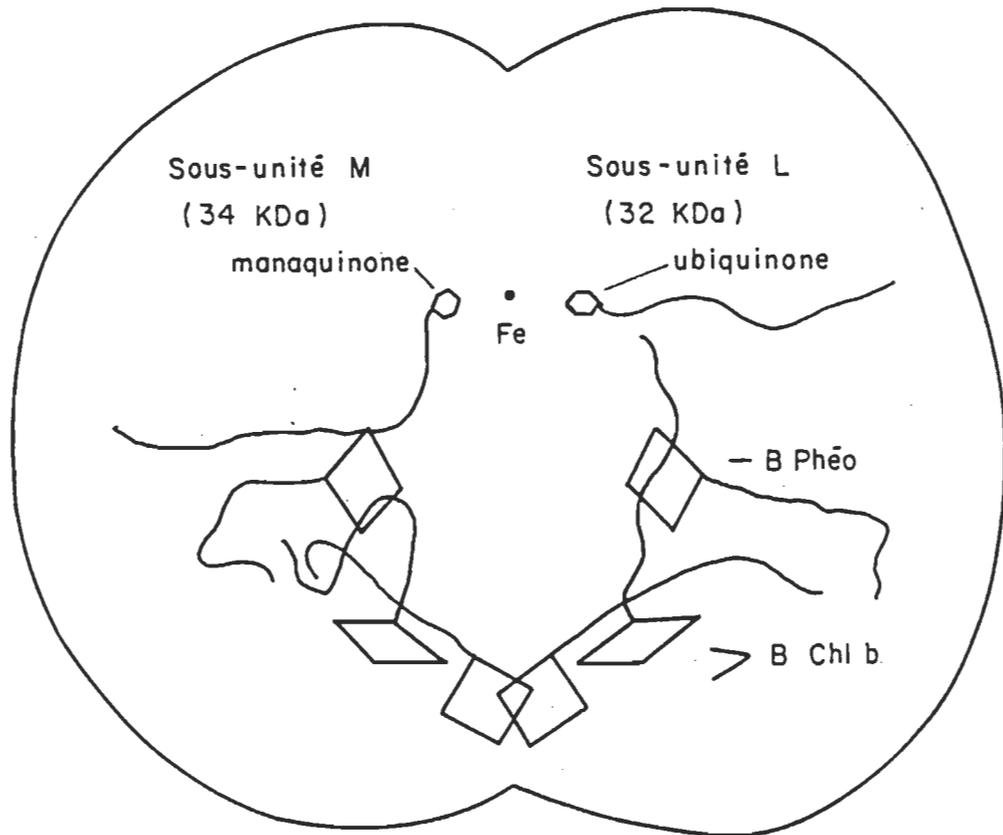


Figure 9. Centre réactionnel de *Rhodospseudomonas viridis* (d'après Deisenhofer et coll. 1985).

de protéines séparées en figure 10 a été établie expérimentalement par l'auteur ou encore a été attribuée en accord avec les hypothèses courantes (Govindjee et coll., 1985, Arntzen et Pakrasi 1986, Cramer et coll., 1986; Beauregard et coll., 1987; Beauregard et Popovic 1988). L'arrangement spatial des protéines du PSII est schématisé en figure 10B, d'après une communication très récente de J. Anderson (1988). De chaque côté du complexe se trouvent les protéines du CCL II, qui sur le gel en figure 10A représente la bande la plus intense de masse 29 kD. A gauche du centre réactionnel formé

des polypeptides de 32 et 34 kD se trouve un hétérodimère de 9 kD et 4.5 kD liant les cyt-b559 (Cramer et coll. 1986). Tel qu'énoncé dans la section précédente, les cyt-b559 sont impliqués dans le transport cyclique autour du PSII et il semble que cette fonction soit déterminante pour l'activité du PSII (Pakrasi et coll., 1988). Puis, à l'arrière du centre réactionnel se trouve les protéines formant l'antenne intime (Green 1988) composée des sous-unités CP-47, CP-43 et CP-29 (CP=chlorophyll-protein). Les deux dernières sous-unités du PSII qui sont intrinsèques à la membrane comme les précédentes sont les polypeptides de 22 et 24 kD. Leur rôle est peu connu (Andersson, 1986). Les polypeptides se trouvant au bas du PSII, à la surface interne du thylakoïde sont les sous-unités affectées à l'oxydation de l'eau ou du moins à la régulation de cette activité.

1.2.3. Le complexe de dégagement d'oxygène: Le CDO du PSII est localisé à la surface interne du thylacoïde (Akerlund 1983; Seibert et coll., 1987). Il y aurait 6 polypeptides impliqués dans le mécanisme d'oxydation de l'eau par le CDO. De ceux-ci, 4 sont directement associés aux sites actifs du CDO (Govindjee et coll., 1985). Leur masse apparente déterminée par électrophorèse est environ de 18, 24, 33 et 34 kDa. Les deux autres polypeptides sont identifiés CP-47 et Cyt b559 sur la figure 10B. Leurs-fonctions peut se résumer comme suit (Govindjee et coll., 1985, Andersson 1986): 18 kD: protéine extrinsèque à la membrane, ayant un rôle dans la régulation du chlorure requis pour l'oxydation de l'eau; 24 kD: protéine

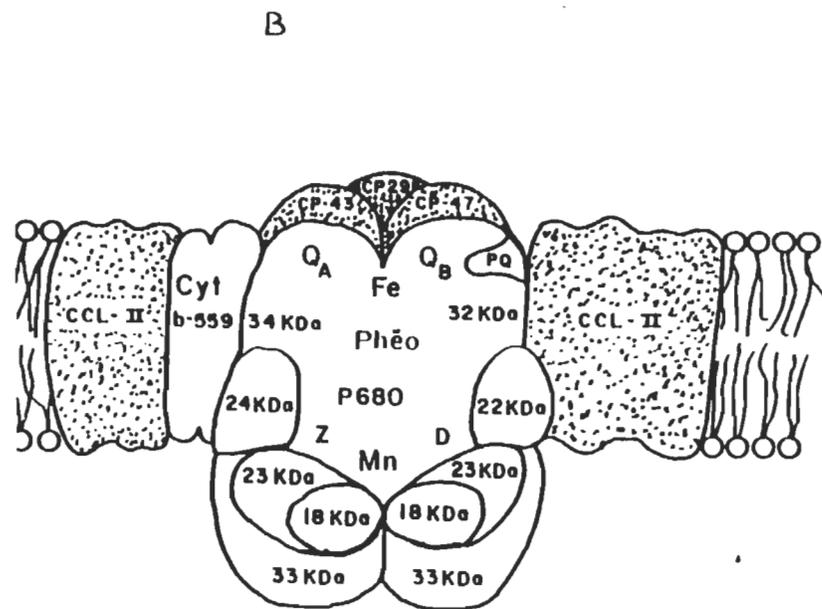
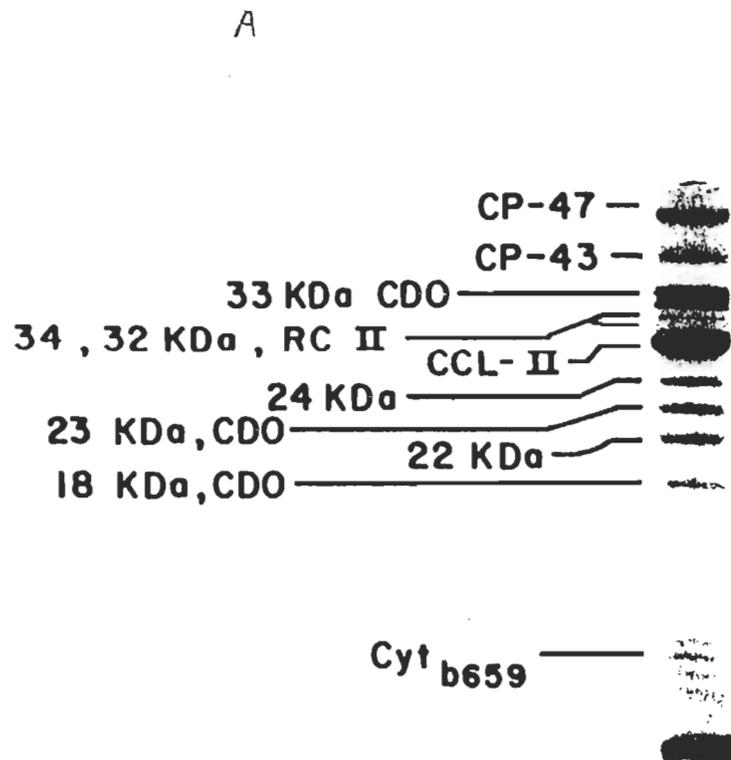


Figure 10. Polypeptides du PSII. A) Séparation des protéines du PSII par électrophorèse; B) Modèle de structure du complexe PSII.

UNIVERSITE DU QUEBEC

THESE PRESENTEE A  
L'UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE POUR L'OBTENTION  
DU DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE

PAR  
MARC BEAUREGARD

BACCALAUREAT ES SCIENCES (CHIMIE, UQTR)

MODULATION DE L'ACTIVITE ET DE LA STRUCTURE DU  
PHOTOSYSTEME II PAR LES IONS SULFITE ET SULFATE.

SEPTEMBRE 1968

extrinsèque, rôle dans la ligation du calcium et pour la régulation du chlorure requis pendant l'oxydation de l'eau; 33 kD: protéine extrinsèque ayant un rôle dans le maintien des atomes de manganèse dans le PSII (Seibert et coll., 1987); 34 kD: protéine intrinsèque liée aux atomes de manganèse chargés de coordonner l'eau pendant l'oxydation ; CP-47: chlorophylle-protéine intrinsèque ayant un rôle dans l'ancrage de 33 kD à la membrane (Bricker et coll., 1988); Cyt b559: hétérodimère de 9 et 4.5 kD, portant 2 cytochromes, impliqué dans le procédé de photoactivation du CDO (Cramer et coll., 1986).

Les atomes de manganèse confinés dans la protéine de 34 kD sont essentiels à l'oxydation de l'eau (Cheniae 1980; Cammarata 1984). Il a été démontré que dans une variété d'organismes photosynthétiques, quatre atomes de manganèse sont associés à un CDO (Cammarata 1984, Kuwabara et Murata 1983a). Ces quatre atomes coordonnés dans un complexe sont les accumulateurs de charge qui permettent l'oxydation par étapes de l'eau (Wydryzynski 1982). Le complexe formé des manganèses serait localisé dans le polypeptide de 34 kD (Fig 10B) et les molécules d'eau seraient liées dans une dépression de 4 Å de large par 2.5 Å de profondeur (Radmer et Ollinger 1983). Les interactions entre les molécules d'eau et le complexe de manganèse sont inconnues à ce jour. Les ions chlorures sont aussi connus pour leur rôle essentiel dans le fonctionnement du CDO (Kelley et Izawa 1978). Il y aurait 40 ions chlorures pour chaque PSII (Izawa et coll., 1983).

Les ions chlorures peuvent être remplacés par les ions bromures, nitrates, ou iodures dans un ordre décroissant d'efficacité pour l'activité du CDO (Critchley 1982). Bien que les sites du chlore n'ont pas été déterminés avec précision, il est évident que ces sites démontrent une sensibilité à la présence des polypeptides de 33 kD, 24 kD et 18 kD (Homann 1987b, Govindjee et coll., 1985). Plusieurs arguments indiquent que les chlorures sont liés au CDO: le chlore interfère avec l'inhibition du CDO par l'hydroxylamine, démontrant la proximité des ions chlorures et des atomes de manganèse (Kelley et Izawa 1978); les ions fluorures, hydroxyles (Kelley et Izawa 1978) et les amines (Sandusky et Yocum 1984) compétitionnent avec les chlorures pour leurs sites et inhibent le dégagement d'oxygène, ceci se produisant à des sites localisés avant le P680 tel que montré à l'aide des donneurs artificiels (Kelly et Izawa 1978); la ligation du chlore protège le CDO contre le stress thermique et retarde l'inhibition irréversible du dégagement d'oxygène (Coleman et coll., 1984). Un modèle pour le mode d'action des chlorures dans le CDO a été présenté récemment (Coleman et Govindjee 1987). Deux populations de chlorures ayant des fonctions différentes et des sites de liens différents seraient impliquées dans le CDO. Un premier type de site serait au niveau de la surface interne du thylacoïde, précisément sur des acides aminés protonés de la protéine de 34 kD. Les chlorures auraient pour mission de faciliter l'expulsion des protons dérivés de l'oxydation de l'eau en

stabilisant les charges supplémentaires sur des groupements tyrosines dues à la présence des protons. Les autres chlorures seraient liés sur la protéine extrinsèque et auraient un rôle similaire, faciliter la sortie des protons vers la solution interne du thylacoïde (Coleman et Govindjee 1987).

Le rôle du calcium est peu connu bien que les études démontrent sa nécessité (Ghanotakis et coll., 1985). Le calcium peut restaurer le dégagement d'oxygène après l'enlèvement du polypeptide de 24 kD et d'ailleurs, les traitements qui enlèvent la protéine de 24 kD provoquent une forte diminution du contenu en calcium du PSII (Miyao et Murata 1984). Notons aussi que le calcium est requis pour le processus de photoactivation du CDO (Ono et coll., 1986).

Les protéines du CDO, avec les co-facteurs manganèse, chlorure et calcium ont pour tâche de permettre l'oxydation de l'eau, tel que décrit par l'équation suivante:



Cette réaction qui demande environ 1.3 eV pour se produire est réalisée en quatre étapes pendant lesquelles le PSII fournit en moyenne 0.81 eV pour chacune des quatre étapes (Govindjee et coll., 1985). Le modèle à quatre étapes appelées états 'S' suppose en effet l'accumulation de quatre équivalents oxydants dans le CDO (CDO<sup>-</sup>-CDO<sup>4+</sup>) créés par l'activité photochimique du centre réactionnel. Le phénomène sur lequel repose ce modèle à quatre étapes est l'oscillation de période quatre dans le dégagement d'oxygène provoquée par des éclairs

courts, tel que le présente la figure 11 (Joliot et Kok 1975). Chaque éclair provoque l'oxydation du CDO par le PSII qui lui retire un électron. La quantité d'oxygène dégagée oscille avec une périodicité de quatre, ce qui suggère un cycle dans lequel des intermédiaires chimiques (de l'oxydation de l'eau) seraient successivement dans les états d'oxydation de  $S_0$  à  $S_4$  tel que montré à la figure 12. Le numéro accompagnant le sigle S indique le nombre d'équivalents oxydants emmagasinés dans le CDO à cette étape. Chaque état S est donc différent de une charge. Quand le cycle atteint l'état  $S_3$ , il a emmagasiné quatre équivalents oxydants et alors une molécule de dioxygène est dégagée pendant la relaxation de l'état  $S_4$  à  $S_0$ . L'oxydation de l'eau implique aussi le largage des protons par le CDO. Le patron de largage des protons serait de 1,0,1,2 tel que représenté sur la figure 12 (Witt et coll., 1987). Le fonctionnement de ce complexe implique un environnement protéique et ionique déterminé, apporté par les ions calcium, chlorure et les protéines extrinsèques du CDO.

Dans les chloroplastes adaptés en obscurité, les états S existant sont les états  $S_0$  et  $S_1$ . Les états supérieurs  $S_2$  et  $S_3$  se désactivent en moins d'une minute (Joliot et Kok 1975). Donc, l'adaptation au noir synchronise les CDO de façon à laisser les états  $S_0$  et  $S_1$  seulement. La distribution initiale la plus probable de ces états seraient de 25%  $S_0$  et 75%  $S_1$  (Velthuys et Kok 1978). Sous éclair successifs, la périodicité de quatre disparaît progressivement

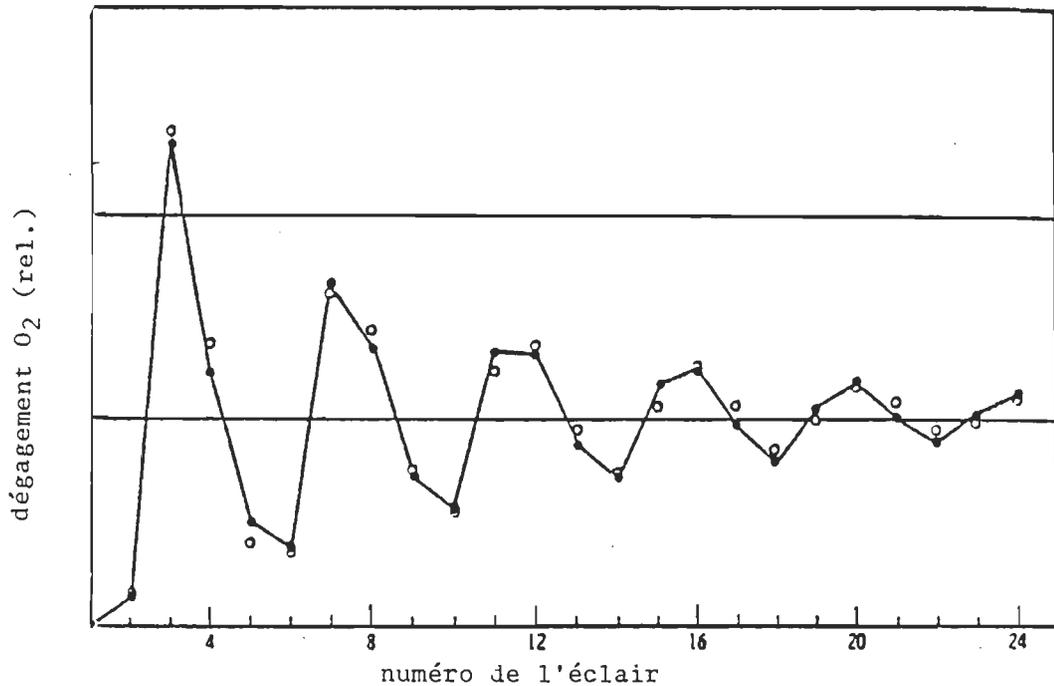


Figure 11. Intensité du dégagement d'oxygène induit par éclairs.

et finit par laisser lieu à un dégagement d'oxygène constant pour tous les éclairs (Fig 11). La périodicité de quatre est présentement expliquée par le modèle des états S mais la l'amortissement de l'oscillation observée après quelques éclairs fait l'objet de discussions (Delrieu 1983).

Cependant, une explication de ce phénomène proposée par Forbush et coll. (1971) consiste à attribuer la perte de périodicité à une perte de synchronisme dans la population des PSII. Certains PSII seraient incapables de provoquer l'avancement à un état S supérieur, ce qui donne lieu à des ratés dans le cycle (misses). L'opposé se

CYCLE DES ETATS " S " DU DEGAGEMENT D'OXYGENE

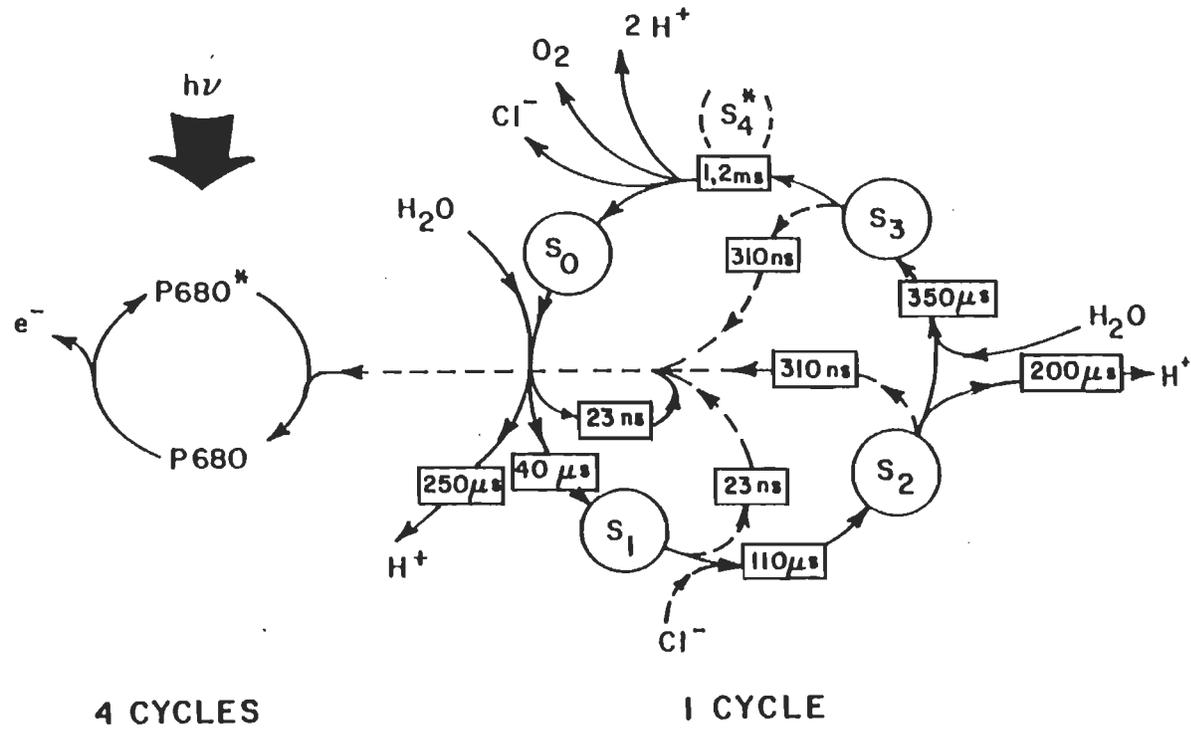


Figure 12. Cycle des états S du dégagement d'oxygène.

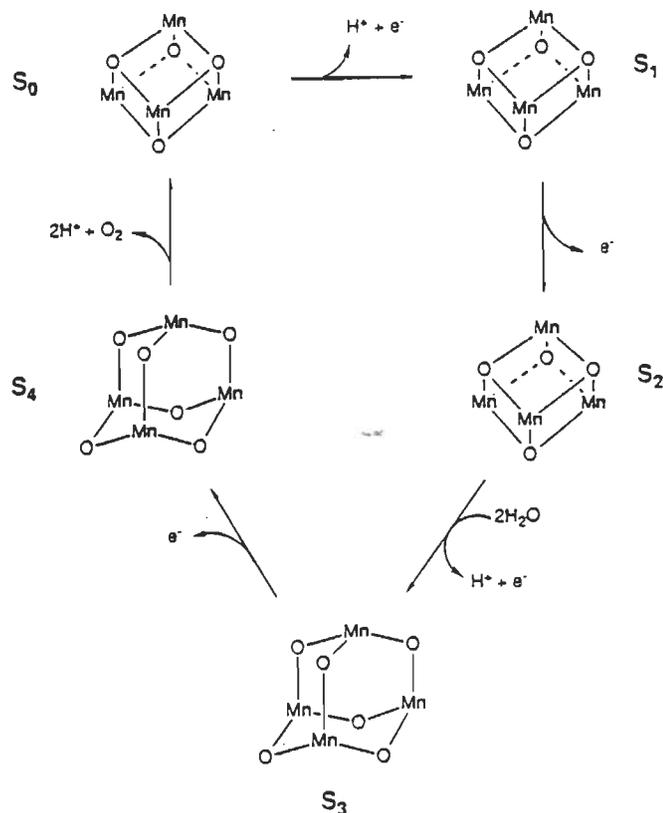


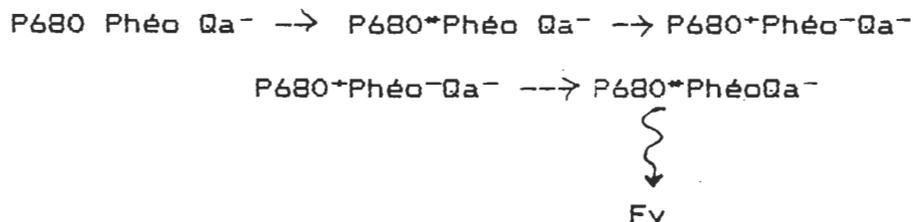
Figure 13. Modèle de coordination des atomes de manganèse par les atomes d'oxygène pendant l'oxydation de l'eau. Les protons ne sont pas insérés dans le modèle.

produirait aussi, c'est-à-dire une double transition (double-hit) dans un même PSII. Donc, les ratés retardent certains cycles, tandis que les doubles transitions avancent les cycles de certains PSII. Les deux phénomènes contribuent donc à la perte de synchronisme entre les CDO et provoque la perte de l'oscillation observée au début de l'illumination par éclairs. Le mécanisme réactionnel de l'oxydation de l'eau n'est

pas élucidé mais quelques modèles ont été mis sur pied pour expliquer les faits expérimentaux. La figure 13 décrit un de ces modèles par lequel les atomes de manganèse catalysent l'oxydation de l'eau (Brudvig 1987).

#### 1.2.4. Fluorescence variable du photosystème II:

L'énergie acheminée au PSII est utilisée efficacement pour autant que les électrons soient en mesure de quitter le PSII et lui permettent de recommencer le cycle. Cependant, la capacité de transport d'électrons secondaire n'est pas toujours suffisante pour maintenir les PSII dans un état "ouvert". On appelle ouvert un PSII qui a son accepteur à l'état oxydé, par opposition à un centre fermé qui lui possède un Qa réduit. Quand l'accepteur Qa est réduit, alors la phéophytine ne peut être oxydée et ceci mène à une recombinaison de charge avec la paire spéciale P680:



La recombinaison de charge provoque l'émission de la luminescence de recombinaison qui est dépendante de l'état rédox de l'accepteur primaire Qa (Schatz et Holzwarth 1986; Van Gorkom 1986). Lorsqu'on illumine des chloroplastes adaptés au noir, la fluorescence émise par le PSII varie en intensité dans le temps dû aux changements de la capacité de

transport d'électrons qui contrôle l'état d'oxydo-réduction de Qa (Briantais et coll., 1986). La figure 14 montre ce phénomène appelé fluorescence "variable" lorsqu'elle est mesurée sur différentes échelles de temps. Le niveau 0 est la fluorescence constante, émise par les chlorophylles antennes pendant le transfert de l'exciton vers le centre réactionnel. Cette fluorescence est indépendante de la photochimie du PSII (Briantais et coll., 1986; Krause et Weiss, 1984). Les transients rapides ayant lieu en quelques secondes (I,D,P) sont reliés à la réduction de Qa dans le PSII et aussi à la réduction progressive des PQ de la membrane (Briantais et coll., 1986). Les transients plus lents (S,M) sont aussi liés à l'état rédox de Qa mais décrivent des oscillations dans la capacité du transport d'électrons secondaire, du PSI et de la demande en NADPH et en ATP du cycle de Calvin (Briantais et coll., 1986, Van Gorkom, 1986). On peut isoler le PSII de tous ces mécanismes qui influencent la fluorescence variable par l'addition d'agent empêchant l'oxydation de Qa par le transport d'électrons secondaire. La mesure de fluorescence variable en présence de DCMU, un agent de ce genre, permit à Melis et Homann (1975) de supposer l'existence de deux types de PSII. En effet, la montée de fluorescence dans ces conditions est biphasique. La dernière partie de la montée de fluorescence se produit avec une cinétique lente, qui est essentiellement exponentielle. La première partie rapide est plutôt sigmoïdale et représente la majeure fraction de la fluorescence totale émise. On peut voir en figure 15, partie

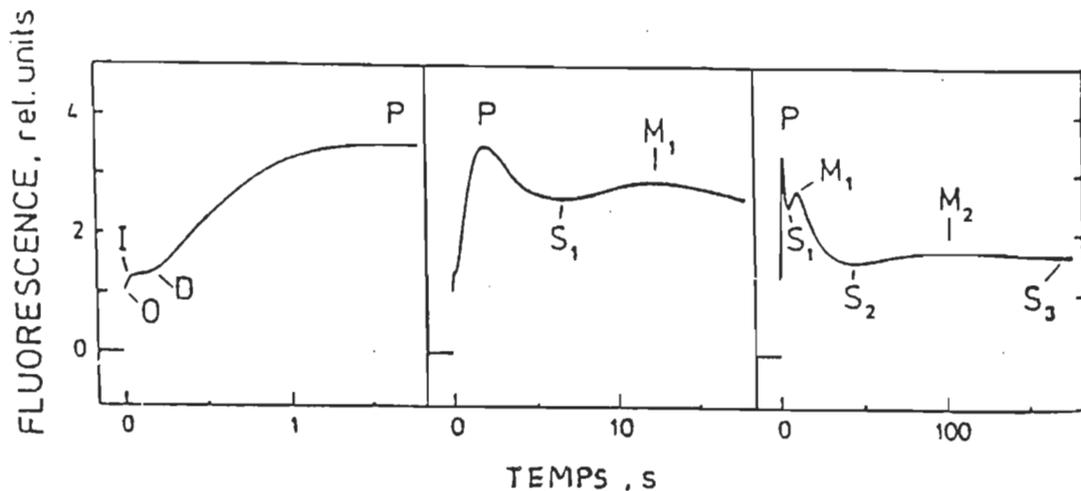


Figure 14. Fluorescence variable mesurée sur différentes échelles de temps avec l'inscription des transients caractéristiques.

supérieure, la fluorescence variable de chloroplastes mesurée en présence de DCMU. L'analyse logarithmique de la variation dans l'intensité de fluorescence émise montre clairement l'existence de deux phases (Fig 15, partie inférieure). La première phase rapide n'est pas exponentielle et est attribuée aux PSII de type a, tandis que la seconde phase lente exponentielle dénotant une cinétique d'ordre 1 serait due à la réduction des Qa dans les PSII de type b (Melis et Homann 1975). Les PSII<sub>a</sub> seraient localisés dans les granums et dans les thylacoïdes stromatiques pour les PSII<sub>b</sub> (Anderson et Melis 1983). Les deux formes de PSII n'auraient pas non plus le même degré d'association avec le complexe CCL-II extrinsèque (Melis et Duysens 1979; Percival et coll., 1984). De plus, le

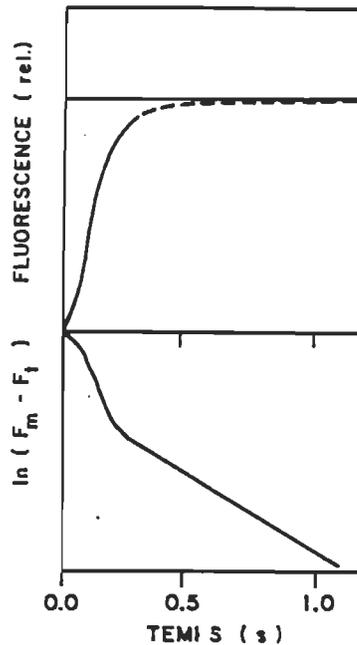


Figure 15. Partie supérieure: induction de fluorescence en présence de DCMU. Partie inférieure: Analyse logarithmique de la différence entre le niveau  $F_m$  et la fluorescence au temps  $t$ .

potentiel d'oxydo-réduction de l'accepteur primaire du PSII<sub>b</sub> semble plus élevé que pour le PSII<sub>a</sub> et on a rapporté que la sensibilité au DCMU était différente d'un type de PSII à l'autre (Thielen et Van Gorkom 1981; Hodges et Barber, 1986). Récemment, il fut démontré que les centres b n'étaient pas impliqués dans la réduction du bassin de plastoquinone et donc dans le transport d'électrons secondaire (Graan et Ort, 1986). Notons ici qu'à moins d'indication contraire (section 3.2.5), le type de PSII visé dans ce travail est le PSII<sub>a</sub>. Ce dernier est définitivement plus important pour le transport d'électrons que le PSII<sub>b</sub> (Melis 1985).

### 1.3. But du travail:

1.3.1. Pollution par le SO<sub>2</sub> versus la photosynthèse: La combustion des carburants fossiles tels le charbon et le pétrole a entraîné l'émission de grandes quantités de SO<sub>2</sub> dans l'atmosphère. Le SO<sub>2</sub> ainsi émis est absorbé principalement par les plantes et les sols. Une partie du SO<sub>2</sub> est oxydée dans l'atmosphère pour mener à la formation d'acide sulfurique qui retombe sous forme de pluie acide (Lendzian et Unsworth, 1983). Les précipitations acides sont en fait la source majeure de soufre déposé découlant du SO<sub>2</sub> atmosphérique (Jacobson et coll., 1987). Elles entraînent une augmentation du sulfate déposé sur les feuilles et de la teneur en sulfate des sols (Lendzian et Unsworth, 1983; Nevell et Wainwright 1987) . Cet apport en excès de sulfate ralentit la croissance des plantes (Rennenberg 1984; Nevell et Wainwright, 1987). Le sulfate absorbé par les racines est transporté par des protéines porteuses et se retrouve subséquemment dans le cytosol des cellules des feuilles (Rennenberg 1984). Etant donné que les cellules de racines ne semblent pas en mesure de contrôler l'entrée de sulfate dans la plante, les cellules des feuilles peuvent être exposées à l'accumulation de sulfate. Ce raisonnement est d'ailleurs appuyé par des rapports de Brunold et coll. (1983) et Kylin (1960) démontrant une accumulation de sulfate dans les tissus végétaux de plantes recevant un régime de nutrition élevé en sulfate (Kylin 1960; Brunold et coll., 1983).

D'autre part, le SO<sub>2</sub> atmosphérique est absorbé

directement par les feuilles en entrant par les stomates et se dissolvant à la surface humide des cellules du tissu foliaire. Le  $\text{SO}_2$  est alors hydraté pour former l'ion bisulfite et l'ion sulfite dans un ratio dépendant du pH environnant. Le sulfite est un réducteur puissant qui sera éventuellement oxydé en sulfate (Nieboer et coll., 1976; Garsed 1981). L'absorption de  $\text{SO}_2$  se traduit donc par l'entrée des ions sulfite, bisulfite et sulfate dans la feuille (Chung 1982). Cependant, l'ion bisulfite est en faible concentration dans le cytosol étant donné les conditions de pH présentes et l'on observe généralement l'accumulation des ions sulfite et sulfate dans le cytosol foliaire après absorption de  $\text{SO}_2$  (Garsed 1981; Chung 1982; Brunold et coll., 1983; Wellburn, 1985). La concentration de ces ions peut augmenter de façon vertigineuse lorsque l'exposition au  $\text{SO}_2$  est chronique. Des expériences par Marques et Anderson (1986) ont démontré que le sulfate s'accumule continuellement et est difficilement assimilé, même après l'arrêt du traitement au  $\text{SO}_2$  (Brunold et coll., 1983). A ce niveau, il semble acquis ( pour l' "Environmental protection agency of USA" ) que l'accumulation de sulfate dans le cytosol est responsable des dommages chroniques dus au  $\text{SO}_2$  (Rennenberg 1984; Environmental Protection Agency 1976).

Donc, pour se résumer, l'absorption du  $\text{SO}_2$  atmosphérique ou sous forme de pluie acide provoque une entrée excessive des ions sulfate et sulfite dans le cytosol foliaire qui semblent être responsables de la baisse de croissance observée pour les

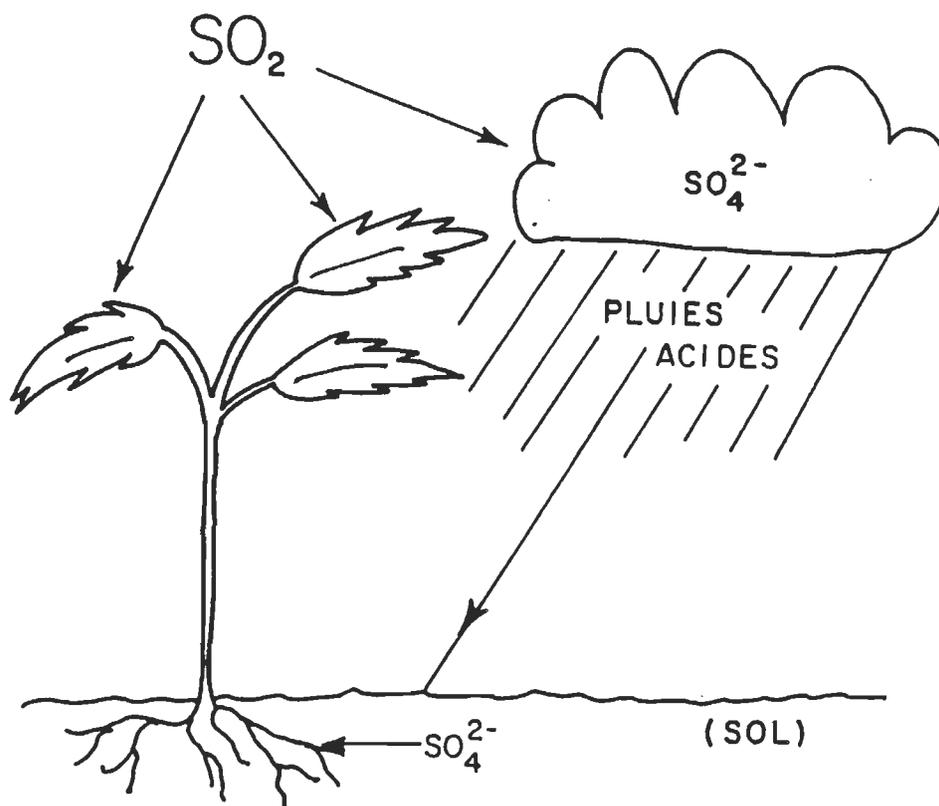


Figure 16. Absorption du  $SO_2$  et du sulfate par les plantes.

plantes exposées à la pollution au  $SO_2$ .

Plusieurs processus cellulaires et différentes organelles peuvent être touchés par le  $SO_2$  (Brunold et coll., 1983; Katase et coll., 1983; Malhotra et Khan, 1983), mais l'inhibition de la photosynthèse du chloroplaste semble être une cause majeure de la baisse de croissance des plantes (Silvius et coll., 1975; Shimazaki et Sugahara, 1980; Katase et coll., 1983). Shimazaki et coll. (1984a,b) et Chung (1983) ont montré que le transport d'électrons de la membrane du chloroplaste était inhibé par le  $SO_2$ . Des expériences de

fumigation au  $\text{SO}_2$  ont permis de localiser le site d'inhibition dans la membrane au niveau du PSII (Shimazaki et Sugahara, 1980; Brunold et coll., 1983; Shimazaki et coll., 1984a). L'impact du chlore sur cette inhibition montré par Miszalski (1983) ainsi qu'une étude de fluorescence variable rapportée par Shimazaki et coll. (1984a) ont permis de proposer que le complexe de dégagement de l'oxygène du PSII était atteint après la fumigation au  $\text{SO}_2$ .

Il semble bien que l'accumulation de sulfate et sulfite dans le cytosol causée par la pollution au  $\text{SO}_2$  puisse être à l'origine de ces observations. Ces deux ions sont acheminés vers le chloroplaste pour y être assimilés par transport et diffusion (Hampp et Ziegler 1977, Rennenberg 1984; O'Connor et coll., 1986). Le taux d'entrée est donc lié à la concentration des ions dans le cytosol. Cette concentration étant augmentée par le  $\text{SO}_2$ , il en découle une entrée excessive de sulfate et de sulfite dans le chloroplaste. Le surplus de sulfate et de sulfite dans le chloroplaste peut entraîner une inhibition de son activité. En effet des expériences *in vitro* avec des chloroplastes isolés par Marques et Anderson (1986) et par Silvius et coll. (1975) montrent que le sulfate et le sulfite diminuent l'activité en dégagement d'oxygène et peuvent mener à une diminution de croissance de la plante. Le sulfite entraîne une baisse d'activité du chloroplaste (Cerovic et coll., 1982; Marques et Anderson, 1982) et l'inhibition du PSII (Daniell et Sarojini, 1981; Shimazaki et coll., 1984b; Metzner et coll., 1987).

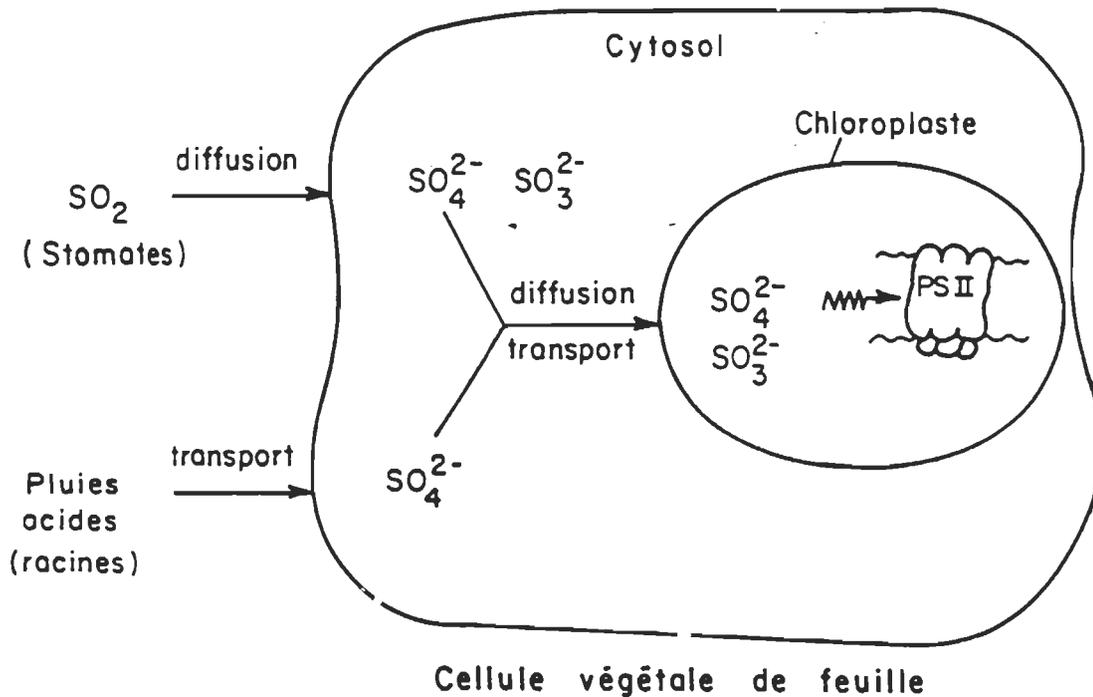


Figure 17. Entrée du sulfate et du sulfite dans la cellule végétale.

De son côté, le sulfate inhibe aussi l'activité du chloroplaste et son PSII (Silvius et coll., 1975; Sinclair 1984). Les travaux de Sandusky et coll. (1983) avec des membranes enrichies en PSII ont indiqué que le CDO du PSII était inhibé par le sulfate mais protégé de cet effet par l'ion chlorure. L'effet du sulfate et du sulfite sur le PSII corrobore les résultats d'expériences de fumigation au  $\text{SO}_2$  et explique un effet de la pollution au  $\text{SO}_2$  sur la photosynthèse. Il semble donc que l'effet de sulfate et du sulfite sur le PSII est un mécanisme d'inhibition du  $\text{SO}_2$  sur la photosynthèse des plantes.

### 1.3.2. Objectifs et importance du projet de thèse:

Etant donné l'importance du problème et le peu de compréhension fondamentale de l'effet du sulfate et du sulfite sur le PSII, je vise comme premier objectif:

#### A- Caractériser l'effet du sulfate et du sulfite sur les fonctions et la structure du PSII.

En ce qui regarde l'effet du sulfite, on n'a pas encore localisé son site d'effet sur le PSII ni vérifié une éventuelle modification des protéines du complexe du PSII (d'ailleurs, sa sensibilité au sulfite a été contestée par Cerovic et coll. (1982). Le mode d'inhibition du sulfate est quelque peu mieux connu. Cependant, aucune étude n'a été faite sur le transfert d'électrons du PSII au delà du CDO et rien n'est encore publié sur un éventuel effet du sulfate sur la structure du PSII. L'importance de cet objectif réside dans le fait qu'il peut apporter une compréhension fondamentale d'un effet important de la pollution au  $\text{SO}_2$  sur la photosynthèse. Cette compréhension fondamentale est nécessaire pour établir des stratégies visant à contourner les effets néfastes du  $\text{SO}_2$  sur la photosynthèse des plantes. Elle apportera les paramètres essentiels pour : une augmentation éventuelle de la résistance du chloroplaste au  $\text{SO}_2$  par manipulation génétique; un meilleur choix des espèces selon les propriétés chimiques du stroma de leur chloroplaste; un meilleur choix des espèces selon les

caractéristiques de fonctionnement de leur PSII;  
l'établissement d'un régime de croissance préventif ( fertilisation ) contre l'effet du  $\text{SO}_2$  sur le PSII. La compréhension fondamentale détaillée de l'effet du sulfate et sulfite sur le PSII permettra éventuellement d'améliorer la résistance de la photosynthèse du chloroplaste et ce, d'une façon logique et rigoureuse .

Le second objectif de mon projet de recherche est :

B -Contribuer à la compréhension du rôle des sites actifs et des protéines du PSII dans son efficacité photochimique.

En dépit des dix dernières années de recherche intensive sur les fonctions des polypeptides du PSII en relation avec les centres actifs, les relations structure-fonction du PSII sont connues avec peu de précision ( comparer Govindjee et coll., 1985; Homann 1987b; Nanba et Satoh 1987). La compréhension des fonctions sensibles du PSII comme celles impliquant les ions chlorure, calcium et bicarbonate est de première importance pour une éventuelle modulation de l'activité photosynthétique via le contrôle du contenu ionique du stroma. De même, les polypeptides, et surtout les polypeptides extrinsèques ont un impact prédominant sur la collaboration entre le PSII et la solution intra-stromatique pour l'oxydation de l'eau. Leur rôle dans l'oxydation de l'eau reste encore à établir. Je veux utiliser l'effet modulateur des ions sulfate et

sulfite pour expliquer le fonctionnement du PSII en précisant les relations structure-fonction dans ce complexe. La réalisation de cet objectif me permettra de contribuer à un thème de recherche fondamental en pleine effervescence, déterminant pour une éventuelle amélioration de la photosynthèse.

## CHAPITRE 2

METHODOLOGIE EXPERIMENTALE

2.1. Choix et préparation du matériel biologique: L'orge (*hordeum vulgare*) sera utilisé dans ce projet parce que: c'est une plante de type  $C_3$  représentant le plus vaste contingent d'espèces dans les plantes supérieures; c'est une plante facile à cultiver d'une façon homogène qui permet des résultats très reproductibles; et finalement, c'est une espèce de la famille des graminées, dont l'importance agricole est primordiale. De plus, les chloroplastes des plantes  $C_3$  sont homogènes en ce qui a trait aux propriétés des photosystèmes II, ce qui n'est pas le cas pour les espèces du type  $C_4$  (Popovic et coll., 1987a,b). Les semences utilisées proviennent du marché local et sont cultivées sur vermiculite. Les plantes sont arrosées quotidiennement avec l'eau courante et illuminées en permanence (sauf lorsque spécifié) par une lampe au sodium à haute pression (Phillips) délivrant une intensité au niveau des plantes de  $40 \text{ mW/cm}^2$ . Les feuilles peuvent croître normalement sous ces conditions pendant 9-10 jours. Cependant, la récolte de feuilles pour expérimentation se fait le 7e jour, quand l'activité optimale des PSII a été observée.

2.1.1. Isolation des chloroplastes: Les chloroplastes brisés utilisés dans ce travail sont isolés selon une méthode courante tel que décrit en figure 18 A (Walker 1975). Pour

l'extraction, les segments "ouverts" des feuilles d'orge sont sélectionnés et rincés à l'eau distillée. Les segments sont ensuite coupés en section de 0.5 cm et mélangés à la solution de broyage dont la composition est donnée en figure 18 A. Une masse de 100 g de feuilles est utilisée et broyée dans 250 ml de solution à 4°C. Le broyage est fait dans un mélangeur domestique (doté de lames supplémentaires) à haute vitesse pendant 10 s. La suspension résultante est filtrée à l'aide d'un tamis doté de pores de 25 µm de diamètre, ce qui laisse passer les chloroplastes libérés. La suspension de chloroplastes est centrifugée rapidement afin de séparer ceux-ci des enzymes libérés lors du broyage et aussi des débris cellulaires de petites dimensions. Les chloroplastes sont ensuite resuspendus dans un volume minimal de solution de resuspension hypotonique (sans sorbitol). A cette étape, les chloroplastes éclatent, libérant le compartiment stromatique et exposant les thylacoïdes à la solution. Une dernière centrifugation permet de séparer les chloroplastes brisés du contenu stromatique. La composition des solutions utilisées est tirée de Walker 1975. Le temps total entre le broyage des feuilles et la dernière centrifugation ne dépasse pas 15 min et toutes les opérations sont faites sur glace. L'examen au microscope, la composition en protéines (figure 19) et la mesure du transport d'électrons dans le PSII par dégagement d'oxygène (200-300 µmol O<sub>2</sub>/mg chl h) indiquent que les chloroplastes sont de qualité adéquate (Walker et coll., 1987).

### 2.1.2. Extraction de membranes enrichies en photosystèmes

II: Les traitements au sulfite et au sulfate ont été aussi étudiés à l'aide de membranes granaires enrichies en PSII (MEPSII). Ces membranes permettent d'étudier les fonctions du PSII indépendamment du PSI, de contrôler le pH environnant les deux côtés des PSII et de contrôler la concentration d'ions en éliminant les phénomènes de perméabilité membranaire. D'autre part, cette préparation permet de garder le PSII à l'intérieur de son environnement lipidique qui est déterminant sur ses fonctions (Horvath et coll., 1987). Les membranes seront préparées selon une méthode dérivée de Ikeuchi et Inoue (1986). L'isolation des MEPSII à partir des thylacoïdes est détaillée en figure 18 B. Les thylacoïdes sont mis dans la solution 4% Triton X-100 à une teneur de 1 mg chl et une température de 2-4°C. Le temps d'exposition au Triton est de 20 min sous agitation faible. Après ce traitement, la suspension est centrifugée à basse vitesse pour retirer les débris et l'amidon relâchés par la digestion des chloroplastes brisés. Le surnageant est centrifugé de nouveau à haute vitesse (30000g x 30 min) pour séparer les MEPSII de la solution de Triton. Les MEPSII sont finalement dilués dans une solution 0.4M sucrose, 40 mM Mes (pH 6.0) et 10 mM CaCl<sub>2</sub>. L'activité en dégagement d'oxygène supportée par le dichlorobenzoquinone (DCBQ) comme accepteur d'électrons exogène est de 650-800  $\mu\text{mol O}_2/\text{mg chl h}$ . La pureté de cette préparation a été évaluée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide tel que décrit plus loin. La comparaison entre

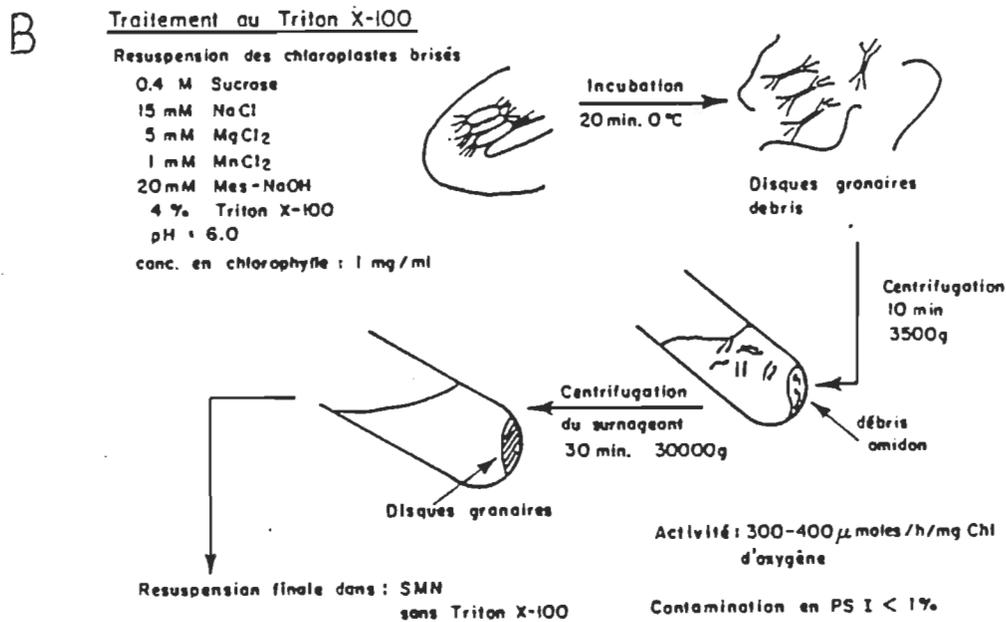
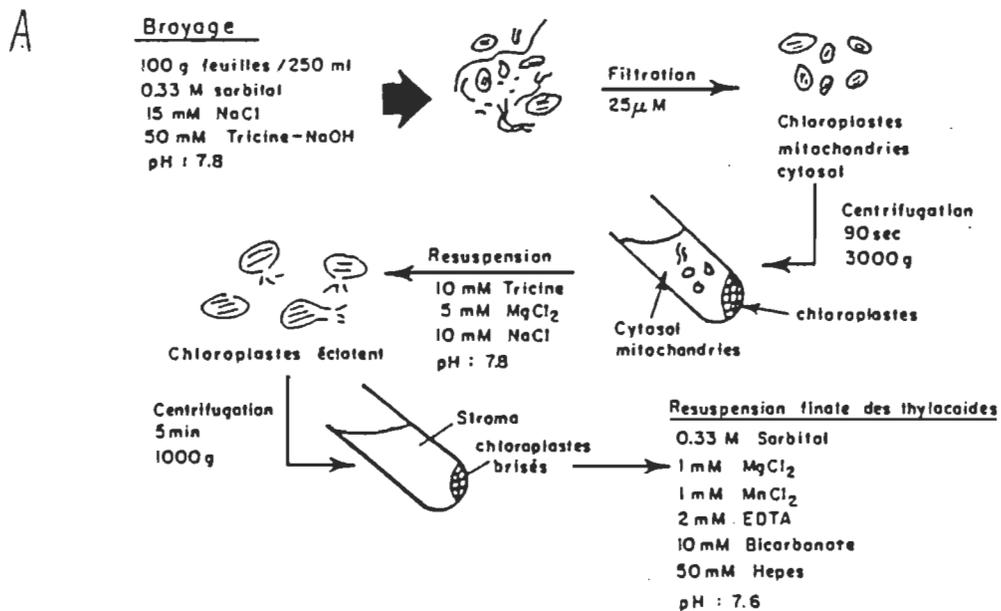


Figure 18. A) Préparation des chloroplastes brisés;  
 B) Extraction des MEPSII.

la composition en protéine des chloroplastes brisés (thyl) et celle des MEPSII (PSII sur la figure) est montrée en figure 19. On peut y constater l'absence des polypeptides associés aux autres complexes de la membrane (PSI, Cyt b6/f et ATP-ase=CF) et l'enrichissement en protéines du PSII. L'attribution des bandes de protéines pour les MEPSII est réalisée sur la base des travaux exécutés par l'auteur et de la comparaison des résultats publiés sur le sujet (Ghanotakis et coll., 1987; Takahashi et coll., 1988). La nomenclature des autres bandes de protéines provient de l'étude comparative de plusieurs travaux rapportant une telle analyse (Hoyer-Hansen et coll., 1988; Ortiz et coll., 1985, Lam et Malkin 1985, Machold et Meister 1979).

2.1.3. Culture des algues *Dunaliella bardawil*: La section 3.2.5. traite de l'effet du sulfate dans l'algue *Dunaliella bardawil*. L'intérêt de ces algues vient du fait que l'espèce *Dunaliella* démontre une capacité d'adaptation au sulfate (Gimmler et Weiss, 1987). Les algues utilisées ici proviennent de la collection du Dr. Ben-Amotz, Haifa Israël. Elles ont été cultivées dans un milieu marin artificiel contenant 0.25 M chlorure de sodium (Ben-Amotz et Avron, 1983). Les algues ont été soumises à un éclairage fluorescent continu (Phillips TL, 40 W) à une température de 25°C, avec agitation faible. Les algues ont été conduites en phase exponentielle de croissance préalablement aux traitements.

La quantité de matériel photosynthétique utilisé pour les analyses est communément exprimée en mg de chl. Pour ce

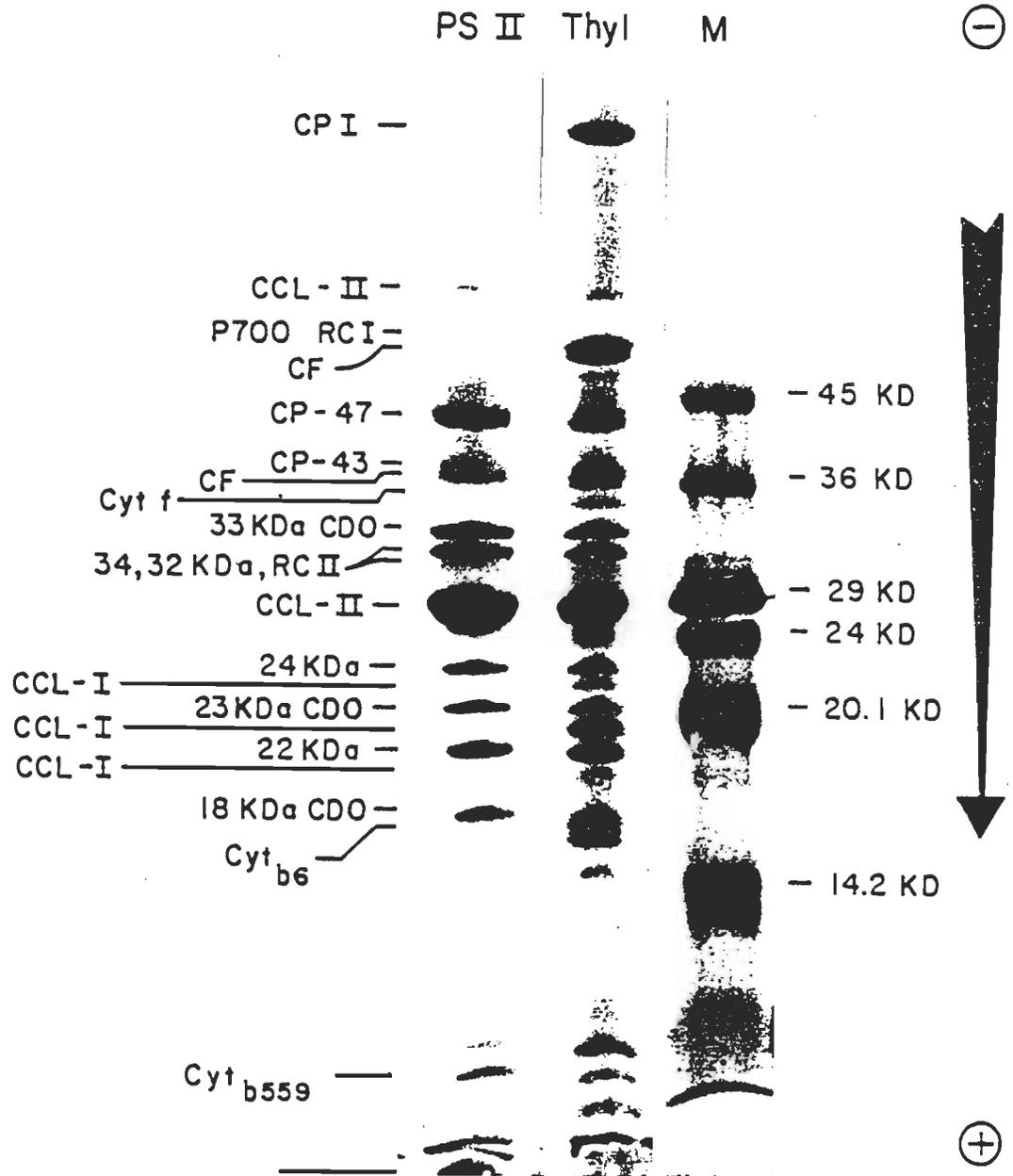


Figure 19. Séparation des protéines des chloroplastes brisés (thyl) et des MEPSII (PSII). La bande de droite est composée de protéines contrôles.

faire, la chl est extraite dans 80% acétone et quantifiée par spectrophotométrie (Jensen 1978).

2.2. Traitement au sulfite et sulfate: Le contre-ion sodium est choisi pour son inertie relative envers l'activité du PSII (Blough et Sauer, 1984; Ghanotakis et coll., 1985; Ono et coll., 1986a). L'anion sulfate est assez stable, a un très faible caractère basique ( $pK_b = 12.1$ ) et en conséquent n'impose pas de précautions particulières (Weast, 1981). Ce n'est pas le cas pour le sulfite. C'est un réducteur puissant ( $E = +0.93$  V) et une base assez forte ( $pK_b = 7$ ) pour déranger le pH d'une solution aqueuse lorsque concentré (Weast 1981). Le pH des solutions de sulfite est donc ajusté après l'addition du sulfite. Il faut donc réaliser qu'à pH 7.0, on aura en solution le sulfite et le bisulfite (sulfite protoné) en proportion égale. Afin d'assurer la présence du sulfite, il sera nécessaire de maintenir le pH au dessus de 7.0. Le potentiel réducteur du sulfite lui permet de réduire l'oxygène, le manganèse en état  $2+$  et d'autres agents oxydants présents dans le chloroplaste (Cotton et Wilkinson 1980). Cette facette de la chimie du sulfite et sa signification pour le temps de vie de cet anion dans le chloroplaste seront d'ailleurs mises en évidence dans la section 3.1.1..

Les traitements au sulfate et sulfite seront fait par incubation des chloroplastes brisés ou des MEPSII. Les conditions de traitement sont les suivantes sauf lorsque

spécifié: 200 µg en chl de matériel photosynthétique par ml de solution, agitation faible, lumière verte faible et température 0-4°C.

Les traitements de feuilles entières sont faits par infiltration sous vide. Pour ce faire, les segments de feuilles (2 cm de long, sélectionnés à 3 cm du bout de la feuille) sont déposés à la surface d'une solution de sulfate de sodium tamponnée, en noirceur et sous vide (par courant d'eau). Le vide aspire l'air contenu dans les méats et les stomates des feuilles pour y faire entrer la solution. Ceci accélère l'absorption de la solution par les cellules végétales.

Le traitement au sodium de sulfate sur les algues Dunaliella bardawil consiste à ajouter la quantité de sel adéquate dans le milieu de croissance sans interrompre l'exposition à la lumière. De cette façon, la physiologie des algues n'est pas modifiée ce qui permet d'étudier les mécanismes de résistance au sulfate dans ces algues.

### 2.3. Méthodes analytiques:

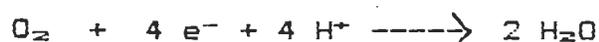
#### 2.3.1. Séparation des protéines par électrophorèse:

L'effet du sulfate et sulfite sur la structure sera évaluée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide selon une méthode adaptée permettant une séparation optimale des polypeptides du PSII (Volker et coll., 1985). Après les traitements au sulfate et sulfite, les chloroplastes ou MEPSII sont dilués à 1 mg/ml dans une solution de digestion composée de : 10%

mercaptoéthanol, 2 % dodécyl sulfate de sodium (Sigma Chem. L-4509), 20 % sucrose, 1 mM EDTA et 10 mM Trizma (pH 7.0) et incubés pendant 30 min à température de la pièce. Puis, des aliquots de 15-30  $\mu$ l de suspension sont déposés sur un gel de rapprochement à 5 % polyacrylamide composé de : 5 % acrylamide, 0.13 % bis-acrylamide, 0.1 M tris (pH 6.8), 0.1 % SDS, 0.025 % ammonium persulfate et 16  $\mu$ l Temed/ 10 ml de gel. Ce gel est superposé au gel de résolution à 15 % polyacrylamide composé de : 15 % acrylamide, 0.4 % bis-acrylamide, 1 M Trizma (pH 9.1), 0.1 % SDS, 0.125 ammonium persulfate et 16  $\mu$ l Temed/ 40 ml de gel. L'utilisation de ce système discontinu permet une augmentation de la résolution des bandes de protéines (Hames et Rickwood 1981). De plus, 6 M urée sont présents dans les deux gels, afin d'augmenter la netteté des bandes de protéines du PSII dans la région de 30-35 kDa (Kyle et coll., 1983). Les deux gels sont montés entre deux plaques de verre dans un cadre de moulage commercial (LKB slab gel apparatus). Puis, les protéines chargées par le sulfate dodécyl de sodium sont soumises à un champ électrique de 10 mA pendant 12 heures à l'aide d'un générateur de courant LKB no.2197. Les protéines ainsi séparées sont colorées au bleu de coomassie R-250 (Sigma Chem. B-0630) par la méthode habituelle (Hames et Rickwood 1981). Le gel coloré révèle la présence des polypeptides du thylacoïde dont la plupart ne sont pas visibles avant coloration (exemple de gel coloré en Fig. 19, p. 41b). La comparaison de la sensibilité du bleu de coomassie avec celle

offerte par la coloration à l'argent (plus onéreuse) n'a démontré aucune différence notable. La densité de coloration des bandes de protéines a été mesurée à l'aide d'un densitomètre Clifford Densicom model-445 à balayage.

2.3.2. Dégagement d'oxygène par polarographie en continu et par éclairs: A un potentiel de - 0.6 V jusqu'à - 0.9 V, la surface du platine catalyse la réduction de l'oxygène. La réaction globale peut s'inscrire comme suit:



La réduction de l'oxygène à l'électrode de platine génère un courant qui peut être détecté à l'aide d'un potentiomètre (Delieu et Walker 1972). L'augmentation de la concentration d'oxygène en solution consécutive à l'activité photosynthétique est proportionnelle au transport d'électrons lorsque mesuré en continu. L'électrode utilisée pour cette mesure est de type "Clark" (Delieu et Walker 1972). L'électrode combinée est séparée de la suspension biologique par une membrane perméable à l'oxygène (Yellow Spring Instr.). Le contact électrique est assuré par une solution mi-saturée de KCl. De cette façon, on peut ajouter au matériel photosynthétique des accepteurs d'électron exogènes qui soutiennent le transport d'électrons. La membrane empêche les accepteurs de se réduire à l'électrode ce qui pourrait biaiser la mesure d'oxygène.

Pour tous les échantillons utilisés, la méthode consiste

à laisser équilibrer la température de la suspension biologique entre 2 et 5 min selon l'écart entre la température de l'échantillon et la température de l'électrode maintenue constante à 25°C. Pour la mesure avec les algues, on éclaire immédiatement la suspension à l'aide d'un projecteur d'intensité non-saturante pendant 3 min. Pour la mesure du dégagement d'oxygène des thylacoïdes on ajoute les accepteurs ferricyanure de potassium (FeCN) ou para-benzoquinone (p-BQ). Ces agents ont un potentiel redox permettant l'oxydation du bassin de plastoquinones (Brauregard et Popovic 1987) et soutiennent le dégagement d'oxygène pendant 2-5 min. On ajoute un aliquot de FeCN pour avoir une concentration finale de 2-4 mM dans la solution de mesure, 10 sec avant l'illumination. De même, pour la p-BQ, on mesure le dégagement dans 0.25-0.75 mM. Le chlorure d'ammonium est ajouté à la solution au début de l'illumination afin d'éliminer la formation d'un gradient de protons nécessaire à la photophosphorylation. L'accumulation de protons à l'intérieur du thylacoïde ralentit l'activité du CDO, ce qui est à éviter (Delieu et Walker 1972). La mesure de dégagement d'oxygène des MEPSII requiert aussi la présence d'un accepteur d'électron exogène. On ajoutera 0.3-0.6 mM 2,5-dichlorobenzoquinone (DCBQ) ou 2-4 mM FeCN selon le cas pendant la mesure.

La mesure de l'oxygène produite conséquemment à de courts éclairs (5 µsec) permet de faire avancer pas à pas les détecter le passage des CDO vers les états (nommé S)

supérieurs. Elle ne permet pas de mesurer le transport d'électrons mais plutôt une investigation du mécanisme de l'oxydation de l'eau (Joliot et Kok 1975). L'électrode utilisée pour ce travail est dépourvue de membrane, ce qui lui confère une vitesse de réponse supérieure (Meunier et Popovic 1988a,b). Cependant, l'utilisation d'accepteurs exogènes est sujette à induire un artéfact important. Cette méthode ne sera appliquée que pour les thylacoïdes tel que discuté en section 3.2.3. Les thylacoïdes sont centrifugés après les traitements, puis adaptés en noirceur pendant 10 min. Ils sont dilués dans une solution de mesure comprenant: 0.1 M sucrose et 0.36 M KCl, puis sont soumis à la mesure. Un volume de 80  $\mu$ l de solution à 100  $\mu$ g chl/ml en thylacoïdes est déposé sur l'électrode de platine. Puis, un gel à 30 % en polyacrylamide est déposé sur la solution, ce qui fixe l'épaisseur de l'échantillon et assure le contact électrique entre les deux électrodes (Meunier et Popovic 1987a). Puis, l'électrode est polarisée à - 0.74 V relativement à l'électrode de référence. Les éclairs sont fournis par une lampe au xénon FX 249 déclenchée par un module "Lite-Pac" FY 712 (EG G electro-optics div.). La fréquence est de 10 Hz, ce qui permet un temps suffisant entre les éclairs pour la mesure et pour l'avancement des états S (Meunier et Popovic 1988a,b). Le nombre total d'éclairs est de 15, après quoi la capacité oxydante de la membrane est affaiblie. La tension sortant de l'amplificateur trans conductance est mesurée par un convertisseur analogue digital relié à un microordinateur

IBM-PC (Meunier et Popovic 1987a). Le dégagement d'oxygène induit par un éclair 'n' ( $Y_n$ ) peut être exprimé par l'équation suivante:

$$Y_{n+4} + a_1 Y_{n+3} + a_2 Y_{n+2} + a_3 Y_{n+1} + a_4 Y_n = 0$$

Les paramètres  $a_{1-4}$  (appelés coefficients sigma) sont fonction des ratés et des doubles-transitions. Les pourcentages de ratés et de double-transitions doivent être approximés de façon à ce que les  $Y_n$  évalués expérimentalement vérifient l'équation (Delrieu et Rosengard 1987). La détermination des coefficients sigma est réalisée par régression linéaire à plusieurs variables (Kleinbaun et Kupper 1978). La relation entre la probabilité moyennes des ratés ( $\bar{\alpha}$ ) et les coefficients sigma est exprimée par l'équation suivante (Lavorel 1976):

$$\bar{\alpha} = - a_1/4$$

2.3.3. Transport d'électrons par colorimétrie: La réduction du dichlorophénol indophénol (DCPIP) provoque un changement d'absorbance à 600 nm observable à l'aide d'un spectrophotomètre standard (Pye-Unicam SP6-450). Les thylacoïdes sont resuspendus dans 0.1 M sucrose, 30 mM Hepes (pH 7.5), 10 mM NaCl et 50 uM DCPIP. Puis 2 ml de cette solution sont déposés dans une cellule placée dans le spectrophotomètre en absence de lumière. Une fois que les thylacoïdes ont reposé 2 min dans ces conditions,

l'échantillon est illuminé à l'aide d'un faisceau polychromatique placé au-dessus de l'échantillon. La lumière est filtrée au photomultiplicateur par un filtre CS2-63 ne laissant passer que la lumière de 600 nm et plus. Pendant l'illumination, l'absorbance à 600 nm est enregistrée. Le transport d'électrons est évalué par le taux de changement d'absorbance (Popovic et coll., 1979). L'utilisation de DPC à 0.5 mM permet de réduire P680 en passant outre le CDO et de mesurer le transport d'électrons indépendamment de l'état de CDO (Muallem et Izawa 1980).

#### 2.3.4. Activité photochimique par fluorescence variable:

Les courbes de fluorescence variable sont mesurées à l'aide d'un fluorimètre à sphère intégrante (Morissette et coll., 1988). Pour les chloroplastes, la solution de mesure consiste en: 0.4 M sucrose, 10 mM Hepes et 5 mM MgCl<sub>2</sub>. Les échantillons pré-adaptés au noir pendant 10 min sont dilués dans la solution de mesure à 10 µg chl/ml à température de la pièce. L'illumination verte est fournie par une lumière polychromatique filtrée par les filtres CS 4-96 et CS 3-71 ce qui permet une illumination plus homogène des PSII des granums. La fluorescence émise est captée par un détecteur optique Devar 539-01-5 après une sélection de la fluorescence à l'aide des filtres CS-2-64 et CS-7-59 (Morissette et coll., 1988). Le signal de fluorescence est préamplifié 100 fois et acheminé à un convertisseur analogue-digital (Northwest Instr. Syst. Scope-85). La valeur de la fluorescence constante F<sub>0</sub> est évaluée par l'extrapolation des 20 premières ms de

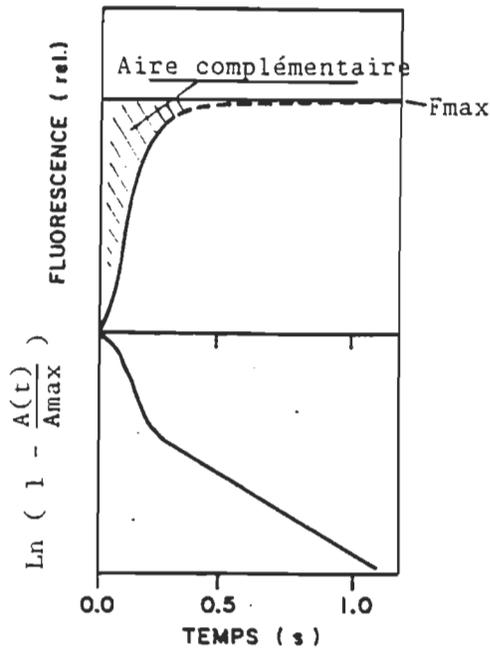


Figure 20. Fluorescence variable de chloroplastes traités au DCMU et aire complémentaire.

fluorescence à l'ordonnée (Morissette et Popovic 1987). La fluorescence variable normalisée est exprimée par  $F_{vn} = (F(t) - F_0) / F_0$  où  $F(t)$  est la fluorescence totale au temps  $t$ .

L'addition de DCMU aux chloroplastes inhibe l'oxydation de  $Q_a$  par l'accepteur  $Q_b$ , ce qui isole la photochimie du PSII des autres mécanismes influençant l'état rédox de  $Q_a$  (Melis et Homann 1975; Briantais et coll., 1986). L'aire au dessus des courbes de fluorescence variable (aire complémentaire) évaluée en présence de DCMU est proportionnelle au nombre de  $Q_a$  à réduire dans les PSII (Lavorel et coll., 1986). L'aire complémentaire (voir figure 20) a été évaluée par l'intégration de  $F_{max} - F(t) dt$ , ce qui correspond à l'aire

comprise entre la courbe de fluorescence  $F = F(t) - F_0$  et le niveau maximal,  $F_{max}$  (Melis et Homann, 1975).  $F_{max}$  est obtenu après 2 sec d'illumination de chloroplastes traités au DCMU (Bell et Hipkins 1985). Les valeurs de  $K_b$  ont été évaluées par les pentes des transients lents du graphique semi-logarithmique de l'accroissement de l'aire  $(1 - A(t)/A_{max})$  au dessus de la courbe de fluorescence mesurée en présence de DCMU (Melis et Homann, 1975). Ces pentes correspondent au taux de réduction des  $Q_a$  par les PSII  $b$  (Melis 1985). La valeur de  $K_a$  a été évaluée par soustraction de la phase  $b$  tel que publié par Owens 1986.  $A_{max}$  représente l'aire complémentaire totale tandis que  $A(t)$  est l'aire cernée au temps  $t$ . La contribution des PSII  $b$  à la fluorescence totale,  $B_{max}$ , est obtenue de l'intercept de la phase lente avec l'ordonnée (Melis et Homann, 1975).

Pour les mesures de fluorescence variable dans les feuilles intactes, la lumière d'excitation provient d'un laser He-Ne avec longueur d'onde d'émission de 633 nm. Les feuilles sont adaptées 10 min en obscurité avant les mesures. La même source lumineuse a été utilisée pour les algues Dunaliella bardawil. Les algues ont été adaptées au noir pendant 10 min et soumises aux mesures dans la solution de croissance (Ben-Amotz et Avron, 1983) avec différentes concentrations de sulfate de sodium.

2.3.5. Transfert d'énergie par fluorospectroscopie: Les spectres de fluorescence à température de la pièce ont été enregistrés de 650-750 nm avec un fluorimètre équipé d'un

analyseur optique à multicanaux OMA-2 (Sironval et coll., 1984). La fluorescence est captée par un détecteur ISIT relié à un système informatisé OMA 2. Chaque spectre est accumulé en utilisant les 500 canaux de la cible ISIT (matrice de diodes) pendant 20 ms. Les segments de feuilles sont fixés à l'extrémité d'une fibre optique reliée à la matrice de diodes capteuses. L'excitation des complexes chlorophylle-protéine est induite à l'aide d'un laser He-Ne de  $\lambda_{\text{max}} = 632.8 \text{ nm}$ . L'intensité au niveau de la feuille est de  $60 \text{ mW/cm}^2$ . Le spectre final est exprimé par la somme de 10 balayages pour un enregistrement total de 2 sec (20 ms/balayage).

Les spectres à basse température ont l'avantage d'être résolus pour les trois complexes CCL-II, PSII et PSI. De plus, étant donné que le transport d'électrons est bloqué à 77K, la fluorescence est liée seulement à la densité d'exciton dans les complexes (Krause et Weiss 1984). Pour les mesures, un spectrofluorimètre Zeiss doté d'un photomultiplicateur EMI 9558B a été utilisé (Sironval et coll., 1968). Les algues (10 ug chl/ml) sont immergées dans l'azote liquide et soumises à une illumination fournie par une lampe quartz-iode sélectionnée par un filtre interférentiel Wood ( $\lambda_{\text{max}} = 436 \text{ nm}$ ). L'émission de fluorescence est enregistrée de 600 à 750 nm.

## CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSION3.1. Effets du sulfite sur le photosystème II

3.1.1. Inhibition du dégagement d'oxygène du photosystème II par l'ion sulfite: Plusieurs études traitant de l'effet inhibiteur du  $\text{SO}_2$  sur la photosynthèse ont été réalisées (Sylvius et coll., 1975; Daniell et Sarojini 1981; Malhotra et Khan 1983). Il a été démontré que les réactions photochimiques ayant lieu dans le chloroplaste sont une cible de l'effet néfaste du  $\text{SO}_2$  (Malhotra et Khan 1983). Le dioxyde de soufre absorbé de l'atmosphère est converti en sulfite dans la cellule végétale (Daniell et Sarojini 1981, Cerovic et al 1982). Récemment, l'étude de l'effet du sulfite sur les réactions photosynthétiques primaires permit l'identification des sites d'effet du sulfite (Cerovic et coll., 1982; Shimazaki et coll., 1984b). Il a été démontré que l'activité en dégagement d'oxygène du chloroplaste était sensible à la présence du sulfite. Cependant, l'amplitude de l'inhibition due au sulfite demeure un point de dispute (Sylvius et coll., 1975; Daniell et Sarojini 1981) et est même réfutée (Cerovic et coll., 1982). La présente section a pour but de déterminer: 1- est-ce que le PSII est sensible au sulfite ? et 2- est-ce que la chimie du sulfite en solution affecte la mesure de dégagement d'oxygène par

polarographie dans les chloroplastes ?.

Les mesures présentées sont faites à l'aide de chloroplastes d'orge isolés tel que décrit dans le chapitre 2. Ces chloroplastes brisés furent mis en présence d'une solution composée de: 0.33 M sorbitol, 50 mM Hepes (pH 7.5), 2 mM EDTA, 1 mM  $MgCl_2$ , 1 mM  $MnCl_2$  et 10 mM  $NaHCO_3$  que ce soit pour les traitements au sulfite de sodium ou pour la mesure de dégagement d'oxygène. Le dégagement d'oxygène est mesuré tel que décrit dans le chapitre 2.

La figure 21 montre l'activité en dégagement d'oxygène dans les chloroplastes et l'effet de l'addition de sulfite de sodium pendant la mesure d'activité. Les numéros entre parenthèses indiquent la quantité d'oxygène dégagé en  $\mu\text{mol/heure mg chl}$ . Apparamment, une concentration égale à 0.3 mM en sulfite fut suffisante pour arrêter le dégagement d'oxygène. Lorsque le FeCN fut utilisé comme accepteur d'électrons au lieu du p-BQ, un effet similaire fut enregistré (résultats non-montrés). L'effet du sulfite, similaire à ce qui à été observé dans le passé, peut être interprété comme le résultat de l'interaction du sulfite hautement réactif avec le PSII (Silvius et coll., 1975, Daniell et Sarojini 1981). Une autre façon de voir la nature de cet effet est de considérer l'instabilité du sulfite en solution aqueuse (Garsed 1981, Nickless 1986). Afin de vérifier la stabilité du sulfite dans la solution baignant les chloroplastes, l'interaction du sulfite avec l'oxygène et les accepteurs artificiels FeCN et pBQ a été

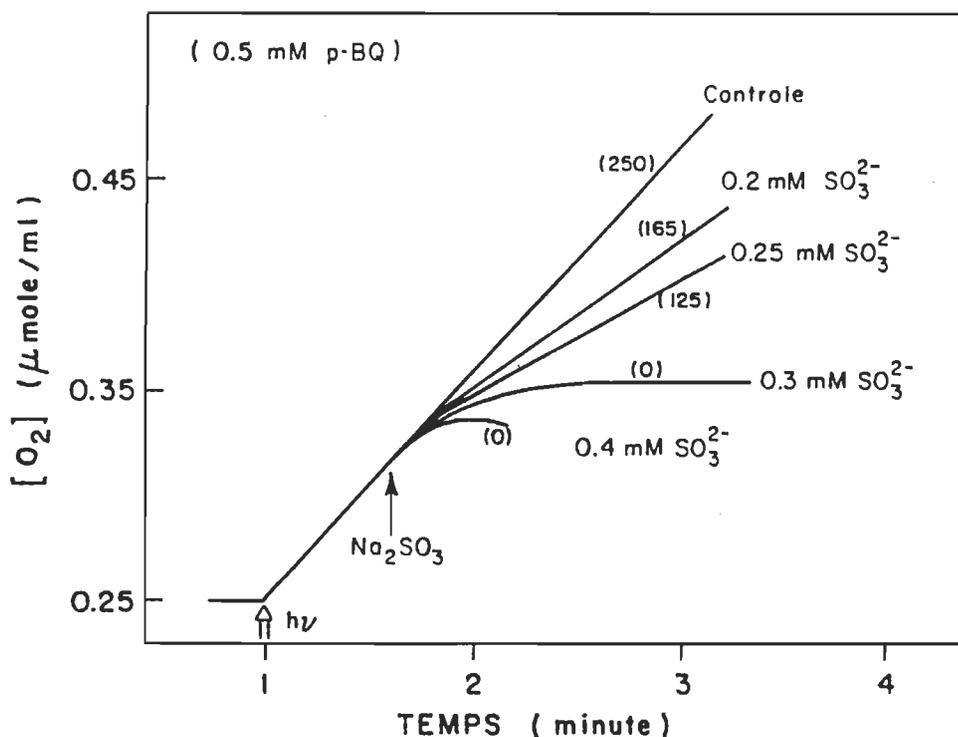


Figure 21. Effet du sulfite de sodium sur le dégagement d'oxygène des thylacoïdes. La flèche ouverte indique le début de l'illumination. La flèche noire indique le moment de l'addition du sulfite de sodium.

étudiée. La figure 22 démontre la consommation de l'oxygène par le sulfite, dans la solution de traitement en absence de chloroplastes. Lorsque les accepteurs d'électrons sont omis de la solution, l'oxygène présent fût complètement éliminé de la solution en moins d'une minute après l'addition de sulfite de sodium. Lorsque le sulfite était ajouté en présence d'accepteurs d'électrons, la consommation de l'oxygène fût diminuée. Ceci suggère que le sulfite réagit avec l'oxygène et avec les accepteurs artificiels utilisés pour la mesure du dégagement d'oxygène.

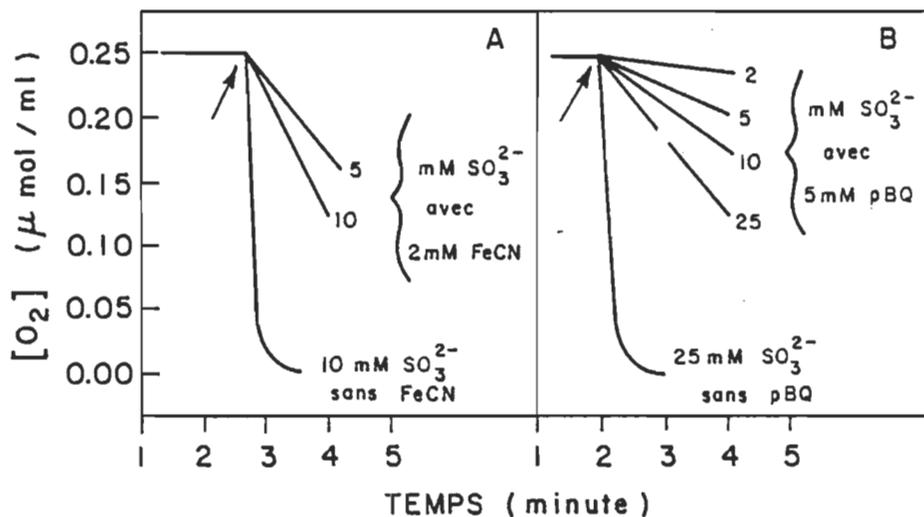


Figure 22. Effet du sulfite sur la concentration de l'oxygène en solution en présence ou non d'accepteurs exogènes. La flèche indique le moment de l'addition du sulfite de sodium.

L'importance de la nature chimique du sulfite dans cet effet est mise en évidence par la figure 23. La protonation du sulfite en bisulfite diminue son potentiel réducteur drastiquement (Cotton et Wilkinson 1980). On peut voir sur la figure 23 que la consommation d'oxygène est reliée à la présence du sulfite et à son potentiel réducteur. Le bisulfite présent à pH inférieur à 7 est incapable d'induire un tel effet. Puisque les mesures de dégagement dans les chloroplastes se font à pH légèrement alcalin, l'ion présent en solution est bien le sulfite. Les résultats montrés ici indiquent que le sulfite peut modifier l'interprétation de résultats obtenus par polarographie de l'oxygène. La figure 24 démontre l'effet du sulfite sur l'interprétation de telles mesures. Dépendant de la concentration d'accepteurs

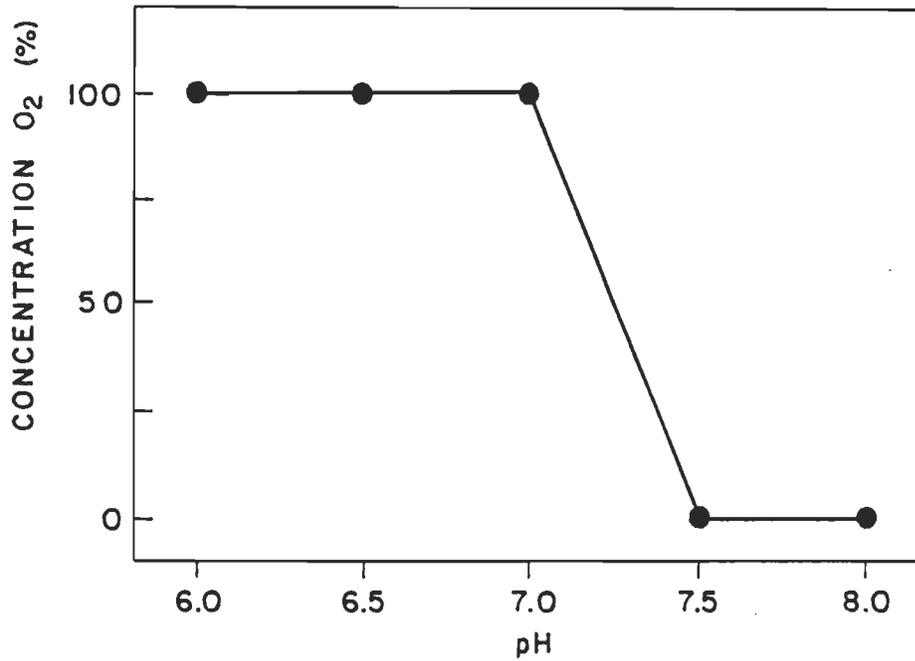


Figure 23. Effet du pH sur la concentration d'oxygène en solution en présence de 10 mM sulfite de sodium.

exogènes ajoutée, la quantité de sulfite nécessaire pour "inhiber" le PSII passe de 0.1 mM à 0.8 mM. Ceci confirme que l'instabilité du sulfite en solution peut être à la base des résultats contradictoires présentés auparavant (Cerovic *et coll.*, 1982; Daniell et Sarojini 1981).

Etant donné que le sulfite a un potentiel réducteur de +0.93 V, il lui est possible de réduire le dioxygène (Garsed



1981, Nickless 1986). Les équations 1 à 3 montrent que le potentiel de réduction de l'oxygène et des accepteurs pBQ et

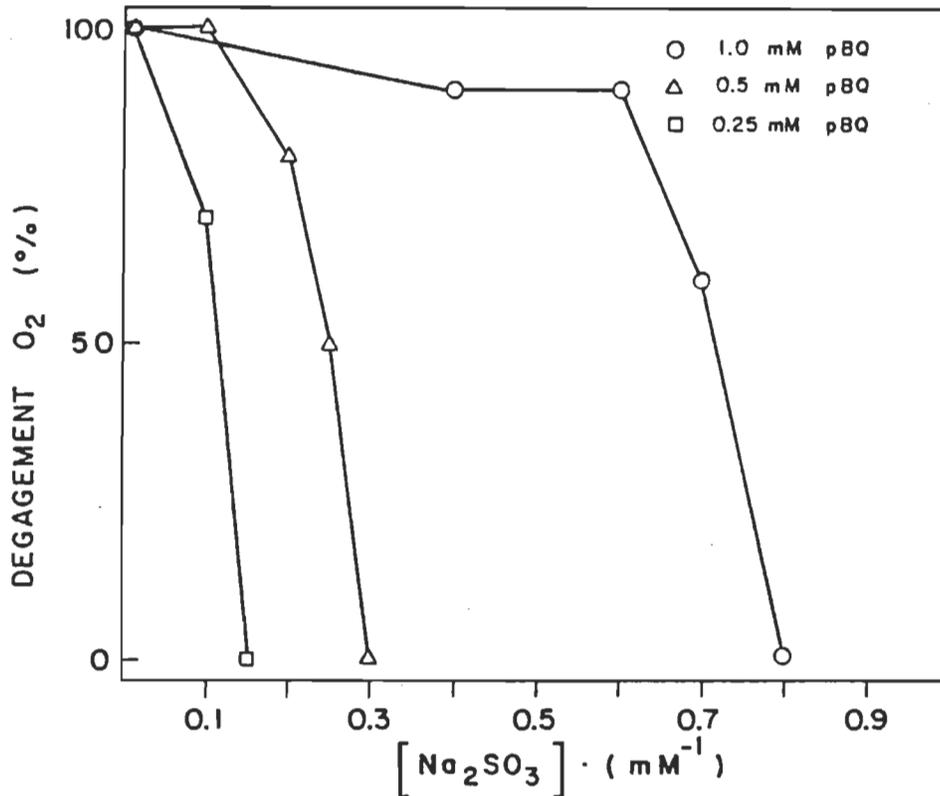


Figure 24. Dépendance entre la concentration de l'accepteur p-BQ, la concentration en sulfite et l'activité apparente en dégagement d'oxygène dans les chloroplastes brisés.

FeCN sont très similaires (Weast 1982, V. Petrouleas, communication personnelle). La proximité de ces potentiels résulte en une compétition entre ces molécules pour l'oxydation du sulfite. Les résultats indiquent clairement que le sulfite peut invalider les mesures de dégagement d'oxygène lorsqu'il est présent dans la solution de mesure. De façon à éviter la réduction par le sulfite de

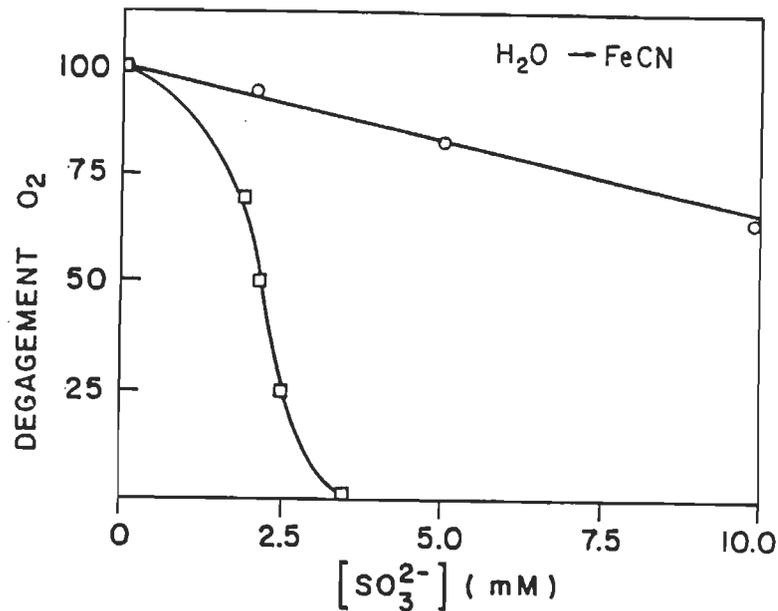


Figure 25. Comparaison de l'activité mesurée en présence de sulfite et en absence de sulfite dans la suspension de chloroplastes.

l'oxygène et des accepteurs d'électrons artificiels, il est donc nécessaire de retirer le sulfite avant la mesure d'activité de dégagement d'oxygène. De façon à apporter des résultats plus crédibles, l'effet du sulfite sur le dégagement d'oxygène par le PSII a été observé après avoir retiré le sulfite du milieu de mesure. La figure 25 montre le taux de dégagement d'oxygène mesuré avec des chloroplastes incubés 10 min avec du sulfite puis, après centrifugation, dilués dans une solution dépourvue de sulfite (cercles). Les carrés montrent l'activité mesurée en présence de sulfite. L'activité en dégagement d'O<sub>2</sub> des PSII fut diminuée de 30 % après une préincubation dans 10 mM sulfite. Lorsque le sulfite fût ajouté à la solution de mesure avec des chloroplastes non-traités, l'activité

tombait à zéro en présence de seulement 3.5 mM sulfite. Les résultats présentés permettent de conclure que le sulfite affecte réellement l'activité du PSII tel qu'indiqué par le taux de dégagement d'oxygène mesuré. Cependant, quand le sulfite est présent pendant la mesure, l'inhibition causée par ce dernier est artificiellement amplifiée par la réduction de l'oxygène et des accepteurs utilisés. Les différentes conclusions faites sur l'inhibition du PSII par le sulfite pourraient donc être dues à l'effet du sulfite sur la méthode de mesure elle-même (Silvius et al. 1975, Cerovic et al. 1982, Daniell et Sarojini 1981).

3.1.2. Enlèvement des polypeptides du complexe de dégagement d'oxygène par le sulfite de sodium: La protéine extrinsèque de 33 kD est de loin la plus importante dans l'activité en dégagement d'oxygène parmi les polypeptides extrinsèques du PSII (Murata et coll., 1983; Kuwabara et Murata 1983; Govindjee et coll., 1985). Il a été démontré que lorsqu'on enlève par traitement chimique la protéine de 33 kD l'activité en dégagement d'oxygène du PSII est complètement inhibée et qu'aucun traitement ne permet de recouvrer l'activité d'origine en son absence (Kuwabara et coll., 1985; Vass et coll., 1987; Ono et Inoue 1983; Volker et coll., 1985). On sait maintenant que cette protéine est liée directement au complexe central du PSII (Bricker et coll., 1988), en opposition aux polypeptides extrinsèques 23 et 18 kD qui sont ancrés au PSII via la protéine de 33 kD (Murata et coll., 1983; Ono et Inoue

1983). La nature et les propriétés des liens qui retiennent ce polypeptide au PSII ne sont pas bien établies. Certains chercheurs ont suggéré que des interactions hydrophobiques sont impliquées (Murata et coll., 1983), d'autres proposent la participation de ponts hydrogène (Govindjee et coll., 1985; Franzen et Andreasson 1984), et finalement il se pourrait que de simples forces d'attraction électrostatiques soient responsables du lien entre la protéine de 33 kD et le PSII (Ono et Inoue 1983). Récemment, Kuwabara et coll. (1987) soulignaient la présence de pont(s) S-S dans cette protéine et l'importance de ces ponts dans le maintien de la structure tertiaire de la protéine de 33 kDa. Le sulfite a été utilisé depuis des années pour briser les ponts S-S par sulfonation (Bailey et Cole 1959). Donc, le sulfite pourrait affecter les liens retenant la protéine de 33 kDa au PSII. Dans cette section, les questions suivantes guideront l'investigation: 1- est-ce que le sulfite affecte les liens entre les protéines de 33 kDa, 23 et 18 kDa et le PSII? et 2- est-ce que l'inhibition de l'activité du PSII montrée en section 3.1.1. est attribuable à un effet du sulfite sur les protéines du CDO?

Les expériences présentées dans cette section ont été exécutées sur des préparations de fractions membranaires enrichies en PSII, préparées tel que décrit dans le Chapitre 2. Pour les traitements au sulfite, 200 ug en chl de MEPSII furent suspendus dans 1 ml de solutions de traitement nommées A,B,C et D selon la composition. Les traitements

consistent en une incubation de MEPSII à 0-4°C en noirceur et avec une faible agitation. Toutes les solutions contiennent 0.4 M sucrose et 10 mM NaCl. Pour la solution A, 40 mM Hepes (pH 8.0) et différentes concentrations de sulfite ont été ajoutées; pour la solution B, 40 mM Mes (pH 6.5); pour la solution C: 40 mM glycine (pH 9.8); pour la solution D, 40 mM glycine (pH 9.8) et différentes concentrations de sulfite de sodium ont été ajoutées. Après centrifugation des MEPSII, leur composition en polypeptides fut évaluée par électrophorèse tel que décrit au Chapitre 2.

La figure 26 révèle l'enlèvement des polypeptides extrinsèques du CDO de masse apparente de 23 et 18 kD par l'incubation au sulfite de sodium à pH 8.0. Le pH alcalin de la solution maintient l'équilibre sulfite/bisulfite en faveur de la forme sulfite. Le largage de ces sous-unités progresse rapidement lorsque la concentration en sulfite passe de 0 à 100 mM, tandis qu'il est peu amplifié par une augmentation supplémentaire de la teneur en sulfite de sodium. La fraction des protéines de 23 et 18 kD restante après un traitement à 100 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  est d'environ de 35% et 10% respectivement, pour une baisse du dégagement d'oxygène de 70 % (non-montré). Dans ces conditions de traitement, aucune perte en polypeptide de 33 kD n'a été détectée tel que montré en figure 26. L'enlèvement des protéines de 23 et 18 kD par des traitements au chlorure de sodium à concentration élevée a été remarquée dans le passé et ce phénomène fut attribué à un effet d'écran ionique

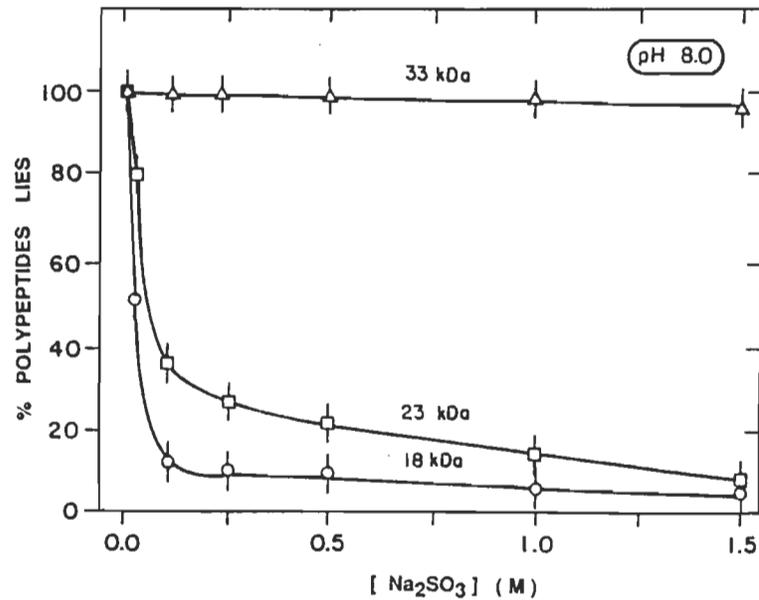


Figure 26. Enlèvement des polypeptides de 23 et 18 kDa par le sulfite de sodium à pH 8.0.

affaiblissant les attractions électrostatiques liant les deux sous-unités à la membrane (Murata et coll., 1983; Kuwabara et Murata 1983). Les données présentées en figure 26 semblent appuyer cette interprétation. Cependant, la résistance montrée par la protéine de 33 kD face à l'incubation au sulfite indique que des forces attractives autres que les attractions électrostatiques peuvent être impliquées dans son attachement au PSII.

L'effet de l'incubation au sulfite de sodium à pH plus alcalin (9.8) est décrit en figure 27. La partie A de la figure montre le patron d'électrophorèse obtenu de l'analyse de la composition des MEPSII traités en absence de sulfite à pH 6.5 (solution B). Les bandes de protéine indiquées par des lignes représentent les trois protéines extrinsèques du CDO (Murata et coll., 1983; Govindjee et coll., 1985; Ono et

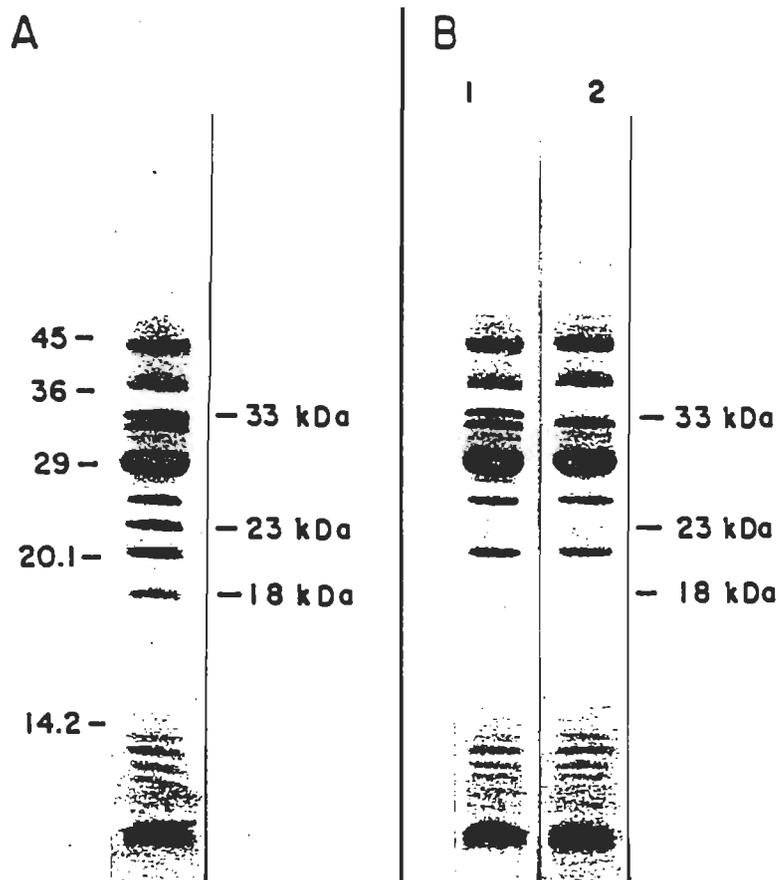


Figure 27. Effet de l'incubation à pH 9.8 avec et sans sulfite de sodium sur la composition en protéines des MEPSII.

Inoue 1983). L'effet de l'incubation à pH 9.8 en absence (1ere colonne) ou avec 50 mM sulfite (2ème colonne) est montré dans la partie B de la figure 2. Le patron électrophorétique montré en 2e colonne permet de constater une perte évidente de la protéine de 33 kD, qui s'ajoute à la disparition des polypeptides de 23 et 18 kD. Le largage des protéines de 23 et 18 kD observé dans ces conditions semble être dû au pH élevé, tel que l'indique la comparaison

du patron d'électrophorèse obtenu après un traitement à pH 9.8 en absence de sulfite de sodium (partie B, colonne 1). Ceci peut être attribué à la neutralisation des charges "liantes" par titrage de groupes électropositifs (Karukstis et coll., 1985). Dans ce cas, le pH élevé utilisé causerait le largage des polypeptides de 23 et 18 kD par titrage tandis que l'enlèvement de ces protéines par haute concentration de sulfite (fig. 26) serait attribuable à un masquage des charges impliquées. L'enlèvement de la protéine de 33 kD ne fût observé que lorsque le sulfite était présent à pH 9.8. Il semble donc que dans ce cas, deux conditions sont nécessaires pour briser les liens entre 33 kD et le PSII. Franzen et Andreasson (1983) ont proposé l'existence de ponts hydrogène ayant pour rôle de maintenir la protéine de 33 kD près du PSII, tandis que l'importance des attractions électrostatiques dans ce rôle fut supporté par Ono et Inoue en 1983. L'étude présentée ici supporte l'existence de ponts hydrogène entre la protéine de 33 kD et le PSII. Cependant, il semble qu'en dépit du bris de ces ponts tel que provoqué par un pH élevé, la protéine reste accroché au PSII tant qu'une certaine concentration de sulfite de sodium n'ait été ajoutée. La figure 28 démontre que ce seuil de 50 mM sulfite de sodium suffit à enlever la presque totalité des protéines de 33 kDa et que l'addition de sulfite supplémentaire au traitement ne change pas le résultat.

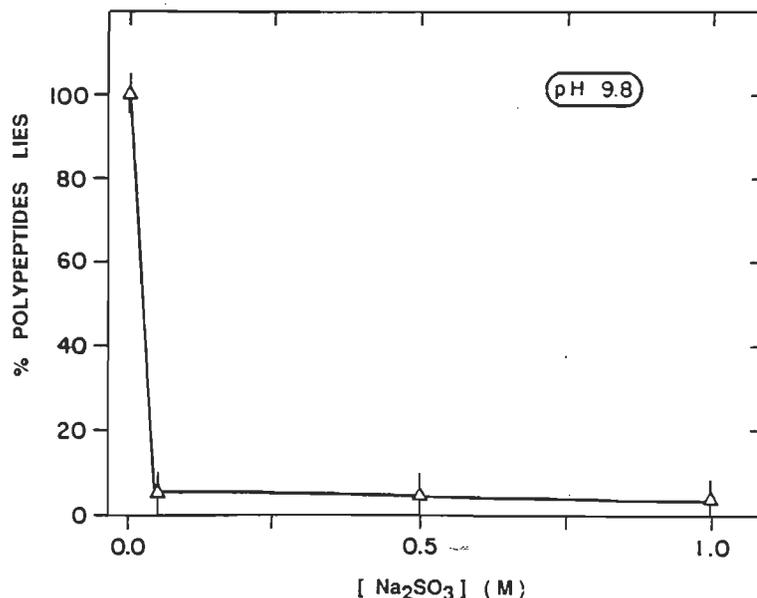


Figure 28. Effet de la concentration de sulfite de sodium sur l'enlèvement de la protéine de 33 kDa.

En conclusion, il se peut qu'en plus des ponts hydrogène, il existe une autre force de liaison entre le PSII et la protéine de 33 kD qui pourrait être de nature électrostatique. Cependant, l'étude présentée n'apporte pas de support à l'existence de forces hydrophobiques tel que proposée antérieurement (Murata et coll., 1983).

Le bris de ponts S-S dans la protéine de 33 kDa par le sulfite est peut être-réel. Cependant, il semble que le titrage des ponts hydrogène est le facteur limitant pour le largage de la protéine. L'effet du sulfite sur les polypeptides n'a pu être détecté à des concentrations inférieures à 25 mM. Ceci indique que le largage des polypeptides du CDO par le sulfite de sodium n'est peut-être pas la cause de l'inhibition du PSII observé en section 3.1.1. à des concentrations inférieures. Cependant, il est

possible qu'un effet discret non-déecté par électrophorèse existe. Si tel est le cas, l'effet du sulfite sur le PSII serait localisé au niveau du CDO lui-même, en accord avec un rapport récent (Metzner 1987).

### 3.2. Effets du sulfate sur le photosystème II:

3.2.1. Inhibition du dégagement d'oxygène du photosystème II par l'ion sulfate: Les sites d'action du sulfate au niveau de la membrane photosynthétique ne sont pas encore bien identifiés, bien que l'on sache que cet ion peut entraver l'activité du chloroplaste (Silvius et coll., 1975; Marques et Anderson 1986). Certains résultats indiquent que le PSII pourrait être affecté par le sulfate (Sandusky et coll., 1983; Sinclair 1984). Dans cette section, une investigation de la nature de l'effet du sulfate sur le PSII est présentée. Les questions suivantes seront étudiées: 1- est-ce que le PSII est sensible au sulfate? 2- si oui, quels sont les sites d'inhibition? et 3- est-ce que le sulfate peut induire un effet sur la structure du PSII?. En intégrant les résultats présentés avec les connaissances publiées par d'autres chercheurs, il sera possible de conclure que l'effet du sulfate sur le PSII peut être une conséquence de l'effet du  $SO_2$  sur la photosynthèse des plantes.

Pour les expériences présentées ici, des MEPSII préparées tel qu'indiqué au chapitre 2 seront employées. Pour les traitements, 200  $\mu$ g en chl de MEPSII seront suspendus dilués dans 1 ml de solution de traitement

comprenant: 0.4 M sucrose, 40 mM Mes (pH 6.0), 0.1 % digitonine et différentes concentrations de sulfate de sodium. Dans certaines expériences, 10 mM  $\text{CaCl}_2$  ont été ajoutés à la solution de traitement. Après 5 heures d'incubation à 25°C, sans agitation, les MEPSII furent centrifugées et diluées dans un milieu sans sulfate. Exactement 1 min avant les mesures, les échantillons ont reçu 1 mM  $\text{CaCl}_2$ . Ceci permet de normaliser la teneur en calcium et en chlorure pendant la mesure, ce qui pourrait être faussé par les traitements. Le dégagement d'oxygène et l'analyse de la composition en polypeptides par électrophorèse sont exécutés comme présenté au chapitre 2.

Après le traitement au sulfate de sodium en présence ou non de chlorure de calcium, l'activité en dégagement d'oxygène a été mesurée et mise en graphique à la figure 29. La présence de  $\text{CaCl}_2$  pendant le traitement au sulfate protège l'activité du PSII, en dépit d'une concentration cinq fois plus élevée de sulfate (10 mM  $\text{CaCl}_2$ ). En absence de chlorure de calcium, l'effet du sulfate sur le dégagement est évident, laissant environ 40 % de l'activité d'origine quand 50 mM sulfate fût utilisé. L'effet d'une faible illumination (1 mW/cm<sup>2</sup>) sur le traitement au sulfate est montré en figure 30. Les résultats montrent l'effet stimulant de la lumière sur l'inhibition du PSII par le sulfate. En présence de 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , environ 15 % de l'activité est perdue, comparé au contrôle, tandis qu'en absence de chlorure de calcium, l'activité en dégagement

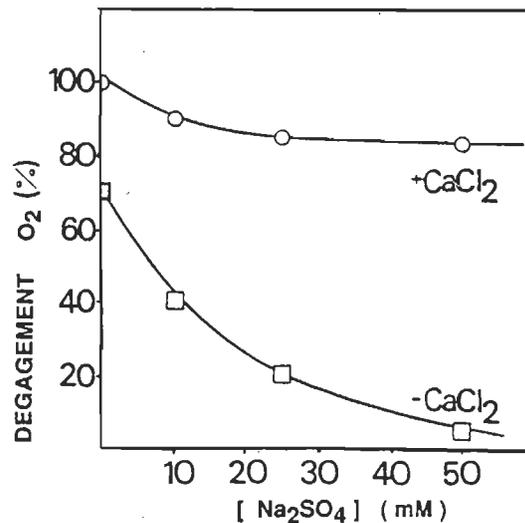


Figure 29. Inhibition de l'activité en dégagement d'oxygène du PSII par le sulfate de sodium en obscurité.

d'oxygène est pratiquement annulée, ce pour un traitement avec 50 mM sulfate de sodium.

Afin de localiser le(s) site(s) d'effet du sulfate sur les composantes du PSII, une étude de la composition en polypeptides des MEPSII a été réalisée. La figure 31 montre les densitogrammes des patrons d'électrophorèses obtenus des échantillons traités au sulfate de sodium. Le profil polypeptidique de l'échantillon contrôle (0 mM sulfate) est en partie A, tandis que l'échantillon traité avec 50 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> est montré à la partie B de la figure. La comparaison des deux profils permet de constater une perte relative des polypeptides de 23 et 18 kD induite par le traitement au sulfate de sodium. Etant donné que ces polypeptides sont régulateurs pour l'oxydation de l'eau, il semble que l'inhibition de l'activité observée par dégagement d'oxygène pourrait être due à un effet du sulfate de sodium sur le CDO. Le tableau 2 montre la

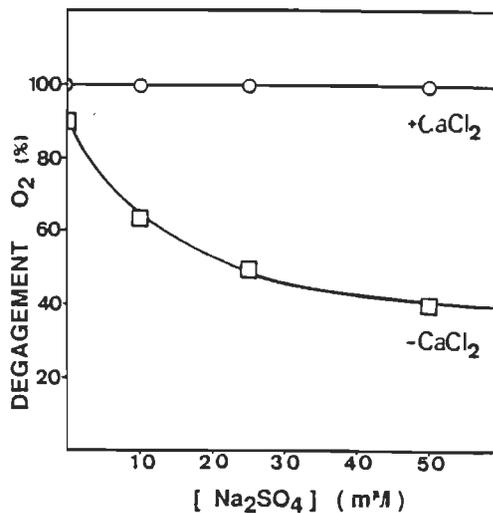


Figure 30. Inhibition de l'activité du PSII par le sulfate de sodium sous illumination.

quantité relative de protéines de 23 et 18 kD restées liées au PSII après traitement avec diverses concentrations de sulfate de sodium. Tel que décrit, la perte des polypeptides n'a pas été détectée lorsque le traitement au sulfate de sodium ne comprenait que 10 mM sulfate. Puis, comme la concentration passe à 25 mM l'enlèvement des protéines devient évident, étant plus sévère dans le cas du polypeptide de 18 kD. Aucun changement dans le pourcentage de protéines larguées par le sulfate de sodium n'a été observé en présence de 10 mM CaCl<sub>2</sub> ou en présence de faible illumination (résultats non-montrés). Les résultats démontrent donc que l'enlèvement des protéines de 23 et 18 kD ne mène pas à une diminution du dégagement d'oxygène lorsque le CaCl<sub>2</sub> est présent pendant le traitement. L'effet de la lumière sur l'inhibition de l'activité du PSII

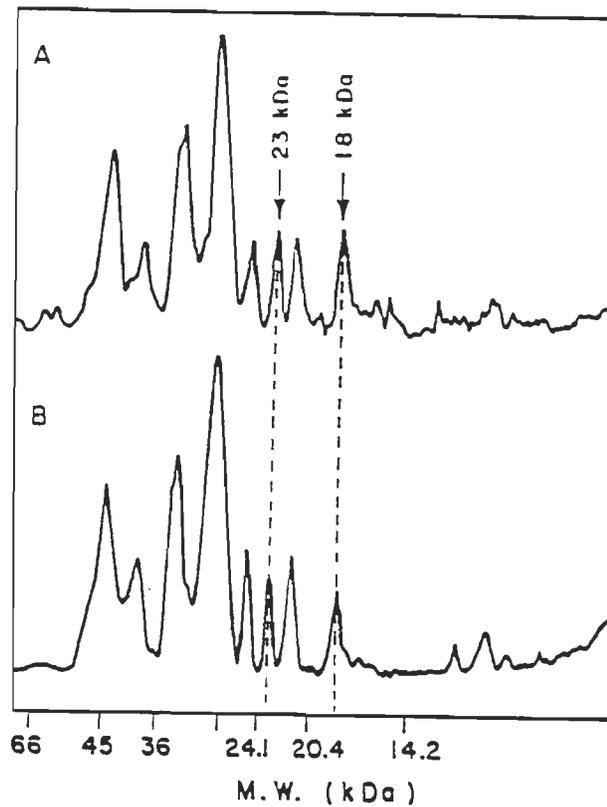


Figure 31. Densitogrammes des patrons de séparation des polypeptides des échantillons contrôles et traités avec 50 mM sulfate de sodium.

ne semble pas non plus être lié à la perte des protéines du CDO. La figure 32 permet de comparer l'inhibition de l'activité en dégagement d'oxygène et la perte des polypeptides de 23 et 18 kD. Tel qu'annoncé, il ne semble pas y avoir forte dépendance entre ces deux effets induits par le traitement au sulfate de sodium.

Dans cette étude, nous montrons que le sulfate de sodium inhibe l'activité du CDO du PSII. L'effet du sulfate sur l'activité du PSII est amplifiée par la lumière mais

Tableau 2

Effet de l'incubation au sulfate de sodium sur la quantité relative de protéines de 23 et 18 kDa liée au PSII.

Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (mM)	18 kDa (%)	23 kDa (%)
0	100	100
10	100	100
25	80	90
50	40	65

annulée par le chlorure de calcium. L'effet de la lumière sur la compétition d'anions avec le chlore pour des site(s) actif(s) dans le CDO a déjà été remarqué (Sandusky et coll., 1983; Sandusky et Yocum 1986). La protection du CaCl<sub>2</sub> provient peut-être d'un apport suffisant en chlorure pour contrer un effet de compétition du sulfate. Dans une étude récente, le rôle protecteur des chlorures pour l'activité en dégagement a été attribué à son influence sur la structure polypeptidique de CDO (Homann 1986). Il semble que la protection de l'activité du PSII par le CaCl<sub>2</sub> qui s'est révélée indépendante de la perte des polypeptides du CDO ne donne pas de support à cette interprétation.

Les résultats démontrent un enlèvement des polypeptides

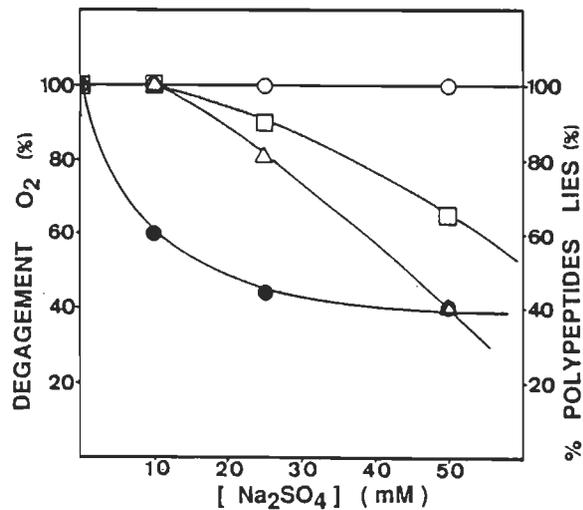


Figure 32. Comparaison de l'effet du sulfate sur l'activité en dégagement d'oxygène (mesuré en absence: ronds pleins ou en présence de CaCl<sub>2</sub>: ronds ouverts) et sur l'enlèvement des polypeptides de 23 (carrés) et 18 kDa (triangles) du PSII.

de 23 et 18 kD par un traitement dans 25 mM ou plus de sulfate de sodium. Ces deux sous-unités font partie du CDO et sont extrinsèques. On a démontré par le passé la possibilité de déloger ces protéines du PSII en utilisant de fortes concentrations de sels (Kuwabara et Murata 1982; Critchley 1985). on peut supposer que l'effet du sulfate de sodium observé ici soit dû à un simple effet d'écran ionique capable de briser les interactions électrostatiques qui lient ces sous-unités à la membrane. P. Homann publia un effet similaire du sulfate de sodium sur les polypeptides de 23 et 18 kD alors que le présent rapport était soumis dans App. Bioch. Biotechn.. P. Homann (1987a) a observé essentiellement le même effet du sulfate, cependant, l'inclusion de 10 mM chlorure lui permit de protéger la

perte, ce que nous n'avons manifestement pas observé ici. Etant donné que les polypeptides de 23 et 18 kD ont pour rôle de maintenir les ions chlorures près du PSII (Imaoka et coll., 1986; Anderson et coll., 1984), il en résulte que leur perte mène à une inhibition du CDO si des ions chlorures ne sont pas ajoutés dans la solution. L'effet protecteur du chlorure de calcium observé dans cette section indique que la perte d'activité induite par le sulfate est fondamentalement due à la perte d'ions fonctionnels plutôt qu'à l'enlèvement des polypeptides de 23 et 18 kD. Cependant, cette perte pourrait amplifier la sensibilité du PSII au sulfate.

Les conclusions tirées de cette série de mesures permettent de contribuer à la compréhension de certains faits expérimentaux relatifs à l'effet du SO<sub>2</sub> sur les plantes. Il a été observé que la fumigation des plantes au SO<sub>2</sub> mène à une augmentation du contenu cytosolique en sulfate difficilement réversible, même après l'arrêt des traitements (Brunold et coll., 1983; Chung 1983). Les chloroplastes isolés de telles plantes montrent une inactivité de leurs CDO (Shimazaki et coll., 1984). De plus, il a été démontré que l'addition de chlorure dans la solution d'incubation de chloroplastes inhibés par la fumigation au SO<sub>2</sub> mène au recouvrement de leur activité en dégagement d'oxygène (Miszalski 1983). En conséquence, nos résultats semblent indiquer que l'effet du sulfate sur le CDO du PSII observé ici peut être un des modes d'inhibition

du  $SO_2$  sur la photosynthèse des plantes in vivo.

3.2.3. Enlèvement des polypeptides de 23 et 18 kDa du PSII par le sulfate de sodium: En dépit des nombreuses recherches menées afin d'élucider le rôle des ions chlorures dans l'avancement des états S du dégagement d'oxygène, il n'y a toujours pas consensus quant à sa fonction précise (Critchley, 1985; Franzen et coll., 1985; Ghanotakis et coll., 1987). Le rôle des chlorures dans l'activité du PSII a été étudié récemment en utilisant un traitement au sulfate pour le retirer du CDO (Homann 1987b; Itoh et Uwano, 1986). On a rapporté que l'enlèvement de l'ion chlorure menait à l'inhibition du passage de l'état  $S_2$  à l'état  $S_3$  dans le cycle des états S du CDO (Itoh et coll., 1984; Theg et coll., 1984; Franzen et coll., 1985). En opposition, c'est la formation de l'état  $S_2$  lui-même qui serait inhibée selon d'autres chercheurs (Damoder et coll., 1986; DePaula et coll., 1986; Imaoka et coll., 1986; Ono et coll., 1986b, 1987). Dans la plupart de ces études, le sulfate a été utilisé pour réaliser l'enlèvement des chlorures du PSII. La façon de traiter les PSII avec le sulfate n'est pas chose à négliger. Il est bien connu que le traitement de MEPSII avec des concentrations élevées de sel peuvent perturber l'activité du CDO en causant le largage des protéines extrinsèques de 23 et 18 kDa (Govindjee et coll., 1985; Homann, 1987; Beauregard et coll., 1987; Beauregard et Popovic 1988). Il a été démontré que ces polypeptides ont un rôle à jouer dans le dégagement

d'oxygène et l'avancement des états S (Franzen et coll., 1985). Conséquemment, l'utilisation de sulfate pour l'enlèvement des chlorures peut avoir causé la perte de polypeptides du CDO et, selon les paramètres expérimentaux utilisés, causé plus ou moins de dommages au CDO. Dans cette section, l'effet des différents traitements au sulfate de sodium sur la structure du CDO et son activité sera étudié. Les expériences présentées dans cette section seront choisies pour répondre aux questions suivantes: 1- est-ce que l'enlèvement des polypeptides par le sulfate de sodium est significatif dans le cadre des expériences d'enlèvement des chlorures par le sulfate ? et 2- dans quelles conditions expérimentales le sulfate peut-il être utilisé pour l'enlèvement des chlorures, sans modifier la structure des PSII ?. Il sera démontré que le traitement au sulfate de MEPSII peut causer une perturbation importante du CDO et par conséquent provoquer une modification des propriétés des sites de ligation des chlorures.

Pour les expériences présentées dans cette section, les paramètres expérimentaux seront adoptés. Les MEPSII ont été isolées selon la méthode décrite au chapitre 2. Pour les traitements au sulfate, les MEPSII sont resuspendues à une teneur de 200 µg en chl dans 1 ml de solution de traitement comprenant: 0.4 M sucrose; 40 mM Mes (pH 6.5) ou 40 mM Hepes (pH 7.25) ou glycylglycine (pH 8.0) et différentes concentrations de sulfate de sodium. Après les traitements, les MEPSII ont été contrifugées dans 0.4 M sucrose, 40 mM

Mes (pH 6.0) et 0.1% digitonine. De façon à isoler l'effet de la perte des polypeptides de l'effet de l'enlèvement des chlorures, 10 mM  $\text{CaCl}_2$  furent ajoutés à la suspension 1 min avant la mesure de dégagement d'oxygène. L'activité en dégagement d'oxygène et la composition en protéines du PSII ont été analysées tel que décrit au chapitre 2.

Les résultats obtenus montrent hors de tout doute que l'incubation au sulfate de sodium provoque la modification du CDO. L'analyse des protéines des PSII traités avec différentes concentrations de sulfate est montrée en figure 33. La comparaison de la composition en polypeptides de l'échantillon contrôle (partie A) avec celle obtenue pour l'aliquot incubé dans 50 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (patron B) indique une perte des polypeptides de 23 et 18 kDa de l'ordre de 40 et 60 % respectivement. Lorsque le traitement s'est fait avec 250 mM sulfate, l'enlèvement de ces protéines fut quasi-total (densitogramme C). La figure 34 permet de voir la progression de la perte des polypeptides induite par l'augmentation de la concentration en sulfate de sodium dans la solution. On peut constater que l'effet du sulfate progresse rapidement jusqu'à la concentration de 100 mM où il ne reste que 30 et 13 % des protéines de 23 et 18 kDa liées au PSII. L'augmentation de 100 mM à 1 M de la teneur en sulfate ne provoque qu'une très faible perte de protéines supplémentaire. Un tel effet causé par le traitement des MEPSII avec le chlorure de sodium a été observé dans le passé (Govindjee et coll., 1985; Homann, 1987a). Notons que

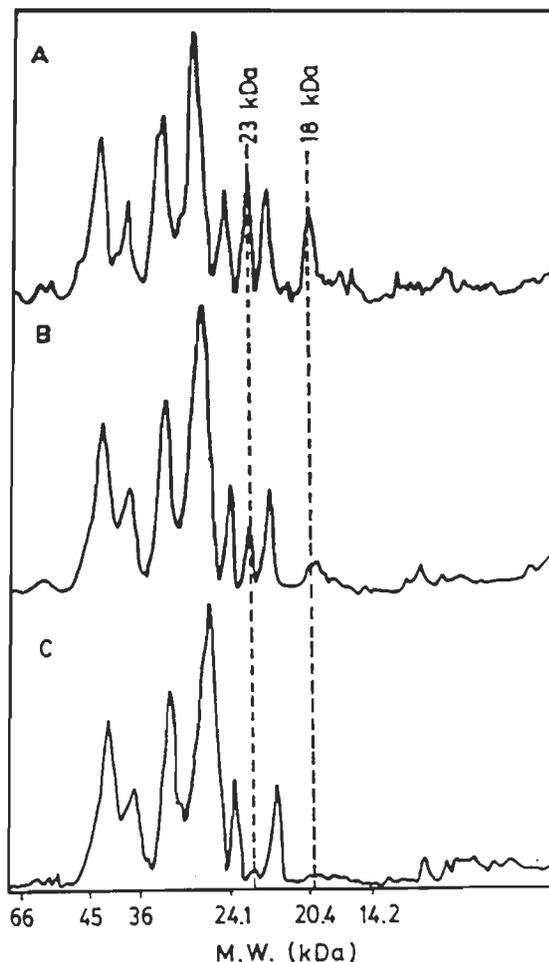


Figure 33. Enlèvement des polypeptides de 23 et 18 kDa par le sulfate de sodium à pH 7.25.

pour les PSII traités en présence de 1 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , il n'a été possible de détecter que seulement 40 % de l'activité en dégagement d'oxygène. L'effet du pH sur l'enlèvement des polypeptides de 23 et 18 kDa fait l'objet de la figure 35. On peut y constater que l'élévation du pH augmente la perte des protéines provoquée par le traitement. En fait, même en absence de sulfate de sodium, l'incubation des MEPSII dans une solution de pH 7.25 ou plus provoque

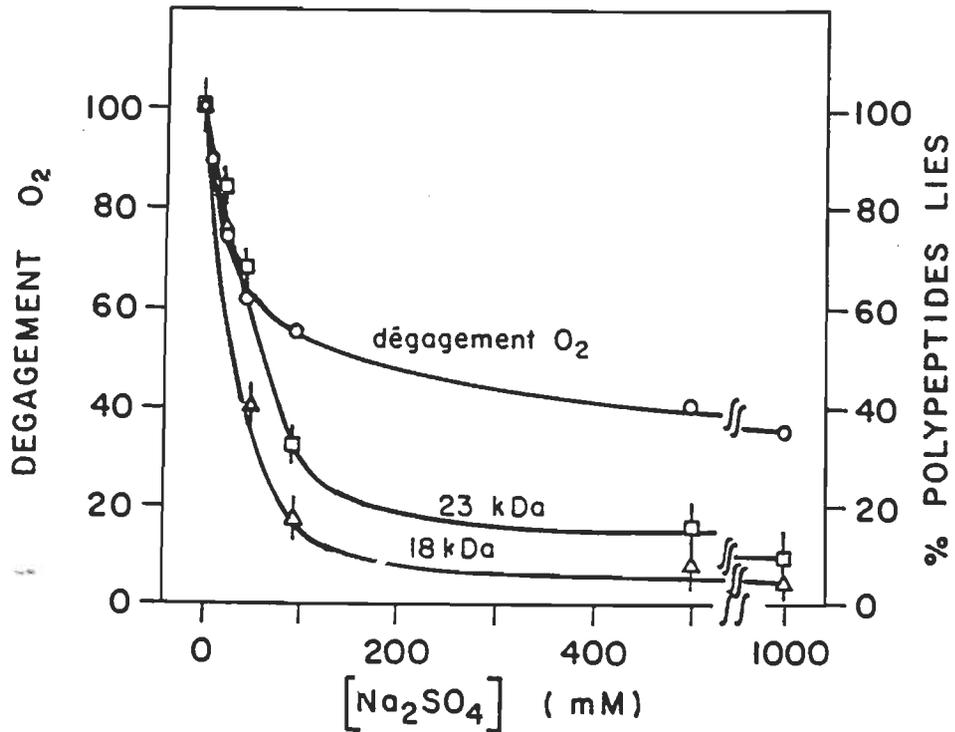


Figure 34. Effet de l'incubation au sulfate (pH 7.25) sur le dégagement d'oxygène et le contenu de protéine de 23 et 18 kDa des MEPSII.

déjà la perte d'au moins 10 et 18 % des protéines de 23 et 18 kDa respectivement, lorsque comparée à la composition des MEPSII après traitement à pH 6.5 (contrôle, 0 mM sulfate). Ces résultats sont en plein accord avec les travaux de Kuwabara et Murata (1983b) qui démontrent que les polypeptides du CDO sont plus labiles à pH alcalin. Cependant, les résultats présentés ici indiquent que l'utilisation d'une solution à pH relativement neutre (7.25) est suffisante pour provoquer la perte de polypeptides. La figure 36 révèle que l'activité en dégagement d'oxygène est elle aussi plus sensible à pH alcalin. Une perte de 18 % en activité d'origine a été décelée pour des MEPSII à pH 7.25,

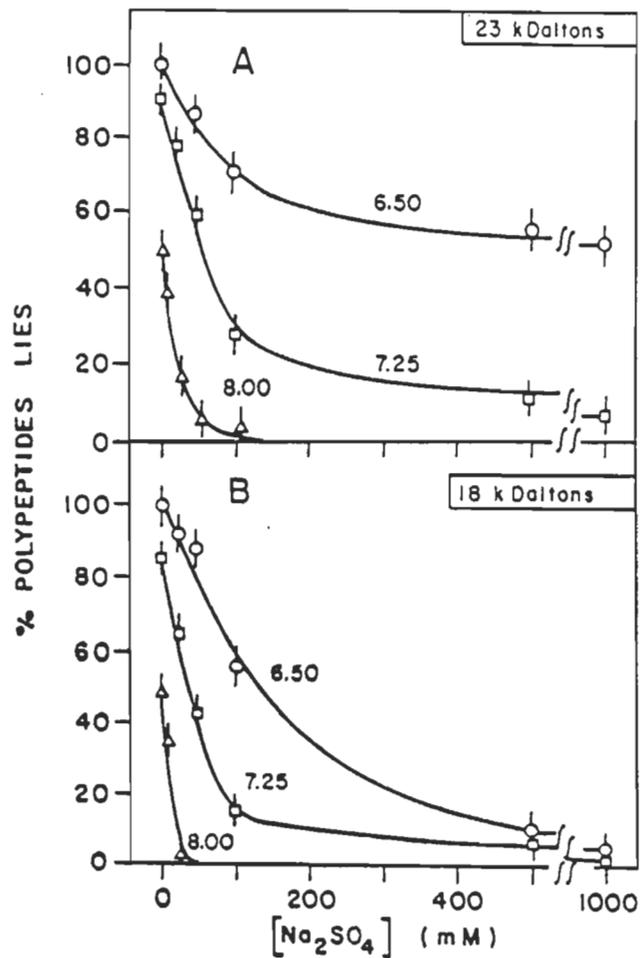


Figure 35. Effet du sulfate de sodium sur la proportion de polypeptides de 23 et 18 kDa liés au PSII à différents pH d'incubation.

et cette perte s'est accentuée en présence de sulfate de sodium.

Les résultats démontrant donc que l'incubation des MEPSII dans une solution de sulfate de sodium peut mener à la perte des protéines de 23 et 18 kDa. Etant donné que ce traitement a été utilisé dans le passé pour provoquer l'enlèvement des chlorures du PSII, il semble que dans certains cas, les chercheurs ont pu induire une modification considérable du CDO du PSII. C'est un fait bien connu que

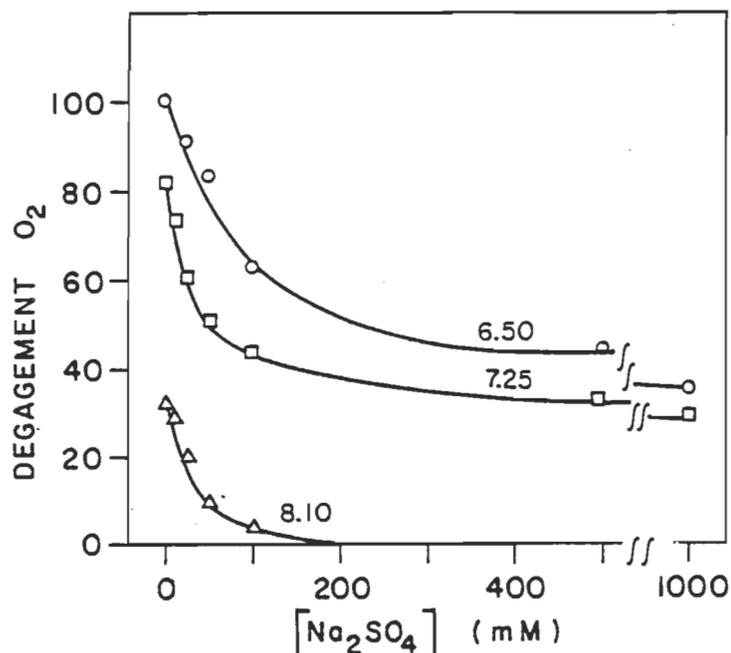


Figure 36. Effet du sulfate de sodium sur l'activité des PSII après incubation à différents pH.

la perte des protéines de 23 et 18 kDa conduit à une augmentation de la demande en chlorure par le CDO pour recouvrer l'activité d'origine (Critchley, 1985; Ghanotakis et coll., 1985; Govindjee et coll., 1985). Plus précisément, on a rapporté que la perte des ces polypeptides empêche la formation de l'état S<sub>2</sub> dans le cycle des états S (Blough et Sauer, 1984; Franzen et coll., 1985). Pour ces raisons, il semble que l'enlèvement des protéines de 23 et 18 kDa provoqué par l'utilisation de traitement au sulfate de MEPSII peut avoir faussé le comportement du CDO et provoqué l'obtention de résultats à la base du débat sur le rôle des chlorures dans l'avancement des états S (Critchley, 1985; Govindjee et coll., 1985; Ghanotakis et coll., 1987; Homann, 1987b). Les traitements au sulfate ont déjà été utilisés dans des conditions plutôt drastiques selon certains

rapports (50 mM sulfate de sodium, pH 7.5). Dans ce cas, l'enlèvement des chlorures a été interprété comme causant l'inhibition de la formation de l'état  $S_2$  (Imaoka et coll., 1986; Ono et coll., 1986b; Ono et coll., 1987). Malheureusement, aucun des rapports cités ne contient d'analyse de la composition en protéines des PSII traités. Les résultats montrés ici prouvent clairement que dans les conditions de traitement utilisées par ces chercheurs, une quantité non-négligeable de protéines de 23 et 18 kDa ont été larguées du PSII. Tel qu'expliqué plus haut, la perte de ces polypeptides est suffisante à elle seule pour empêcher la formation de l'état  $S_2$  (Franzen et coll., 1985).

Pour confirmer notre hypothèse, les conditions expérimentales utilisées par les chercheurs appuyant un rôle des chlorures dans la transition  $S_2-S_3$  ont été étudiées. Il semble que lorsque des concentrations de sulfate modérées (5 mM, pH 6.5) ont été utilisées, les résultats obtenus ont été interprétés en faveur d'un rôle des chlorures dans la transition  $S_2-S_3$  plutôt que dans la formation de l'état  $S_2$  comme tel (Franzen et coll., 1985; Volker et coll., 1985). Dans de telles conditions expérimentales nous n'avons pas détecté de perte de polypeptides. Conséquemment, la controverse relative à l'implication des chlorures dans l'avancement des états S pourrait bien être due à la modification relative du CDO induite par les traitements au sulfate utilisés pour

l'enlèvement des chlorures. En conclusion, je suggère que l'investigation des fonctions des chlorures dans l'activité du PSII requiert un contrôle soigneux de l'état du CDO, en particulier de sa composition polypeptidique. Cette précaution conduira certainement à une plus grande cohésion entre les différents résultats et conclusions relatives au rôle des chlorures dans le dégagement d'oxygène (Homann 1987b).

3.2.3. Effet du sulfate sur l'activité du PSII dans les thylacoïdes: Le sulfate inhibe le transport d'électrons dans le thylacoïde en diminuant l'activité des PSII (Sinclair 1984; Theg et coll., 1984). Les résultats présentés en sections 3.2.1. et 3.2.2. indiquent que le CDO est inhibé par l'incubation des MEPSII dans le sulfate et que le chlorure de calcium peut protéger le CDO. Cependant, les mesures de dégagement d'oxygène à elles seules ne permettent pas d'exclure d'autres sites d'inhibition du sulfate, ni de caractériser le mode d'inhibition. Les questions visées par la présente section sont les suivantes: 1- est-ce que l'inhibition de l'activité en PSII est comparable dans les thylacoïdes et dans les MEPSII ? 2- est-ce que le CDO est le seul site inactivé par le sulfate ? et 3- est-ce que le sulfate diminue graduellement l'activité de tous les PSII ou induit-il l'inhibition totale d'une partie de la population des PSII ?.

Les traitements au sulfate sont faits en absence de chlorure, tandis que l'échantillon contrôle contient 5 mM  $MgCl_2$ . Pour les mesures de fluorescence variable, les thylacoïdes sont resuspendus dans 5 mM  $MgCl_2$  2 min avant la mesure. Les mesures et calculs utilisées dans cette section sont détaillées au Chapitre 2.

Le tableau 3 démontre que le sulfate peut inhiber l'activité du PSII dans les thylacoïdes. On peut constater que le temps d'exposition des thylacoïdes est déterminant pour l'efficacité de l'inhibition par le sulfate. Ceci peut

Tableau 3

Effet du sulfate (50 mM) sur l'activité du PSII après différentes périodes d'incubation des thylacoïdes.

Temps d'incubation (min)	oxygène dégagé ( $\mu\text{mol/h mg Chl}$ )
0	210
2	166
5	110
30	58

suggérer que le sulfate doit pénétrer la membrane par diffusion. Ces observations ont été supportées par fluorescence variable. L'effet du traitement au sulfate (100 mM) sur la fluorescence variable des thylacoïdes est présentée en figure 37. Les thylacoïdes "contrôles" présentent une fluorescence variable typique. On peut y voir la petite montée de fluorescence initiale du niveau O (Fo) jusqu'à I (Fp1) suivie de l'augmentation plus lente mais plus prononcée de la fluorescence vers le niveau P (Fp). Les résultats indiquent que la montée O-I est peu modifiée après le traitement au sulfate. Cependant, il est évident que la montée de fluorescence au niveau P est ralentie pour les chloroplastes traités au sulfate de sodium (100mM sulfate, sans chlorure). Cet effet du sulfate sur la fluorescence

variable peut être interprété en faveur d'une inhibition du CDO par les ions sulfates. Une baisse du niveau P a aussi été observée pour des thylacoïdes après inhibition de leurs CDO par des méthodes spécifiques (Akerlund et coll., 1982; Schreiber et Neubaer 1987). La figure 37 montre aussi l'effet protecteur des chlorures devant l'inhibition par le sulfate (100 mM). L'addition de 40 mM chlorure de sodium s'est révélée suffisante pour contrer la baisse de la montée de fluorescence I-P par 100 mM sulfate. Cet effet protecteur des chlorures sur l'effet du sulfate est démontré ici par fluorescence variable pour la première fois, en accord avec l'idée de compétition entre les chlorures et les sulfates pour les sites de l'ion chlorure dans le CDO (Itoh et Uwano, 1986). Les résultats présentés dans la figure 37 indiquent que le taux de réduction de l'accepteur primaire dans le PSII est réduit par le traitement au sulfate. Cette observation et la protection apportée par l'addition de chlorures confirment le concept de la compétition du sulfate et des chlorures pour les sites de liens sur le CDO (Itoh et Uwano, 1986). Nous avons observé que la montée I-P de fluorescence variable est en corrélation avec la capacité de dégagement d'oxygène dans les thylacoïdes (non-montré), en accord avec des rapports précédents (Schreiber et Neubaer 1987; Akerlund et coll., 1982). La figure 38 montre le patron d'oscillation de la production d'oxygène pour les thylacoïdes contrôles (carrés) et traités avec 100 mM sulfate (cercles). Les deux courbes sont

La figure 38 montre le patron d'oscillation de la

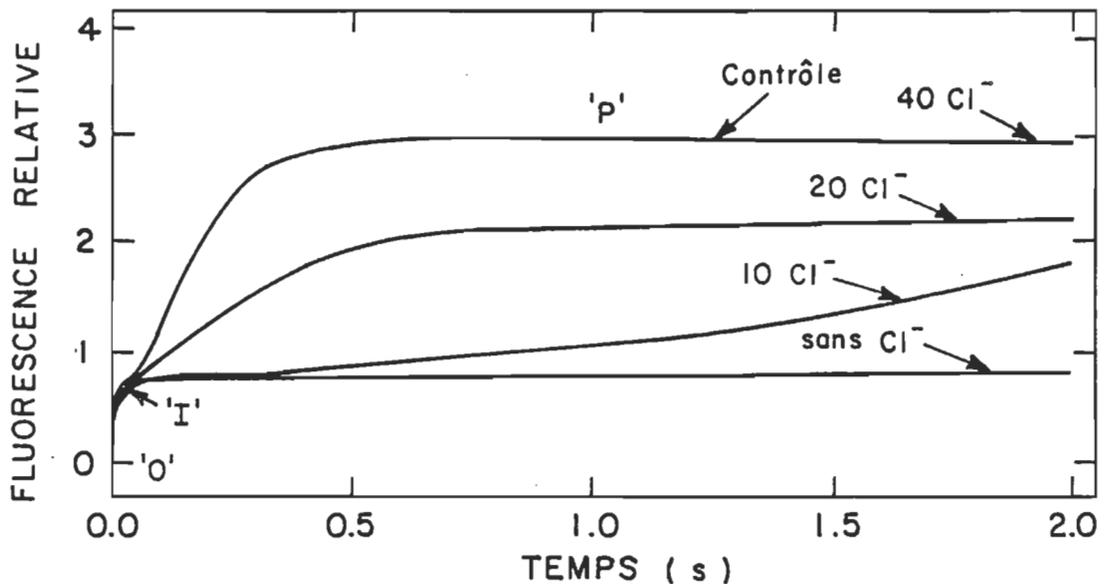


Figure 37. Fluorescence normalisée de thylacoïdes

traités avec 100 mM sulfate et avec différentes concentrations de chlorure de sodium. Les numéros indiquent la concentration en mM chlorure.

production d'oxygène pour les thylacoïdes contrôles (carrés) et traités avec 100 mM sulfate (cercles). Les deux courbes sont caractérisées par la même patron d'oscillation mais sont différenciées par une intensité de production d'oxygène inférieure pour les thylacoïdes traités avec 100 mM sulfate. Ceci peut indiquer que la proportion des ratés et de double-transitions est inchangée par le traitement. Une valeur égale de 13.5 % de manquements a été calculée selon la méthode exposée précédemment (Thibault 1978). Ceci indique que le mécanisme d'oxydation de l'eau dans les PSII capables de dégagement d'oxygène n'est pas modifié par le sulfate. La baisse de rendement en dégagement d'oxygène serait donc attribuable à la inhibition complète d'une partie de la population des PSII. Cette interprétation est en accord avec des travaux précédents par lesquels on a proposé que le

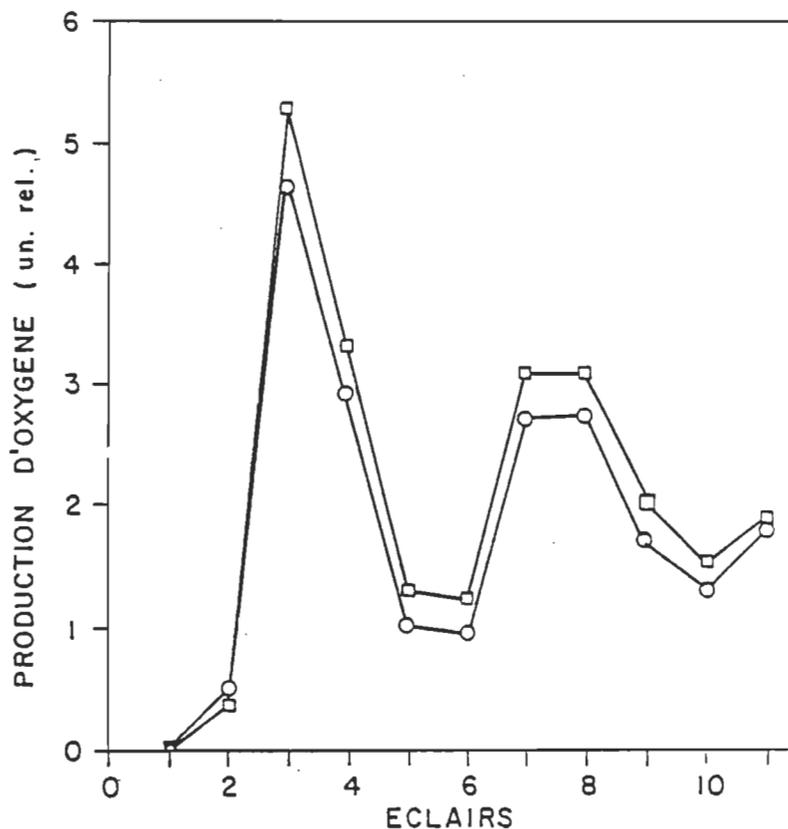


Figure 38. Effet de l'incubation dans 100 mM sulfate sur le dégagement d'oxygène induit par éclairs dans les thylacoïdes.

sulfate conduit à un blocage du transport d'électron dans les PSII (Sinclair 1984; Theg et coll., 1984) plutôt qu'à une diminution progressive de l'activité dans tous les PSII.

Les résultats montrés dans cette section indiquent que le sulfate inhibe les PSII du côté intérieur du thylacoïde, au niveau du CDC. L'inhibition observée semble bien due à la compétition du sulfate pour les sites des chlorures, en accord avec les résultats précédents (Itoh et Uwano 1986; Beauregard

et coll., 1987). Les chlorures activeraient un CDO d'une manière totale, c'est-à-dire non-progressive. La baisse de fluorescence variable causée par l'incubation au sulfate indique que ce dernier n'a aucun effet sur le côté réducteur du PSII. Il existe en effet un site sensible aux anions situé entre Qa et Qb à la surface externe du thylacoïde (Jursinic et Stemler 1988). Ce site est le site de fixation du bicarbonate (Govindjee et Eaton-Rye 1986). L'inhibition du transport d'électrons à ce niveau entraîne une plus grande proportion de centres réactionnels fermés donc fluorescents (Schatz et Holzwarth 1986). Les résultats de la figure 38 montrent que le sulfate mène à un abaissement de la fluorescence variable ce qui indique que l'effet du sulfate s'exerce du côté du CDO.

Les résultats montrés au tableau 3 ont aussi une importance capitale pour la thèse présentée. On peut conclure de cette figures que l'effet du sulfate sur le PSII dans les thylacoïdes dépend soit du temps d'incubation soit de la concentration utilisée. Même si les concentrations de sulfate utilisées dans cette recherche sont parfois élevées, on ne peut conclure que les résultats obtenus n'ont pas de valeur "pratique". Ce qui importe, c'est la concentration de sulfate à proximité de son site d'effet, difficile à évaluer et qui dépend de plusieurs facteurs.

3.2.4. Effet de l'ion sulfate sur l'activité photochimique des photosystèmes II a et b: L'existence de deux formes de PSII a été proposée pour expliquer la nature biphasique des courbes de fluorescence variable mesurées dans des chloroplastes traités au DCMU (Melis et Homann 1974). Ces deux types de PSII, appelés a et b seraient

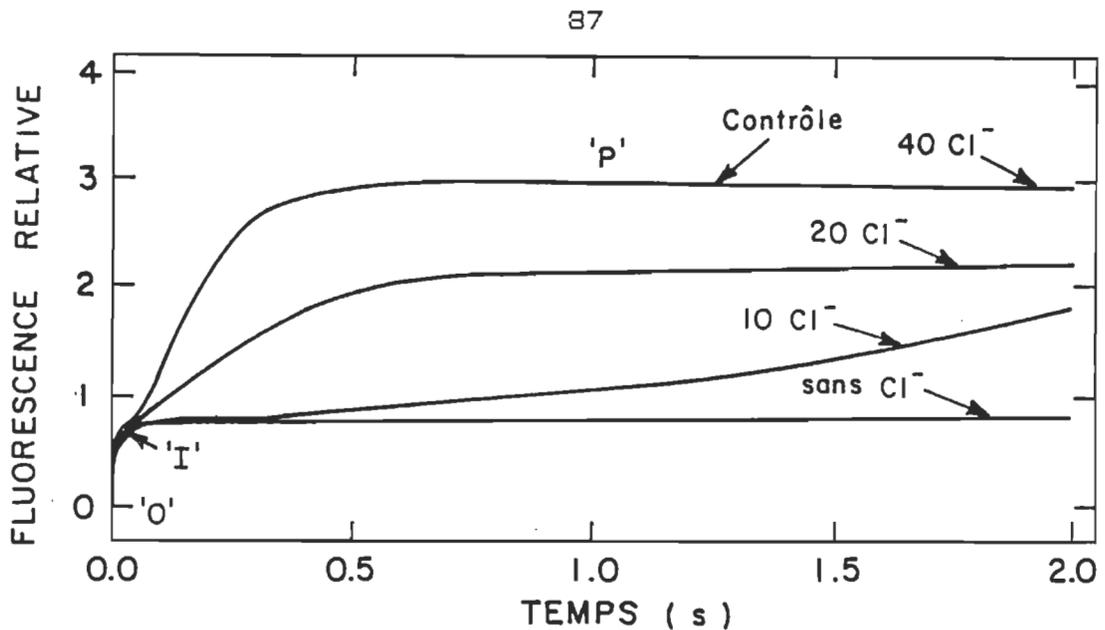


Figure 37. Fluorescence normalisée de thylacoïdes traités avec 100 mM sulfate et avec différentes concentrations de chlorure de sodium. Les numéros indiquent la concentration en mM chlorure.

production d'oxygène pour les thylacoïdes contrôles (carrés) et traités avec 100 mM sulfate (cercles). Les deux courbes sont caractérisées par la même patron d'oscillation mais sont différenciées par une intensité de production d'oxygène inférieure pour les thylacoïdes traités avec 100 mM sulfate. Ceci peut indiquer que la proportion des ratés et de double-transitions est inchangée par le traitement. Une

peuvent dégager de l'oxygène dans certaines conditions (Jursinic 1979; Graan et Ort 1986); et on a trouvé dans les thylacoïdes des granums et du stroma une proportion de polypeptides du CDO proportionnelle à la population de PSII présent dans ces régions (Vallon et coll., 1985; Masojidek et coll., 1987). D'autre part, il semble que certaines différences entre l'activité des CDO a et b existent puisque: le transport d'électrons entre le donneur Z et P680 est plus lent dans le PSIIb que dans le PSIIa (Melis et Homann 1976); la fluorescence du PSIIb évaluée en présence de DCMU est peu modifiée quand le CDO est inhibé par l'hydroxylamine contrairement au PSIIa (Melis 1985); la contribution du PSIIb à la fluorescence est augmentée dans des chloroplastes ayant une activité de dégagement d'oxygène amoindrie, alors que celle du PSIIa est diminuée (Horvath et coll., 1987); et il fut proposé que la région des granums (où les PSIIa sont concentrés) était l'endroit préférentiel où les protons sont relâchés après l'hydrolyse de l'eau (Anderson et Melis 1983).

La plupart des travaux cités contiennent une analyse de la photochimie des deux PSII dans des chloroplastes traités au DCMU. Cette approche a été critiquée (Hodges et Barber 1986) et maintenant, une méthode d'analyse pour des chloroplastes non-traités a été proposée. Selon Melis et coll. (1985) la montée O-I de la fluorescence variable serait attribuable à la photochimie des centres b alors que la montée D-P représenterait la réduction du

bassin de plastoquinones par le PSII<sub>a</sub>. Le but de cette section est d'étudier : 1- la sensibilité de la photochimie des PSII<sub>a</sub> et b au sulfate; et 2- le niveau de similarité des CDO des deux types de PSII en rapport avec le rôle des chlorures. Les expériences présentées dans cette partie ont été exécutées avec des chloroplastes isolés tel que décrit au Chapitre 2. Les traitements au sulfate de sodium consistent en une incubation de 2 heures à une température de 0-4°C avec agitation faible dans une solution comprenant: 0.33 M sorbitol, 10 mM Hepes (pH 7.5), et différentes concentrations de sulfate de sodium. Lorsque spécifié, le chlorure de sodium sera lui aussi présent dans la solution de traitement. Après les traitements, les chloroplastes ont été resuspendus dans la solution de mesure: 0.33 M sorbitol, 10 mM Hepes. (pH 7.8) et 5 mM MgCl<sub>2</sub>. Le temps de séjour des chloroplastes dans cette solution est de 5 min avant les mesures, ce qui est trop court pour rétablir l'activité du CDO par les chlorures. Les mesures d'activité en dégagement d'oxygène sont réalisées tel que décrit au Chapitre 2. Les mesures de fluorescence variable sont faites aussi en accord avec le chapitre 2. Pour l'investigation en présence de DCMU, les chloroplastes ont été incubés avec 25 µM DCMU 2 min avant la mesure de fluorescence.

L'effet des traitements au sulfate sur la fluorescence variable des thylacoïdes est présenté en figure 39. Les thylacoïdes "contrôles" présentent une fluorescence variable

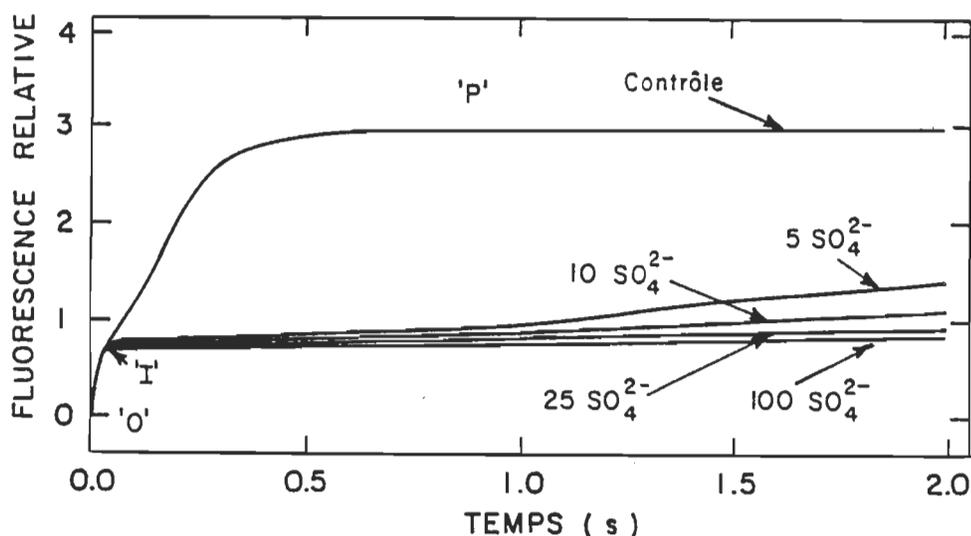


Figure 39. Effet du sulfate sur la fluorescence normalisée de thylacoïdes mesurée en absence de DCMU. Les numéros indiquent la concentration en mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

typique, comprenant la petite montée de fluorescence initiale du niveau O (Fo) jusqu'à I (Fp1) suivie de l'augmentation plus lente mais plus prononcée de la fluorescence vers le niveau P (Fp). Les résultats indiquent que la montée O-I est peu modifiée après le traitement au sulfate. Cependant, il est évident que la montée de fluorescence au niveau P est ralentie pour les chloroplastes traités au sulfate de sodium. A 100 mM sulfate, seul le niveau I demeure tandis que le niveau P est disparu. Ceci indique que la réduction du bassin des plastoquinones est ralentie par le traitement au sulfate. Etant donné que les PSIIa sont principalement responsables de la réduction du bassin des PQ (représentée par la montée D-P), la figure 39

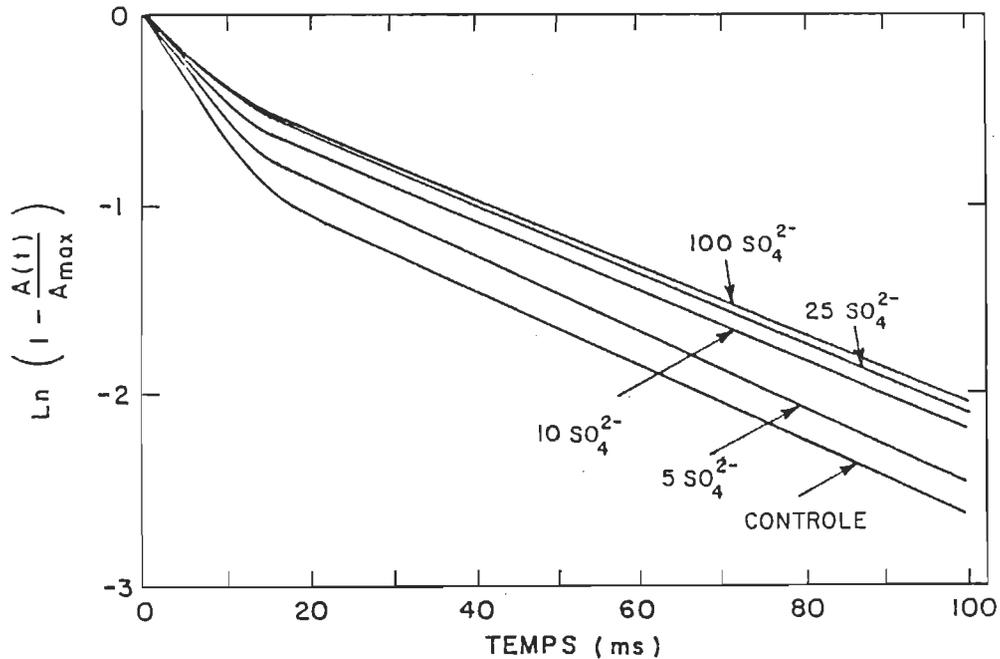


Figure 40. Graphique semi-logarithmique de l'accroissement de l'aire au-dessus de la courbe de fluorescence enregistrée en présence de DCMU pour des chloroplastes traités avec le sulfate de sodium. Les numéros indiquent la concentration en mM de sulfate.

indique que le sulfate a un effet sélectif sur le  $\text{PSIIa}$  (montée D-P). La photochimie des  $\text{PSIIb}$  (transient O-I) semble peu affectée par le sulfate. La fluorescence variable des thylacoïdes en présence de DCMU a été analysée. La figure 40 montre l'analyse semi-logarithmique de l'accroissement de l'aire au-dessus de la courbe d'induction mesurée en présence de DCMU. Tel qu'observé auparavant, on peut discerner deux phases distinctes: la phase rapide associée à l'activité photochimique des  $\text{PSIIa}$  et la phase

lente, associée à la réduction des accepteurs primaires dans le PSII<sub>b</sub> (Melis et Homann 1976; Melis 1985). Le traitement au sulfate provoque une baisse de la contribution de la phase a à la fluorescence émise i.e. un nombre de Q<sub>a</sub> réduit par les centres a inférieur. La pente du transient lent (K<sub>b</sub>) semble peu affectée par les traitements. L'intersection extrapolée de la phase lente sur l'ordonnée à temps 0 (B<sub>max</sub>) donne une indication de la contribution relative des deux PSII à la fluorescence totale émise (Percival et coll., 1984; Melis et Homann 1978). Cette intersection est diminuée par les traitements au sulfate ce qui indique une participation moins importante des PSII<sub>a</sub> à la fluorescence.

Le tableau 4 montre les paramètres évalués des mesures de fluorescence en présence de DCMU et l'activité en dégagement d'oxygène pour les thylacoïdes traités au sulfate de sodium. Tel que cité plus haut, l'augmentation de la teneur en sulfate mène à une augmentation de B<sub>max</sub>. La photochimie des PSII<sub>b</sub> semble peu affectée même par le traitement avec 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Ceci indique que la perte d'activité en dégagement d'oxygène est due principalement à une baisse d'activité photochimique des PSII<sub>a</sub>. Cependant, les K<sub>a</sub> évalués après soustraction de la phase b (tel que détaillé dans Owens 1986) sont plutôt constants. Il semble donc que les PSII<sub>a</sub> non-inhibés par le sulfate (et qui participent toujours à l'émission de fluorescence variable) sont actifs au taux d'origine. Les résultats supportent donc un rapport précédent stipulant que

Tableau 4

Paramètres fonctionnels de l'activité des PSII<sub>a</sub> et <sub>b</sub> dans les thylacoïdes traités avec le sulfate.

Traitement	Dégagement d'O <sub>2</sub> (%)	K <sub>a</sub> (ms <sup>-1</sup> )	K <sub>b</sub> (ms <sup>-1</sup> )	E <sub>max</sub> (%)
Contrôle	100	215	20	55
5 mM sulfate	75	230	20	70
10 mM sulfate	55	185	19	78
25 mM sulfate	40	200	19	80
100 mM sulfate	25	205	17	82
100 mM sulfate + 40 mM chlorure	100	205	20	57

la baisse de réduction des Q<sub>a</sub> dans les PSII<sub>a</sub> mène à une baisse du dégagement d'oxygène (Melis 1985). De même, la faible baisse de K<sub>b</sub> observée ici est en accord avec l'observation antérieure que le PSII<sub>b</sub> est moins dépendant de l'activité en dégagement d'oxygène du PSII que l'est la phase a (Melis 1985).

L'effet du sulfate sur le PSII consiste à compétitionner avec les chlorures pour les sites du CDO (résultats de la section 3.2.3.; Itch et Uwano 1986). La prochaine série d'expérience vise à investiguer la photochimie des PSII<sub>a</sub> et <sub>b</sub> en présence de sulfate et de

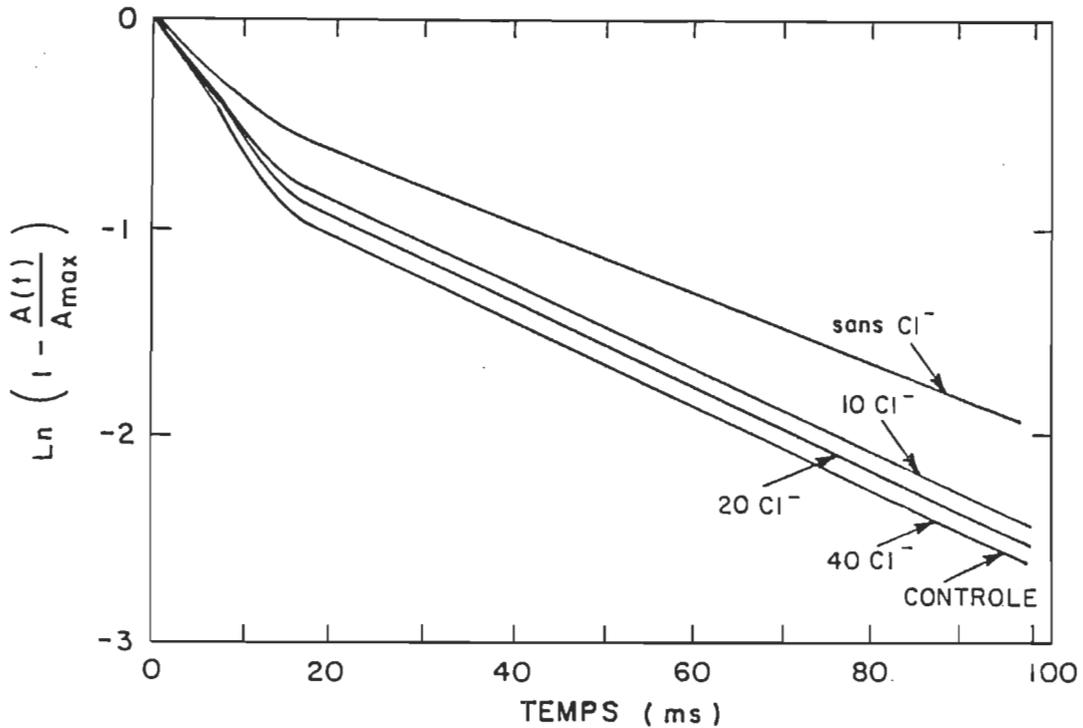


Figure 41. Graphique semi-logarithmique de l'accroissement de l'aire au-dessus des courbes de fluorescence mesurées en présence de DCMU après traitement avec 100 mM sulfate et différentes concentrations de chlorure de sodium. Les numéros indiquent la concentration de chlorure en mM.

chlorures. L'effet de la compétition sulfate-chlorures a aussi été investigué par l'analyse de la croissance de l'aire au dessus des courbes d'induction de fluorescence mesurées dans des chloroplastes traités au DCMU. La figure 41 révèle que le chlorure de sodium empêche la baisse de la phase  $\alpha$  et la très faible diminution de  $K_b$ . Quand 40 mM chlorures sont présent pendant le traitement au sulfate, le dégagement d'oxygène,  $B_{max}$  (donc la contribution du  $PSII\alpha$ ) et

$K_b$  sont tous préservés à leur valeur contrôle (Tableau 4). Ceci démontre une fois de plus que la photochimie du PSII<sub>a</sub> est intimement liée au dégagement d'oxygène détecté. Bien que les résultats montrent un effet protecteur pour  $K_b$ , il reste que l'amplitude de l'effet est bien inférieur à celui noté pour le dégagement d'oxygène.

Les résultats présentés dans cette section indiquent que le taux de réduction du bassin de plastoquinones par les PSII est diminué par le traitement au sulfate. Si le PSII<sub>a</sub> est seul responsable de la réduction des PQ membranaires (Graan et Ort 1986; Melis 1985), alors l'étude présentée indique que la photochimie des PSII<sub>a</sub> est plus affectée par le sulfate que l'est celle du PSII<sub>b</sub>. L'analyse de l'accroissement de l'aire au dessus des courbes d'induction de fluorescence a démontré que les PSII<sub>a</sub> et <sub>b</sub> étaient sensibles au sulfate à un degré différent. Il est évident que l'activité en dégagement d'oxygène dépend beaucoup plus de la photochimie des PSII<sub>a</sub> et de son inhibition par le sulfate que des PSII<sub>b</sub>. Le taux de réduction des PSII<sub>b</sub> évalués en présence de DCMU s'est montré peu affecté par le sulfate et son inhibition du dégagement d'oxygène. Des études précédentes démontrant le peu de dépendance entre le  $K_b$  et l'activité générale du PSII est d'ailleurs en accord avec notre présente étude (Melis 1985; Melis et Harvey 1981). En considérant l'intégration des résultats présentés ici avec les données publiées précédemment, nous proposons que l'activité en dégagement d'oxygène dépend

principalement de l'activité en PSII<sub>a</sub>. Ce postulat est aussi supporté par le fait que le PSII<sub>b</sub> a un nombre de pigments antennes et une activité photochimique inférieure à celle du PSII<sub>a</sub> (Percival et coll., 1984; Renger et Schulze 1985).

En conclusion, les résultats indiquent que l'activité photochimique des PSII<sub>a</sub> est sensible à l'inhibition du CDO par le sulfate. Cependant, il semble que les PSII<sub>a</sub> qui ne contribuent plus à la fluorescence variable sont complètement arrêtés par le sulfate, tandis que l'autre partie des PSII<sub>a</sub> qui émet encore de la fluorescence variable malgré le sulfate possède un taux de réduction des Q<sub>a</sub> intact. La moindre sensibilité des PSII<sub>b</sub> détectés par les méthodes utilisées peut être due au faible transport d'électron dans les PSII<sub>b</sub>, ce qui peut diminuer l'impact apparent de l'inhibition de l'activité du CDO.

3.2.5. Réversibilité de l'inhibition du PSII par le sulfate dans l'algue marine Dunaliella bardawil: L'apport excessif de sulfate aux organismes marins photosynthétiques provoque une diminution de croissance qui peut aller jusqu'à la mort de l'organisme (Rennenberg 1984; Post 1977). L'algue marine Dunalliella est intéressante à ce niveau puisque cette espèce a des propriétés d'adaptation à la teneur en sulfate du milieu de croissance. Gimmler et Weiss (1987) publiaient récemment que l'algue Dunaliella parva pouvait se développer normalement dans une solution

contenant jusqu'à 500 mM sulfate. Des résultats similaires ont été obtenus précédemment pour l'algue Dunalliella marina (Leona et Strogonov 1985). Les cibles d'effet du sulfate et les mécanismes par lesquels les individus de ce genre résiste à de telles concentrations de sulfate sont peu connus à ce jour. Il a été proposé que la résistance des algues au stress ionique provenait d'une synthèse supplémentaire de glycérol dans le cytosol de façon à contrer la pression ionique et osmotique venant de l'excès de sel dans le milieu de croissance (Gilmour et coll., 1984).

L'accumulation de sulfate dans la cellule peut conduire à la présence excessive de sulfate dans le chloroplaste (Rennenberg 1984). Cet apport de sulfate dans le chloroplaste peut conduire à l'inhibition de la photosynthèse primaire par l'arrêt de l'activité du PSII (Itoh et Uwano 1986; Beauregard et coll., 1987; Beauregard et Popovic, 1988). Cet arrêt de la photosynthèse primaire peut évidemment suffir à causer la mort de l'organisme. D'autre part, une exposition des algues à un stress ionique aussi important (0.5 M) peut induire divers effets sur la physiologie des algues. Lorsque les algues sont exposées à un stress ionique, des changements dans la physiologie des algues ont été détectés au niveau du chloroplaste (Gilmour et coll., 1984; Gilmour et coll., 1985).

Dans les algues vertes, l'émission de fluorescence est une sonde efficace pour l'étude des facteurs tels que

l'intensité lumineuse, la température, les inhibiteurs, la concentration en ions, et différents stress (Bose 1982). De plus, la mesure de fluorescence variable peut être utilisée pour la détection rapide des effets de stress sur les organismes photosynthétiques (Krause et Weiss, 1984; Govindjee et Satoh, 1986; Samson et Popovic, 1988).

Dans cette section, l'effet de la concentration en sulfate sur la croissance de l'algue Dunaliella bardawil est investigué par l'analyse de la fluorescence variable, de l'émission de fluorescence à basse température, par dégagement d'oxygène et par mesure de croissance. La présente section vise à répondre aux questions suivantes: 1- est-ce que l'incubation des algues dans une solution concentrée en sulfate mène à l'inhibition du PSII ? 2- si oui, quelle est l'importance de cette inhibition pour l'état physiologique des algues ? et 3- est-ce que l'investigation de la sensibilité de l'appareil photosynthétique au sulfate peut confirmer ou infirmer l'hypothèse de Gilmour et coll. (1984) quant à un mécanisme possible de résistance dans les algues de type Dunaliella ? Les résultats de cette section démontrent que l'appareil photosynthétique de l'algue est touché à deux niveaux par les traitement au sulfate, mais que l'algue Dunaliella bardawil peut surmonter l'agression en dépit de concentrations élevées en sulfate (0.5-1.0 M).

Les algues Dunaliella bardawil proviennent de la collection du Dr. Ben-Amotz, Haifa, Israël. Les conditions de croissance sont énumérées au chapitre 2. Les algues ont

été exposées au sulfate de sodium lorsqu'en phase de croissance exponentielle et incubées jusqu'à 72 heures sous une illumination de 2000 lux à 25°C. Les cellules ont été dénombrées avec un compteur à culture, modèle ZF "particle counter" ayant un orifice de 100 µm. Les mesures de dégagement d'oxygène, de fluorescence variable ainsi que de spectrofluorimétrie à basse température ont été faites dans le milieu de traitement au sulfate, avec les techniques décrites dans le chapitre 2.

La croissance des algues a été mesurée après avoir augmenté la teneur en sulfate de 24 mM (contrôle) à 0.5, 0.75, 1.0 et 1.3 M. La figure 42 démontre que l'incubation dans 0.5 M (courbe B) et 0.75M (courbe C) pour 24 heures eut pour effet de diminuer légèrement la densité en cellules, tandis qu'après 72 heures, les algues semblent avoir repris un taux de croissance quasi normal (courbe contrôle: A). Lorsque la concentration en sulfate de sodium présente dans le milieu de croissance passait à 1.0 M, la croissance des algues fut sévèrement ralentie (courbe D), et la légère résistance des algues observée après 48 heures ne fut pas suffisante pour permettre à la culture de croître normalement dans de telles conditions. L'effet le plus spectaculaire fut sans contredit observable pour les algues incubées dans 1.35 M sulfate (courbe E). Dans ce cas, le nombre de cellules a chuté drastiquement après seulement 24 heures de traitement, sans rémission dans les jours suivants. Tandis que le nombre de cellules enregistré en

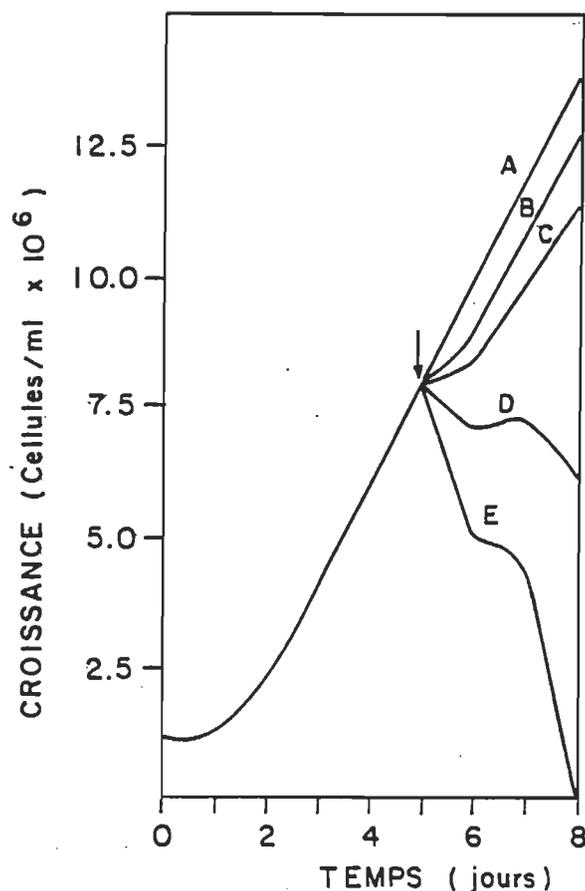


Figure 42. Effet de la concentration en sulfate sur la croissance des algues Dunaliella bardawil.

présence de 1.0 M sulfate était stabilisé, il semble que l'effet de 1.3 M sulfate est de provoquer la mort immédiate de la colonie. La résistance de l'algue à des concentrations de 0.5 M et 0.75 M sulfate de sodium que nous avons observée ici confirme les travaux du même genre avec les algues de l'espèce Dunaliella (Leonova et Strogonov, 1985; Gimmler et Weiss, 1987). Il fut proposé par Gimmler et Weiss (1987) que la résistance de Dunaliella parva était due à sa capacité de maintenir sa concentration interne en sulfate à un niveau stable. Une synthèse de glycérol plus

importante semble être un mécanisme utilisé dans les Dunaliella pour résister à de fortes concentrations de sel (Gilmour et coll., 1984). A des concentrations de 1.0 M et 1.3 M sulfate, nos résultats démontrent que la protection est inopérante et que la colonie ne peut se développer normalement ou s'éteint.

Le dégagement d'oxygène des algues s'est montré fidèle à leur taux de croissance. Après 24 heures de traitement dans 0.5 et 0.75 M, le dégagement d'oxygène mesuré était de 34% et de 26% de la valeur des algues contrôles. Après 72 heures, cette activité avait repris à 70% et 50%. Pour les autres traitements, le dégagement d'oxygène ne fut pas détectable et ce après 24 heures et plus d'incubation. Ces résultats indiquent donc que l'activité photosynthétique peut être une cible pour le traitement au sulfate de sodium. Cette possibilité a été investiguée par la mesure de fluorescence variable. La figure 43 montre une courbe typique de fluorescence variable mesurée dans les algues avant l'ajout de sulfate de sodium (courbe A). On peut y distinguer trois niveaux caractéristiques O, P, S (Krause et Weis 1984). La courbe B indique l'effet du traitement avec 0.75 M sulfate après 30 min d'incubation. L'intensité de fluorescence au niveau P est abaissée après un tel traitement. Vingt quatre heures d'incubation plus tard, cet effet était disparu et une montée de fluorescence variable comparable à celle enregistrée en absence de sulfate de sodium était détectée (courbe C). Les mêmes mesures furent

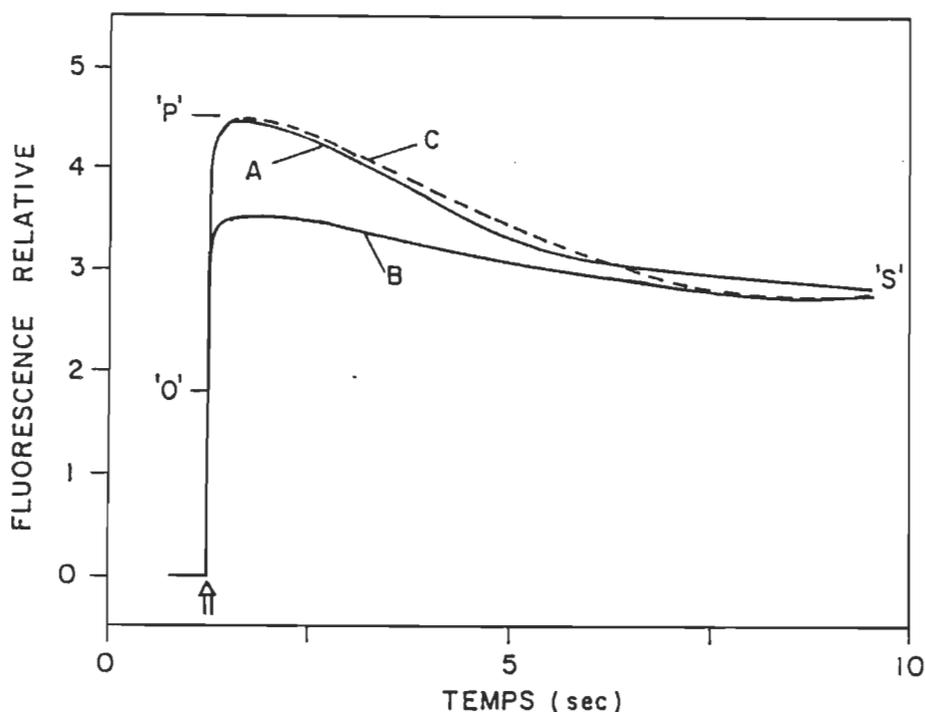


Figure 43. Recouvrement de la fluorescence variable des algues incubées dans 0.75 M sulfate de sodium.

faites pour tous les traitements et sont analysées en figure 44. La fluorescence au niveau P y est indiquée pour différents temps de traitements. Les résultats indiquent que la fluorescence variable est demeurée intacte pour les algues incubées dans 0.5 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (cercles). Dans le cas où 0.75 M sulfate était présent (hexagones), une baisse de fluorescence suivie d'une augmentation détectable après une heure fut enregistrée. Après 24 heures, la fluorescence variable était complètement rétablie. Un phénomène similaire s'est produit pour les algues incubées dans 1.0 M sulfate (carrés) excepté que le rétablissement de la fluorescence ne fut que partiel (60%). Finalement, la

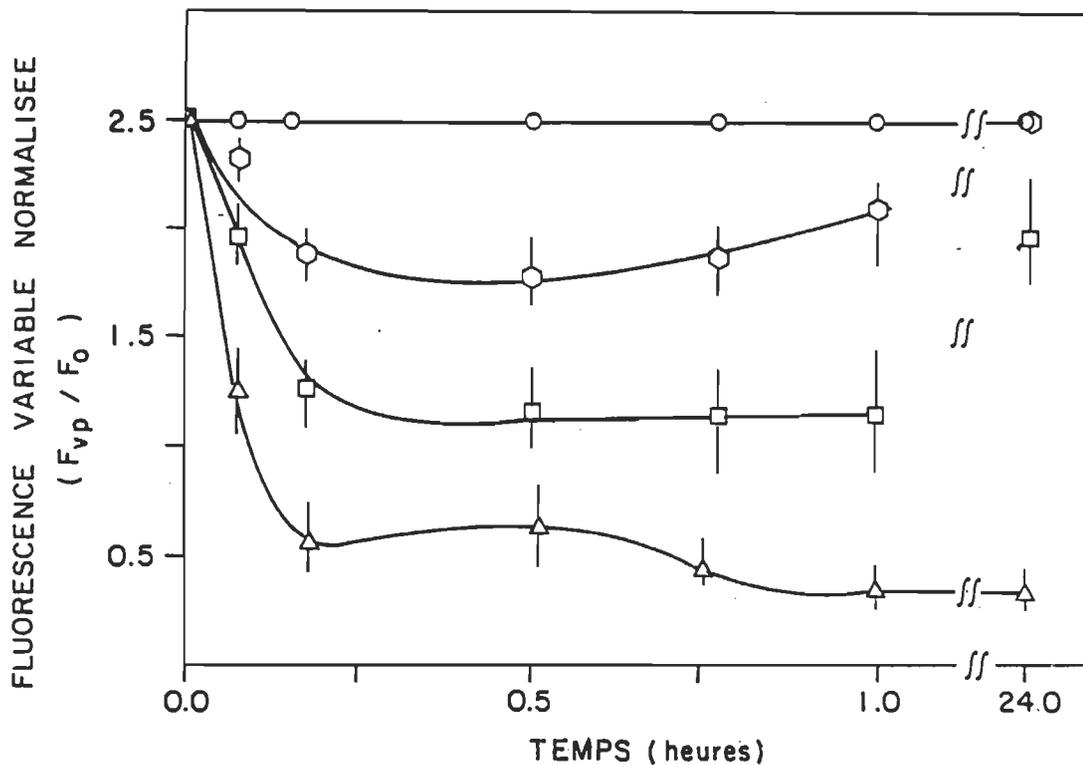


Figure 44. Effet de la concentration de sulfate de sodium sur la fluorescence au niveau P après différentes périodes d'incubation.

fluorescence variable détectée dans des algues traitées avec 1.3 M sulfate (triangles) est tombée rapidement à 15% de la valeur d'origine sans aucun changement.

La baisse de fluorescence variable au niveau P est due à l'impossibilité de réduire les accepteurs primaires dans les PSII (Govindjee et Satoh 1986). Un tel effet est généralement observé pour des PSII ayant une inhibition au niveau du CDO (Akerlund 1982; Schreiber et Neubauer 1987; résultats de la section 3.2.4.). Il se peut donc que le sulfate affecte directement l'activité du PSII, tel que

démontré par les mesures de dégagement d'oxygène et la figure 44. L'inhibition du CDO par l'ion sulfate est d'ailleurs bien connue (Itoh et Uwano 1986; Beauregard et coll. 1987; résultats de la section 3.2.3.). Cette interprétation suppose que le sulfate atteint physiquement le thylacoïde dans le chloroplaste. Donc, dans le cas des algues traitées avec 0.75 M sulfate, l'inhibition temporaire du CDO pourrait être levée par une expulsion du sulfate du chloroplaste. Le mécanisme de recouvrement au stress ionique dans les algues Dunaliella pourrait donc lever l'inhibition de la photosynthèse primaire en "sortant" l'ion sulfate du chloroplaste. Une présence excessive de glycérol promue par ce mécanisme pourrait avoir ce rôle (Gilmour et coll. 1984). De plus, le glycérol lui-même a un pouvoir protecteur sur le CDO du PSII (Aoki 1986).

Il semble que la fluorescence variable s'est montrée un paramètre efficace pour prédire rapidement (1 heure) la baisse ou la reprise du taux de croissance observé des jours plus tard. La comparaison de la figure 42 et 44 suggère que l'inhibition du taux de croissance est liée à celle du PSII. Il est évident que l'arrêt prolongé de la photosynthèse est suffisant pour tuer un organisme photosynthétique. Critchley (1982) a proposé que la tolérance de certaines plantes (halophytes) à de hautes concentrations de sel reposait sur la protection de l'activité du PSII. Les résultats montrés ici, en plein accord avec cette idée, suggèrent que l'activité du PSII est un facteur prépondérant

dans la tolérance des algues Dunaliella au sulfate en excès.

La sensibilité de l'appareil photosynthétique aux traitements au sulfate a été évaluée par spectrofluorimétrie à basse température. Le spectre de fluorescence obtenu d'algues contrôles est montré en figure 45. On peut y voir deux bandes principales à 688 nm et 698 nm (courbe 1). L'émission de fluorescence à 715-720 nm généralement dans les algues vertes est difficilement détectée sous forme d'un épaulement étendu à 710-740 nm (Govindjee et Satoh 1986). Cette bande d'émission est attribuée au PSI, tandis que les bandes à 688 (F688) et à 698 (F698) sont associées au CCL-II et à l'antenne intime du PSII (Govindjee et Satoh 1986). Les spectres de fluorescence à basse température mesurés après 24 heures de traitement sont montrés en figure 45. On peut noter que l'intensité de fluorescence F688 est abaissée pour les algues traitées avec 0.5 M (spectre 2), 0.75 M (spectre 3) et 1.3 M (spectre 4), comparé aux algues contrôles (spectre 1). L'intensité de fluorescence émise à plus grandes longueurs d'onde a été légèrement augmentée par le traitement. L'incubation des algues dans toutes les conditions utilisées n'a donné aucun effet sur les spectres lorsque mesurés après 2 heures d'incubation.

La baisse du maximum d'émission à 688 nm après 24 heures de traitement avec toutes les concentrations de sulfate utilisées est démontrée en figure 43. Le rapport F688/F698 passe de 1.3 à 0.6 pour l'échantillon traité dans 1.35 M sulfate. L'altération de ce rapport indique une

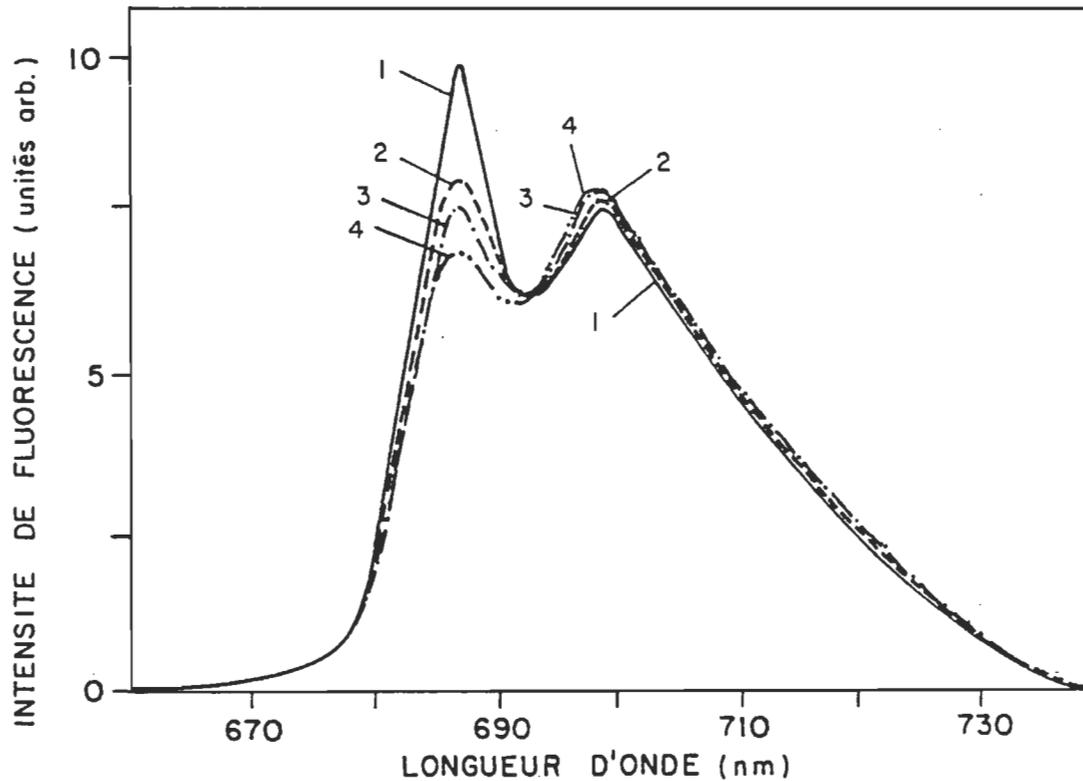


Figure 45. Spectre d'émission de fluorescence à basse température des algues après 24 heures de croissance dans différentes concentrations de sulfate de sodium.

modification du transfert de l'énergie excitonique parmi les complexes PSII, PSI et CCL-II (Krause et Weis 1984). Nos résultats suggèrent que sous traitement au sulfate, le transfert du CCL-II vers les PSII et probablement les PSI est augmenté. L'amplitude du transfert excitonique entre les complexes dépend de leur proximité qui est déterminée par la conformation des thylacoïdes (Karukstis et Sauer 1985; Barber 1982). Un changement conformationnel peut être induit par un masquage des charges à la surface de la membrane (Karukstis et Sauer 1985) par le sulfate de sodium

ou une modification de la pression osmotique (Preston et coll., 1987) par le  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  et le glycérol dans le chloroplaste.

Le fait qu'une modification de la distribution excitonique (détectée par spectrofluorimétrie à basse température) s'est produite dans les algues après quelques heures de traitement dans 0.5 M et 0.75 M semble corroborer des observations faites précédemment. Il a été démontré que malgré la reprise de l'activité du PSII après une inhibition temporaire, le taux de croissance n'a pas été complètement recouvert (courbe 3, fig.42). Il semble donc que le sulfate de sodium exerce un autre effet sur l'appareil photosynthétique qui ne peut être annulé. L'effet du sulfate de sodium sur l'activité du PSII semble donc indépendant de cet effet sur la densité excitonique des complexes chlorophylle-protéine démontré en figure 45. L'hypothèse d'un stress osmotique sur les thylacoïdes (et la modification conséquante de la distribution d'énergie) induit par le sulfate de sodium et un métabolite tel le glycérol reste valable dans ce contexte.

En conclusion, les résultats démontrent que l'algue Dunaliella bardawil peut survivre à teneur élevée en sulfate de sodium dans le milieu de croissance. En présence de 0.75 M sulfate, les algues ont été affectées temporairement mais ont surmonté le stress en moins de 24 heures. A plus haute concentration, le recouvrement de la croissance ne fut que précaire (1.0 M), ou nul et la culture fut anéantie (1.35

M). L'étude présentée permet d'identifier deux cibles d'effet du sulfate de sodium. La première est l'inhibition du CDO du PSII, conduisant au ralentissement de la photosynthèse primaire. Cet effet fut détecté en 5 min du début du traitement par fluorescence variable ce qui suggère que le sulfate atteint physiquement les thylacoïdes rapidement dans Dunaliella bardawil. L'inhibition du CDO par le sulfate est complètement réversible tel qu'observé pour les algues traitées dans 0.75 M sulfate de sodium. Cette rémission d'activité du PSII a été détectée en 1 heure par fluorescence variable et s'est montrée un signe avant-coureur de l'effet du sulfate sur la croissance des algues détectée des jours après. La seconde cible du stress au sulfate de sodium identifiée est l'arrangement des complexes chlorophylle-protéine tel que révélé par spectrofluorimétrie à basse température. La modification de la densité excitonique au niveau du thylacoïde n'a été détectée que plusieurs heures après le début des traitements. Il semble que cet effet n'a pas de relation directe avec l'inhibition du PSII ni avec la capacité des algues de surmonter la baisse de croissance. Cependant, il semble que ce second effet du sulfate de sodium peut affecter le rendement photosynthétique et ceci s'est fait remarquer par l'impossibilité de recouvrir l'entière capacité de croissance des algues. Les résultats semblent supporter la proposition (Gilmour et coll., 1984) d'une osmorégulation par la production de glycérol

intra-cellulaire comme mécanisme d'adaptation chez le genre  
Dunaliella.

3.2.6. Inhibition du processus de photoactivation du PSII par le sulfate de sodium: Il existe très peu d'information sur l'effet du sulfate au niveau des différents mécanismes de développement du chloroplaste. Une étape importante de ce développement est la photoactivation du PSII, et ce processus peut être étudié aisément dans des feuilles ayant poussé sous de courts éclairs. Les chloroplastes de telles feuilles ont un système de transport d'électrons organisé, mais aucune activité du CDO du PSII (Rémy 1973; Strasser et Sironval 1977; Ono et coll., 1986a). La capacité à dégager l'oxygène et de permettre le transport d'électrons linéaire peut être induite par l'exposition des feuilles à la lumière continue. A ce moment, la photoactivation se produit (Michel et Sironval 1972; Strasser et Sironval 1974). Etant donné qu'il existe une corrélation entre l'apparition de la fluorescence variable et la photoactivation (Strasser et Sironval 1974), la sensibilité de la photoactivation aux sels de sulfate sera investiguée par fluorescence variable.

Les chlorures ont été proposés comme ligands du manganèse dans le CDO (Critchley 1985). Donc, un enlèvement des chlorures par le sulfate pourrait empêcher la fixation des manganèses pendant la photoactivation. Dans cette section, les questions suivantes seront étudiées: 1- est-ce que le sulfate peut inhiber le processus de photoactivation du CDO ? et 2- est-ce que cet effet est attribuable à la

compétition des ions sulfates avec les chlorures?. Les feuilles d'orge non-photoactivées ont été préparées selon le régime suivant: 3 jours en noirceur totale, suivis de 3 jours sous éclairs de 500 us séparés de 5 min (Ono et coll., 1986a). La photoactivation de ces feuilles a été provoquée par exposition sous lumière continue de 20 mW/cm<sup>2</sup>. Les solutions de sels ont été infiltrées sous vide dans des segments de feuilles de 2 cm. Les segments de feuilles furent déposés à la surface de la solution tamponnée avec 25 mM Hepes (pH 7.0) et soumis au vide pour différentes périodes (jusqu'à 1 heure) à température de la pièce en obscurité. Les mesures de fluorescence variable et de transport d'électron par colorimétrie ont été réalisées tel que décrit au chapitre 2. Les spectres de fluorescence à température de la pièce présentés dans cette section ont été mesurés à l'aide d'un spectrofluorimètre équipé d'une matrice de diode (optical multichannel analyser) permettant la mesure d'un spectre de 650 nm à 750 nm en 20 ms (Sironval et coll., 1984). Les spectres présentés ici sont la somme de 10 balayages (20 ms chaque) pour un temps total d'illumination de 2 sec, tel que détaillé au chapitre 2. Les expériences de photoactivation performées dans le cadre de ces mesures consistent à utiliser le laser de l'appareil ( $\lambda_{\text{max}} = 632.8 \text{ nm}$ ) ayant une puissance de 60 mW/cm<sup>2</sup>.

L'incapacité du CDO à émettre l'oxygène dans des feuilles cultivées sous éclairs est facilement observable

par colorimétrie du DCPIP. Le tableau 5 montre le transport d'électrons du PSII évalué par le taux de réduction du DCPIP.

Tableau 5

Transport d'électrons des PSII non-photoactivés et photoactivés par colorimétrie de DCPIP.

Traitement avant isolation	Donneur d'électron	DCPIP réduit (uequiv./h mg Chl)
Aucun	H <sub>2</sub> O	0
Aucun	DPC	310
10 min lumière continue	H <sub>2</sub> O	475

Lorsque les chloroplastes des feuilles cultivées sous éclairs sont isolés et soumis à la mesure de réduction du DCPIP, aucun transport d'électron n'est détecté. L'addition de DPC, un agent donneur au niveau de Z qui remplace le CDO dans le transport d'électron (Muallem et Izawa 1980), permet de mesurer une activité du PSII. Ceci indique que l'incapacité du PSII au transport d'électron est imputable à une déficience du CDO. Lorsque les chloroplastes sont isolés de feuilles ayant reçu une illumination continue pour 10 min, cette déficience est éliminée et le PSII est fonctionnel et capable de réduire le DCPIP en absence de

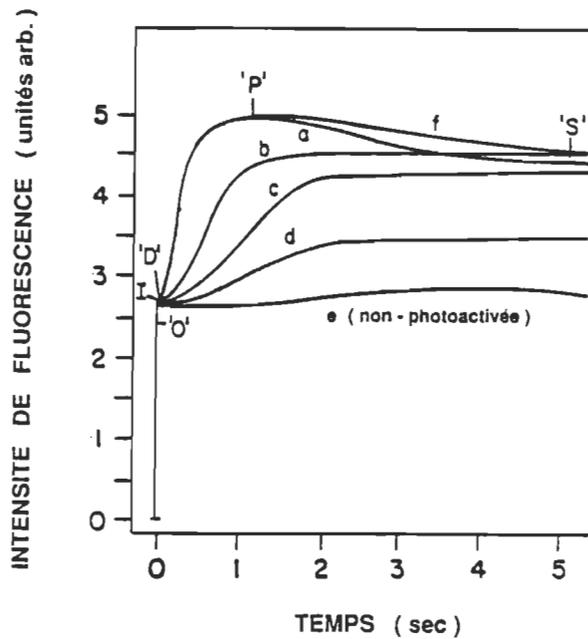


Figure 46. Effet du sulfate de sodium sur la photoactivation de feuilles cultivées sous éclairs détectée par fluorescence variable.

donneur artificiel DPC. La figure 46 montre la dépendance entre la photoactivation des PSII et l'apparition de la fluorescence variable. On peut voir que la fluorescence mesurée de feuilles non-photoactivées (pas encore exposées à la lumière continue) est très faible (courbe e). Après une illumination de 10 min en continu, ces mêmes feuilles émettent une fluorescence variable (courbe a) ayant les traits caractéristiques d'une feuilles mature (Krause et Weis 1984). Dans ce cas, les feuilles sont pleinement photoactivées (Strasser et Sironval 1974). Les courbes b, c et d correspondent aux feuilles traitées avec le sulfate de sodium pendant 15, 30 et 60 min respectivement. Les feuilles ont reçu une période égale d'illumination continue

après l'infiltration, soit 10 min. Les résultats démontrent bien que l'infiltration au sulfate suivie d'illumination continue ne permet pas d'atteindre un niveau de fluorescence aussi élevé que pour les feuilles contrôles (courbe a). En fait, le niveau P est diminué et la descente P-S est éliminée par le traitement. La courbe f indique l'effet d'une infiltration avec une solution tamponnée pendant plus d'une heure avant illumination continue. On peut voir que le traitement d'infiltration lui-même n'induit pas l'inhibition du processus de photoactivation.

Les feuilles contrôles (courbes a et f) ont démontré une fluorescence variable intense après illumination continue, ce qui indique que les PSII de ces feuilles ont été photoactivés et que leurs CDO sont désormais fonctionnels (tableau 5; Strasser et Sironval 1974). La comparaison de l'intensité de fluorescence au niveau P obtenue pour les feuilles non-traitées et celle des feuilles traitées au sulfate de sodium indique que ce traitement affecte grandement l'activité du PSII. Une intensité de fluorescence au niveau P plutôt faible indique que le centre réactionnel ne parvient pas à maintenir Qa à l'état réduit, ce qui est probablement dû à l'impossibilité du CDO de fournir les électrons au P<sub>680</sub> (Papageorgiou 1975; Krause et Weis 1984). Une incapacité du CDO après la période d'illumination continue peut être attribuable à l'inhibition du processus de photoactivation par le sulfate de sodium. Cependant, un effet du sulfate sur les CDO déjà photoactivés

est aussi possible, puisque le sulfate inhibe l'activité des PSII matures (Itoh et Uwano, 1986; Beauregard et coll., 1987; Beauregard et Popovic 1988).

Afin de distinguer entre l'effet possible du sulfate de sodium sur le processus de photoactivation lui-même et l'effet du sulfate sur le CDO après photoactivation, l'effet de l'infiltration au sulfate de sodium a été étudié avec des feuilles partiellement photoactivées (Michel et Sironval 1972). Les courbes de fluorescence c, b et a de la figure 47 proviennent de feuilles ayant reçu une illumination continue de 0.5, 3 et 10 min, respectivement. Un traitement de ces feuilles avec le sulfate de sodium suivi d'une période additionnelle d'illumination continue n'a eu aucun effet sur la fluorescence variable mesurée (courbes pointillées). Il semble que les feuilles partiellement photoactivées ne peuvent atteindre un niveau de photoactivation supérieur après l'infiltration au sulfate de sodium. Un traitement à l'eau tamponnée n'a provoqué aucune interférence au processus de photoactivation (résultats non-montrés).

Les résultats en figure 47 démontrent donc que l'infiltration au sulfate empêche la photoactivation des PSII sans toutefois inhiber les PSII déjà photoactivés. Ceci suggère que l'infiltration au sulfate de sodium interfère spécifiquement avec la photoactivation du CDO. Le traitement au sulfate a provoqué la disparition de la descente P-S, tel que montré par les courbes en

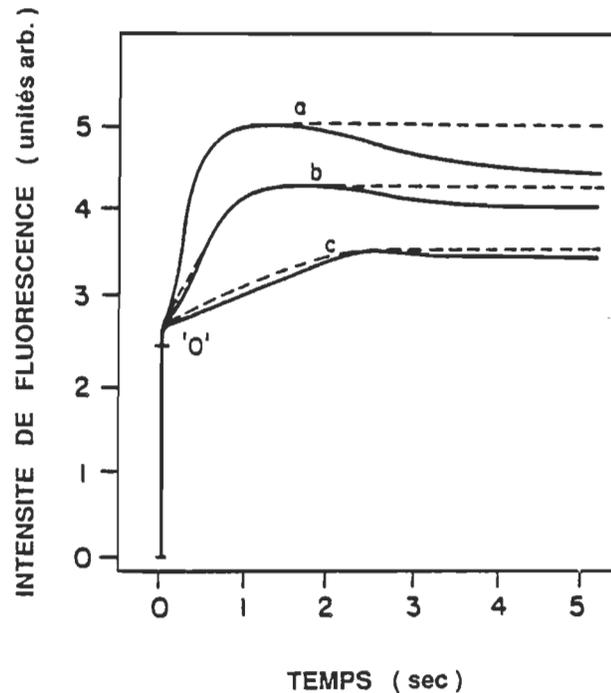


Figure 47. Effet du sulfate de sodium sur la photoactivation de feuilles partiellement photoactivées.

pointillés. Ce phénomène s'est aussi produit pour les expériences présentées en figure 46 (courbes b, c, et d). Le transient P-S de l'induction de fluorescence serait contrôlé par l'état d'oxydo-réduction du PSI et sur la mise en place du gradient de protons de part et d'autre de la membrane (Murata et Sugihara 1974; Krause et Weiss 1984). Les résultats présentés ici semblent donc supporter la proposition récente que l'excès de sels dans le chloroplaste peut affecter la mise en place du gradient de protons (Gilmour et coll., 1985).

L'effet du sulfate de sodium sur la photoactivation a aussi été révélé par l'étude de l'évolution du spectre de fluorescence des chloroplastes pendant la photoactivation.

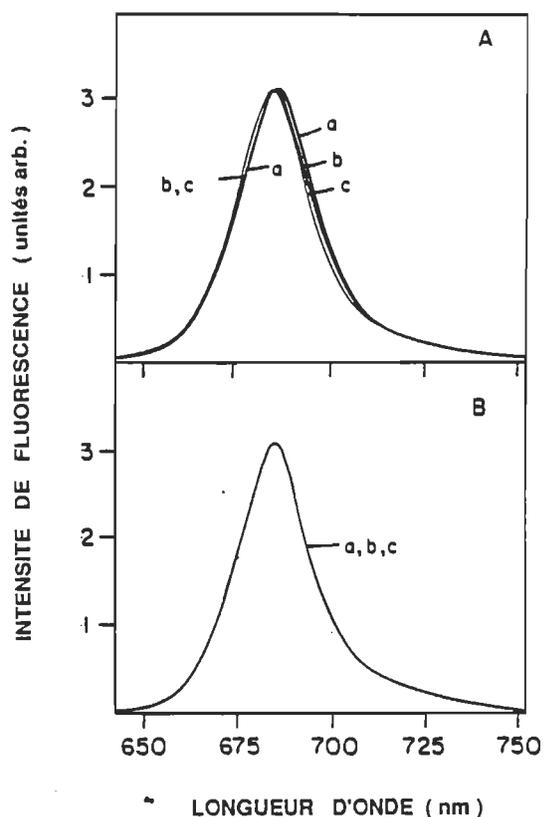


Figure 48. Modification du spectre de fluorescence pendant la photoactivation à température de la pièce. A) feuilles contrôles, B) feuilles traitées avec 1 M sulfate pendant 1 heure.

La photoactivation du PSII est accompagnée d'un déplacement spectral vers le bleu du maximum d'émission de fluorescence des feuilles à température de la pièce (Franck et Dujardin, en préparation). La figure 48A montre l'évolution du spectre de fluorescence pendant les deux premières minutes d'illumination continue au laser. La comparaison des spectres a (début de l'éclaircissement) et c (après deux minutes d'illumination) montre un déplacement dû à la baisse

relative des composantes de plus grandes longueur d'onde (note: le spectre b est mesuré après 1 min d'illumination). Après une courte période en noirceur, la même série de spectre fut enregistrée (non-montré) mais aucun changement ne fut observé, signe que le système a atteint un état stationnaire (note: les spectres mesurés dans ce cas sont identiques au spectre c de la figure 48A). La figure 48B montre l'évolution des spectres de fluorescence des feuilles traitées au sulfate de sodium (1 M pour 1 heure). Aucun changement n'a été observé pour ces feuilles pendant les 2 premières minutes d'illumination continue, indiquant que les systèmes pigmentaires ou les rendements de fluorescence de ces systèmes n'ont pas changés. Ce résultat supporte l'hypothèse de l'inhibition de la photoactivation du PSII par l'infiltration au sulfate de sodium.

De façon à vérifier la spécificité du sulfate de sodium, l'effet de traitements similaires avec d'autres sels a été étudié. Le tableau 6 montre la fluorescence variable normalisée au transient P obtenue après différents traitements suivis d'illumination continue. Tel que vu, tous les traitements ont été efficaces à diminuer l'apparition de fluorescence variable sauf le sucrose. Il a été démontré que la photoactivation du PSII consistait en la fixation du manganèse et du calcium dans le PSII (Ono et coll., 1986a). Les chlorures ont été proposés comme ligands du manganèse dans le CDO (Critchley 1985; Hsu et coll., 1987). On a aussi montré dans le passé que le

Tableau 6

Effet de l'infiltration avec différents sels sur la photoactivation de feuilles cultivées sous éclaircs. La photoactivation est mesurée par la fluorescence normalisée mesurée au niveau P.

Solution de traitement	$\frac{F_p - F_o}{F_o}$	Solution de traitement	$\frac{F_p - F_o}{F_o}$
Eau tamponnée	1.0	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1.0 M + KCl 0.05 M	0.4
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1.0 M	0.4	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1.0 M + KCl 0.1 M	0.4
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.8 M	0.45	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1.0 M + NaCl 0.05 M	0.4
NaCl 1.0 M	0.45	KCl 1.0 M	0.45
KCl 1.0 M	0.45	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1.0 M + NaCl 0.1 M	0.4
Sucrose 1.0 M	1.0		

sulfate déplaçait les chlorures du CDO (Itoh et Uwano, 1986; résultats de la section 3.2.3) et que conséquemment, le sulfate pourrait altérer l'environnement des atomes de manganèse (Hsu et coll., 1987). Cependant, les résultats montrés au tableau 6 indiquent que l'effet du sulfate sur la

photoactivation n'est pas dû au déplacement des chlorures de CDO, étant donné que les sels de chlorure et différentes combinaisons de sels ont aussi provoqué l'arrêt de la photoactivation. Le sucrose s'est montré incapable d'entraver la photoactivation et ceci indique que l'effet du sulfate de sodium n'est pas relié au stress osmotique.

L'infiltration au sulfate de sodium pourrait provoquer un effet de masquage de charges à la surface des thylacoïdes et ceci diminuerait l'attraction pour les cations manganèse et calcium requis pour la photoactivation. En outre, la photoactivation est accompagnée de la fixation des polypeptides de 23 et 18 kDa au PSII (Ono et coll., 1986a). Les liens entre ces protéines et le PSII sont grandement dépendants des propriétés électrostatiques de la surface du thylacoïde (Kuwabara et Murata, 1983; Beauregard et coll., 1987; Beauregard et Popovic 1988). Dans ce contexte, l'effet d'infiltration de sels pourrait être d'empêcher la fixation des polypeptides de 23 et 18 kDa.

En conclusion, les résultats montrés dans cette section démontrent que l'infiltration de sulfate de sodium dans les feuilles non-photoactivées provoque l'inhibition du processus de photoactivation du PSII par un effet ionique non-spécifique. Conséquemment, l'accumulation de sulfate dans les cellules végétales peut interférer avec la photoactivation du CDO. L'entrave de cette étape cruciale de la mise en marche du transport d'électron peut diminuer considérablement la photosynthèse du chloroplaste nécessaire

à la croissance des feuilles. Il peut donc être inféré que l'entrée excessive de sulfate dans les plantes suite aux pluies acides enrichies en sulfate (ou à l'exposition au  $\text{SO}_2$ ) peut diminuer leur croissance par son effet sur la photoactivation du PSII.

## CHAPITRE 4

CONCLUSION

4.1. Aspects fondamentaux: La thèse que je viens de présenter montre que l'inhibition de l'activité du PSII par le sulfate peut être contrée in vitro par l'addition de chlorures et est réversible in vivo dans Dunaliella bardawil. Mes résultats démontrent que l'inhibition du sulfate se fait exclusivement du côté du CDO dans le PSII, n'ayant aucun effet sur le site du bicarbonate impliqué dans le transfert d'électrons entre Qa et Qb. Ces observations suggèrent fortement que le sulfate inhibe l'activité du PSII par la compétition avec les ions chlorures au niveau de CDO. L'effet de la lumière sur cette inhibition indique que les chlorures sont échangés plus rapidement pour des ions sulfates quand le CDO est actif. Cette interprétation supporte un mécanisme d'entrée et sortie des chlorures dans le CDO pendant l'oxydation de l'eau. J'ai aussi montré que l'enlèvement des chlorures par le sulfate conduit à un blocage total d'une partie de la population des PSII, plutôt qu'un blocage partiel de tous les PSII. Il semble que les PSII<sub>a</sub> et PSII<sub>b</sub> sont tous deux affectés par cette inhibition, mais que le faible transport d'électrons du PSII<sub>b</sub> diminue l'impact de l'effet du sulfate sur son activité.

Le travail présenté révèle que l'inhibition du CDO par le sulfate est accompagnée du largage des polypeptides de 23 et

18 kDa lorsque la concentration en sulfate est suffisamment élevée. Contrairement à une étude contemporaine (Homann 1987a), aucun rôle des chlorures dans le maintien des liens entre ces polypeptides et le PSII n'a été décelé. Les polypeptides de 23 et 18 kDa sont enlevés du PSII à pH supérieur à 7 et j'ai trouvé que cet enlèvement est stimulé par la présence de sulfate. Les traitements au sulfate pour provoquer l'enlèvement des chlorures récemment utilisés dans le domaine ont donc deux conséquences: l'enlèvement des chlorures et le largage de polypeptides impliqués dans la fonction des chlorures. Je suggère que ce phénomène est à la base du débat pour le rôle des chlorures dans l'avancement des états S (Homann 1987b). Mes observations supportent le concept de la participation des chlorures dans le passage de l'état S<sub>2</sub> à S<sub>3</sub>. La sensibilité des protéines au pH alcalin a aussi une importance dans l'interprétation des études traitant des sites possibles du liens pour les chlorures dans le CDO. Un modèle récent pour la fonction de l'ion chlorure dans le CDO a été proposé par Coleman et Govindjee (1987). Or, une des premières spéculations présentée dans ce modèle consiste à attribuer la ligation des chlorures à des groupes basiques de la suite d'acides aminés de la protéine de 33 kDa. Le titrage de ces groupes basiques à pH alcalin provoquerait la perte des chlorures. J'ai montré ici que l'enlèvement des chlorures à pH alcalin peut être attribuable à l'enlèvement des protéines de 23 et 18 kDa aussi bien qu'au titrage de groupes protonables. Je propose que le

rôle des chlorures et le rôle des protéines de 23 et 18 kDa dans le mécanisme d'oxydation de l'eau ont été confondus dans ce modèle. D'autre part, on stipule dans ce modèle que les chlorures ne sont pas des ligands du manganèse. Mes résultats présentés ici supportent ce concept, en opposition à d'autres rapports (Damoder et coll., 1986; Hsu et coll., 1987).

Les résultats obtenus par utilisation des ions sulfate et sulfite permet aussi de mieux connaître les propriétés des polypeptides extrinsèques du PSII. Les polypeptides de 23 et 18 kDa seraient liés au PSII via des interactions électrostatiques brisées par augmentation de la force ionique ou par titrage des groupements peptidiques chargés. Dans le cas de la protéine de 33 kDa, les résultats supportent l'existence de ponts hydrogène et suggèrent que les ponts disulfures ont aussi un rôle à jouer dans le maintien des liens entre la protéine et le PSII.

Le travail présenté démontre que le PSII est sensible à l'incubation avec l'ion sulfite. En solution, le sulfite s'oxyde rapidement pour diminuer la quantité d'oxygène dissout et se transforme en sulfate. Il y a donc trois inhibiteurs présents dans une solution de sulfite: le sulfite, le sulfate et le manque d'oxygène, capable d'inactiver le CDO (Popovic et coll., 1984). La nature de l'inhibition au sulfite est donc très complexe. 4.2. Aspects pratiques: L'accumulation du sulfate dans les organismes photosynthétiques suite à l'exposition au  $SO_2$  ou aux pluies acides est un phénomène bien connu (Kylin 1960; Chung 1982; Brunold et coll., 1983;

Rennenberg 1984). L'étude présentée ici permet de penser que le sulfate peut traverser tous les niveaux de membranes séparant le PSII de l'extérieur de l'organisme, du moins pour l'orge et l'algue Dunaliella bardawil. L'amplitude de l'effet du sulfate sur le PSII dans ces organismes dépend de la concentration de sulfate ou du temps de traitement ce qui suggère que l'entrée du sulfate se fait (au moins en partie) par diffusion, en accord avec des travaux précédents (Rennenberg 1984; O'Connor et coll., 1986). L'inhibition réversible du CDO dans le PSII par le sulfate semble expliquer plusieurs observations faites à partir d'expériences de fumigation au SO<sub>2</sub> sur des plantes entières in vivo. En effet, la fumigation au SO<sub>2</sub> conduit à l'inhibition du PSII précisément du côté du CDO (Shimazaki et Sugahara 1980; Chung 1982; Miszlalski 1983; Omasaka et coll., 1987). De plus, cette inhibition consécutive à l'absorption de SO<sub>2</sub> est réversible (Malhotra et Khan 1983; Olszyk et Tingey 1984; Shimazaki et coll., 1984), tout comme l'inhibition du PSII par le sulfate démontré dans ce travail. Je peux donc proposer que l'inhibition du PSII par le sulfate est un mode d'action du SO<sub>2</sub> sur la photosynthèse des plantes. De même, l'absorption du sulfate par les plantes ou les algues suite aux précipitations acides peut aussi conduire à l'inhibition du PSII. J'ai mis en évidence l'importance de cette inhibition pour le développement de l'organisme touché en montrant le haut degré de corrélation existant entre l'activité du PSII et la croissance dans Dunaliella bardawil. L'inhibition du

processus de photoactivation par le sulfate dans les chloroplastes en développement est aussi un mode d'action probable du  $\text{SO}_2$  et des pluies acides sur le développement des organismes photosynthétiques.

Le sulfite peut aussi se retrouver dans le chloroplaste, cependant, l'étude présentée ici indique que son temps de séjour y est inférieur au sulfate. Le chloroplaste est riche en agents capable d'oxyder le sulfite et d'ailleurs il suffit que le chloroplaste soit éclairé pour provoquer un dégagement d'oxygène suffisant pour transformer le sulfite en sulfate. Les expériences de fumigation ne conduisent pas toujours à l'entrée du sulfite dans le chloroplaste en quantités détectables (Chung 1982; Huber 1987). Donc, bien que le sulfite soit plus nocif que le sulfate (Marques et Anderson 1986), je suggère que son impact soit moins grand et que son temps de vie dans le chloroplaste *in vivo* ne dépasse pas la période nocturne.

Voici en figure 49 un modèle que je propose pour décrire la chimie des ions présents dans le chloroplaste après fumigation au  $\text{SO}_2$  et l'effet de la présence ou non de lumière (cycle solaire quotidien). En A on retrouve le chloroplaste en noirceur, avec les ions sulfate, sulfite et bisulfite présents dans tous les compartiments. Le pH plutôt neutre des deux compartiments (stroma et intra-thylacoïde) favorise l'équilibre sulfite et bisulfite 1:1. Lorsque le chloroplaste est éclairé, la situation serait décrite en B. Dans le compartiment stromal, le pH s'élève et l'équilibre se

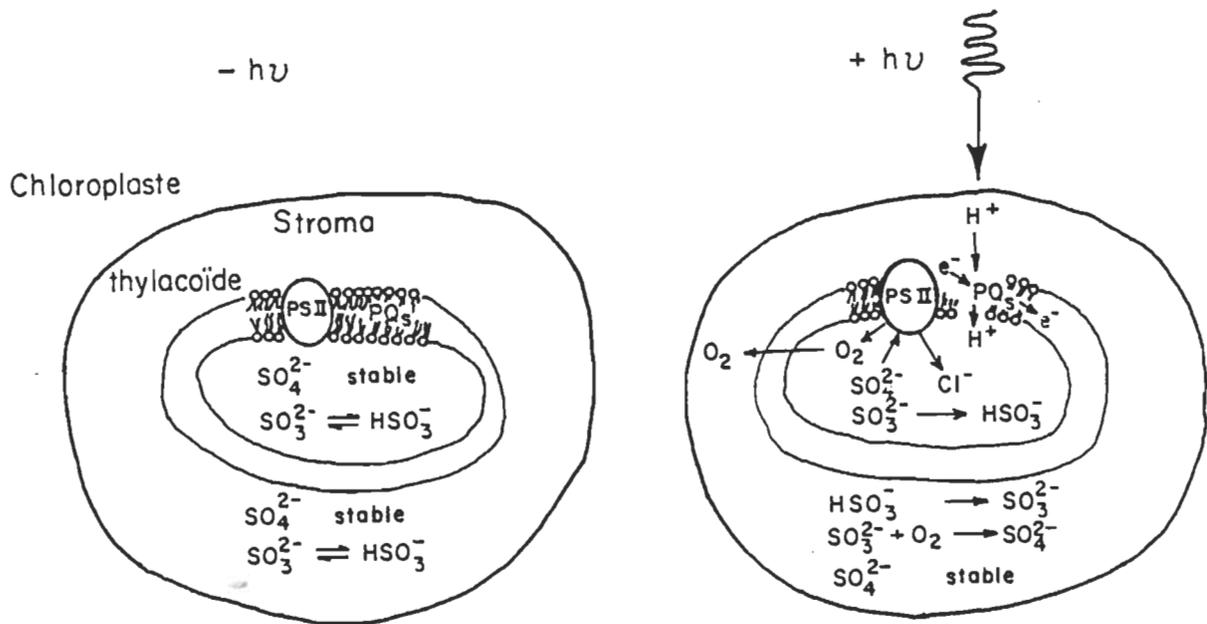


Figure 49. Modèle de l'effet du  $SO_2$  sur le PSII

in vivo.

déplace vers le sulfite. Les ions sulfate sont inchangés par cette augmentation de pH (approx. 8.0). L'oxygène émis par le PSII éclairé transforme le sulfite en sulfate, contribuant à augmenter sa concentration. Dans le thylacoïde, le pH s'abaisse à cause de l'accumulation de protons (Mitchell 1969; Hooper 1984). Le sulfite est protoné en bisulfite, tandis que le sulfate déplace les chlorures mobilisés par l'activation du PSII et inactive ce dernier. Mon modèle peut donc expliquer pourquoi l'effet toxique du  $SO_2$  est plus élevé en période d'éclaircissement. Notons cependant que ceci peut être dû à l'ouverture des stomates permettant l'entrée du  $CO_2$  en période d'ensoleillement (Kropff 1987).

Le modèle suggère que le sulfate est favorisé dans le chloroplaste au détriment du sulfite. Il semble en effet que l'inhibition du PSII par le sulfate soit la clef du problème de l'impact du  $\text{SO}_2$  et des pluies acides sur la photosynthèse. La sensibilité d'un chloroplaste au  $\text{SO}_2$  serait donc liée à la concentration en chlorure présente et les propriétés des protéines de 23 et 18 kDa du CDO, facteurs de régulation des chlorures. Dans cette optique, Aoki et coll. (1986) publiaient récemment que les protéines de 23 et 18 kDa de l'algue Dunaliella tertiolecta avaient des différences majeures comparé aux mêmes polypeptides dans les épinards. Ces différences pourraient expliquer la résistance de ces algues aux stress ionique (Aoki et coll., 1986). Le contrôle du contenu en chlorure dans le chloroplaste ainsi que les propriétés des polypeptides du CDO sont vraisemblablement les avenues de recherche pour une amélioration de la résistance des organismes végétaux face à un apport excessif de sulfate par l'environnement.

## BIBLIOGRAPHIE

- Akerlund, H.-E. In Y. Inoue et coll., (Eds.), The Oxygen Evolving Complex of Photosynthesis. Tokyo: Academic Press Inc., 1983, pp.201-208.
- Akerlund, H.-E., Jansson, C. et Andersson, B.  
Reconstitution of photosynthetic water splitting in inside-out thylakoids vesicles and identification of a participating polypeptides. Biochim. Biophys. Acta, 1982, 681, 1-10.
- Anderson, I.C. et Robertson, D.S. Role of carotenoids in protecting chlorophyll from photodestruction. Plant Physiol., 1960, 35, 531-538.
- Anderson, J. Structure and components of photosystem II. Communication présentée au C.S. French Symposium on Photosynthesis, Stanford Univ., California, juillet 1988.
- Anderson, J.M. et Melis, A. Localization of different photosystems in separate regions of chloroplast membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1973, 80, 745-749.
- Andersson, B. Proteins participating in photosynthetic water oxidation. In L.A. Staehelin et C.J. Arntzen (Eds.), Photosynthesis III (Encyclopedia of Plant Physiology, Vol. 19). Heidelberg: Springer-Verlag, 1986, pp. 447-457.
- Andersson, B., Larsson, C., Jansson, C. Ljunberg, U. et Akerlund, H.-E. Polypeptides on the oxidizing side of photosystem II. Biochim. Biophys. Acta, 1984, 766, 21- .
- Aoki, K., Ideguchi, T., Kakuno, T., Yamashita, J. et Horio, T. Effects of NaCl and glycerol on photosynthetic oxygen-evolving activity with thylakoid membrane from halophilic green alga Dunaliella tertiolecta. J. Biochem., 1986, 100, 1223-1230.
- Arnon, D.I. Photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation by chloroplasts: assertion, refutation, discovery. Trends Biochem. Sci., 1987, 12, 39-42.
- Arntzen, C.J. et Pakrasi, H.B. Photosystem II reaction center: Polypeptide subunits and functional cofactors. In L.A. Staehelin et C.J. Arntzen (Eds.), Photosynthesis III, (Encyclopedia of Plant Physiology, Vol. 19). Heidelberg: Springer-Verlag, 1986, pp. 457-467.
- Bailey, L. J.L. et Cole, R.D. Studies on the reaction of sulfite with proteins. J. Biol. Chem., 1959, 234, 1733-1739.
- Barry, B.A. et Babcock, G.T. Tyrosine radicals are involved in the photosynthetic oxygen-evolving system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 7099-7103.
- Beauregard, M., Morin, L. et Popovic, R. Removal of the 33, 23 and 18 kDa extrinsic proteins of photosystem II by sulfite treatment at alkaline pH. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1988, 152, 612-616.
- Beauregard, M., Morin, L. et Popovic R. Sulfate inhibition of the oxygen evolving complex of photosystem II. Appl. Biochem. Biotechnol., 1987, 16, 109-119.
- Beauregard, M. et Popovic, R. Artificial inhibitory effects

- of sulfite on photosystem II activity measured by oxygen evolution in chloroplasts. Photosynth. Res., 1987, 14, 89-94.
- Beauregard, M. et Popovic, R. Removal of 23 and 18 kDalton extrinsic polypeptides by sulfate in PSII particles. J. Plant Physiol., 1988, sous presse.
- Bell, D.H. et Hipkins, M.F. Analysis of fluorescence induction curves from pea chloroplasts. Photosystem reaction centre heterogeneity. Biochim. Biophys. Acta, 1985, 807, 255-262.
- Ben-Amotz, A. et Avron, M. On the factors which determine massive beta-carotene accumulation in halotolerant algae Dunaliella bardawil. Plant Physiol., 1983, 72, 593-597.
- Blough, N.V. et Sauer, K. The effect of mono- and divalent salts on the O<sub>2</sub>-evolution activity and low temperature multiline EPR spectrum of photosystem II preparation. Biochim. Biophys. Acta, 1984, 767, 377-381.
- Bose, S. Chlorophyll fluorescence in green plants and energy transfer pathways in photosynthesis. Photochem. photobiol., 1982, 36, 725-731.
- Brettel, K., Schlodder, E. et Witt, H.T. Nanosecond reduction kinetics of photooxidized chlorophyll-aII (P680) in single flashes as a probe for the electron pathway, H<sup>+</sup> release and charge accumulation in the O<sub>2</sub>-evolving complex. Biochim. Biophys. Acta, 1984, 766, 403-415.
- Briantais, J.-M., Verrotte, C., Krause, H.G. et Weis, E. Chlorophyll a fluorescence of higher plants: chloroplasts and leaves. In J. Barber (Ed.) Light Emission by Plants and Bacteria. New York: Academic Press, 1986, pp. 539-583.
- Bricker, T.M., Odom, W.R. et Queirolo, C.B. Close association of the 33 kDa extrinsic protein with the apoprotein of CPa1 in photosystem II. FEBS Lett., 1988, 231, 111-117.
- Brudvig, G.W. The tetranuclear manganese complex of photosystem II. J. Bioenerg. Biomemb., 1987, 19, 91-103.
- Brunold, C., Landolt, W. et Lavanchy, P. SO<sub>2</sub> and assimilatory sulfate reduction in beech leaves. Physiol. Plant., 1983, 59, 313-318.
- Butler, W.L., Madge, D. et Berens, S.J. Fluorescence lifetimes in the bipartite model of the photosynthetic apparatus with a, b heterogeneity in photosystem II. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, 80, 7510-7514.
- Cammarata, K., Tamura, N., Sayre, R. et Cheniae, G. Identification of polypeptides essential for oxygen evolution by extraction and mutational analyses. In C. Sybesma (Ed.), Advances in Photosynthesis Research (Vol. 1). The Hague: Martinus Nijhoff Publ., 1984, pp. 311-320.
- Cerovic, Z.G., Kalezic, R. et Plesnicar, M. The role of photophosphorylation in SO<sub>2</sub> and SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> inhibition of photosynthesis in isolated chloroplasts. Planta, 1992, 156, 249-254.
- Cheniae, G. Manganese binding sites and presumed manganese proteins in chloroplasts. Meth. Enzymol., 1980, 69, 349-363.

- Chung, H.S. Effects of sulfur dioxide on pigments, protein content, and photosystem II activity of barley and corn leaves. Korean J Bot., 1982, 25, 135-151.
- Coleman, W.J., Baianu, I.C., Gutowsky, H.S. et Govindjee The effect of chloride and other anions on the thermal inactivation of oxygen evolution in spinach thylakoids. In C. Sybesma (Ed.), Advances in Photosynthesis Research (Vol. 1). The Hague: Martinus Nijhoff Publ., 1984, pp. 283-286.
- Coleman, W.J. et Govindjee A model for the mechanism of chloride activation of oxygen evolution in photosystem II. Photosynth. Res., 1987, 13, 199-223.
- Cotton, F.A. et Wilkinson, G. Advanced Inorganic Chemistry (4th ed.). New York: John Wiley and Sons, 1980, pp. 465-468.
- Cramer, W.A., Theg, S.M. et Widger, W.R. On the structure and function of cytochrome b-559. Photosynth. Res., 1986, 10, 393-403.
- Critchley, C. Stimulation of photosynthetic electron flow transport in a salt tolerant plant by high chloride concentrations. Nature, 1982, 298, 483-485.
- Critchley, C. The role of chloride in photosystem II. Biochim. Biophys. Acta, 1985, 811, 33-46.
- Damoder, R., Klimov, V.V. et Dismukes, G.C. The effect of Cl<sup>-</sup> depletion and X<sup>-</sup> reconstitution on the oxygen-evolution rate, the yield of the multiline manganese EPR signal and EPR signal II in the isolated photosystem II complex. Biochim. Biophys. Acta, 1986, 848, 378-391.
- Daniell, M. et Sarojini, G. On the possible site of sulfite action in the photosynthetic electron transport chain and the light modulation of enzyme activity. Photobiochem. Photobiophys., 1981, 2, 61-68.
- Danks, S.M., Evans, E.H. et Wittaker, P.A. Photosynthetic Systems: Structure, Function, and Assembly. New York: John Wiley and Sons, 1983, pp. 17-23.
- Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R. et Michel, H. Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction center of Rhodospseudomonas viridis at 3 Å resolution. Nature, 1985, 318, 19-26.
- Delieu, T. et Walker, D.A. An improved cathode for the measurement of photosynthetic oxygen evolution by isolated chloroplasts. New Phytol., 1972, 71, 201-225.
- Delrieu, M.-J. Evidence for unequal misses in oxygen flash yield sequence in photosynthesis. Z. Naturforsch., 1983, 38C, 247-258.
- Delrieu, M.-J. et Rosengard, F. Fundamental differences between period-4 oscillations of the oxygen and fluorescence yield induced by flash excitation in inside-out thylakoids. Biochim. Biophys. Acta, 1987, 892, 163-171.
- DePaula, J.C., Li, P.M., Miler, A.-F., Wu, B.W. et Brudvig, G.W. Effect of the 17- and 23-kilodalton polypeptides, calcium, and chloride on electron transfer in photosystem

- II. Biochem., 1986, 25, 6487-6494.
- Diner, B. The reaction center on photosystem II. In L.A. Staehelin et C.J. Arntzen (Eds.) Photosynthesis III (Encyclopedia of Plant Physiology Vol. 19). Heidelberg: Springer-Verlag, 1986, pp. 422-437.
- Doring, G., Renger, G., Vater, J. et Witt, H.T. Properties of the photoactive chlorophyll-aII in photosynthesis. Z. Naturforsch., 1969, 24, 1139-1143.
- Eckert, H.J. et Renger, G. Photochemistry of the reaction centers on system II under repetitive flash group excitation in isolated chloroplasts. Photochem. Photobiol., 1980, 31, 501-511.
- Environmental Protection Agency Diagnosing vegetation injury by air pollution. EPA 68-02-1344, EPA Pes Triangle Park, North Carolina, 1976.
- Ferenbaugh, R.W. Effects of simulated acid rain on Phaseolus vulgaris L., Amer. J. Bot., 1976, 63, 283-288.
- Forbush, B., Kok, B. et McGloin, M. Cooperation of charges in photosynthetic O<sub>2</sub> evolution. II. Damping of flash yield oscillation, deactivation. Photochem. Photobiol., 1971, 14, 307-321.
- Forster, T. Delocalized excitation and excitation transfer. In O. Sinanogulu (Ed.). Modern Quantum Chemistry (Vol. 3). New York: Academic Press, 1965, pp. 93-137.
- Franck, J et Teller, E. Migration and photochemical action of excitation energy in crystals. J. Chem. Phys., 1938, 6, 861-872.
- Franzen, L.G. et Andreasson, L.-E. Studies of manganese binding by selective solubilization of photosystem II polypeptides. Biochim. Biophys. Acta, 1984, 765, 166-170.
- Franzen, L.-G., Hansson, O. et Andreasson, L.-E. The roles of the extrinsic subunits in photosystem II as revealed by EPR. Biochim. Biophys. Acta, 1985, 808, 171-179.
- Garsed, S.G. The use of sulfite solutions for studying the effects of SO<sub>2</sub> on higher plants. Environ. Poll. (Ser.A), 1981, 24, 303-311.
- Ghanotakis, D.F., Babcock, G.T. et Yocum, C.F. Commentary on the role of water-soluble polypeptides (17, 23 kDa), calcium, and chloride in photosynthetic oxygen evolution. FEBS Lett., 1985, 192, 1-7.
- Ghanotakis, D.F., Demetriou, D.M. et Yocum, C.F. Isolation and characterization of an oxygen-evolving photosystem II reaction center and a 28 kDa Chl-a-binding protein. Biochim. Biophys Acta, 1987, 891, 15-21.
- Ghanotakis, D.F. et Yocum, C.F. Polypeptides of photosystem II and their oxygen evolution. Photosynth. Res., 1985, 7, 97-114.
- Gilmour, D.J., Hipkins, M.F. et Bony, A.D. The effect of osmotic and ionic stress on the primary processes of photosynthesis in Dunaliella tertiolecta. J. Exptl. Bot., 1984, 35, 18-27.
- Gilmour, D.J., Hipkins, M.F., Webber, N.R., Baker, D.N. et Boney, D.N. The effect of ionic stress on photosynthesis

- in Dunaliella tertiolecta. Chlorophyll fluorescence kinetics and spectral characteristics. Planta, 1985, 163, 250-256.
- Gimmler, H. et Weiss, C. The effect of sulfate deficiency and excess sulfate in growth and metabolism of Dunaliella parva. J. Plant Physiol., 1987, 131, 449-465.
- Glazer, A.N. et Melis, A. Photochemical reaction center: Structure, organization and function. Ann. Rev. Plant Physiol., 1987, 38, 11-45.
- Goedheer, J.C. Fluorescence in relation to photosynthesis. Ann. Rev. Plant Physiol., 1972, 23, 87-112.
- Govindjee et Eaton-Rye, J.J. Electron transfer through photosystem II acceptors: Interaction with anions. Photosynth. Res., 1986, 10, 365-379.
- Govindjee, Kambara, T. et Coleman W. The electron donor side of photosystem II: The oxygen evolving complex. Photochem. Photobiol., 1985, 42, 187-210.
- Govindjee et Satoh, K. Fluorescence properties of chlorophyll b- and c-containing algae. In Govindjee et coll., Eds. Light emission by plants and bacteria. Academic Press: New York, 1986, pp.497-537.
- Graan, T. et Ort, D.R. Detection of oxygen-evolving photosystem II center inactive in plastoquinone reduction. Biochim. Biophys. Acta, 1986, 852, 320-330.
- Green, B.R. The chlorophyll-protein complexes of higher plant photosynthetic membranes. Photosynth. Res., 1986, 15, 3-32.
- Hames, B.D. et Rickwood, D. Gel electrophoresis of proteins.-A practical approach. Oxford: IRL Press, 1981, 10-145.
- Hampp, R. et Ziegler, I. Sulfate and sulfite translocation via the phosphate translocator of the inner envelope membrane of chloroplasts. Planta, 1977, 137, 309-312.
- Heathcote, P., Williams-Smith, D.L., Sihra, C.K. et Evans, M.C.W. The role of the membrane bound iron-sulfur centers A at B in the photosystem I reaction center of spinach chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta, 1978, 503, 333-342.
- Hodges, M. et Barber, J. Analysis of chlorophyll fluorescence induction kinetics exhibited by DCMU-inhibited thylakoids and the origin of a and b centers. Biochim. Biophys. Acta, 1986, 848, 239-246.
- Homann, P.H. The relation between the chloride status of the photosynthetic water splitting complex and the inhibitory effect of amines. Photosynth. Res., 1986, 10, 497-502.
- Homann, P.H. Cl-dependant binding of the extrinsic 23 kDa polypeptide at the water oxidizing site of chloroplast photosystem II. In J. Biggins (Ed.) Progress in Photosynthesis Research (Vol. I). Dordrecht: Martinus Nijhoff Publ. 1987a, pp. 5.657-5.660.
- Homann, P.H. The relations between the chloride, calcium and polypeptide requirements of photosynthetic water oxidation. J. Bioenerg. Biochem., 1987b, 19, 105-123.
- Horvath, G., Melis, A., Hideg, E., Droppa, M. et Vigh, L. Role of lipids in the organization and function of

- photosystem II studied by homogeneous catalytic hydrogenation of thylakoid membranes in situ. Biochim. Biophys. Acta, 1987, 891, 68-74.
- Hooper, J.K. Chloroplasts. New York: Plenum Press, 1984, pp. 20-89
- Hoyer-Hansen, G., Bassi, R., Honberg, L.S. et Simpson, D.J. Immunological characterization of chlorophyll-a/b-binding protein of barley thylakoids. Planta, 1988, 173, 12-21.
- Hsu, B.-D., Lee, J.-Y. et Pan, R.-L. The high affinity binding site for manganese on the oxidizing side of photosystem II. Biochim. Biophys. Acta, 1987, 890, 89-96.
- Huber, K., Esterbauer, Jager, H.-J. et Grill, D. Detection of sulphite in plants. Environm. pollut., 1987, 46, 127-136
- Ikeuchi, M. et Inoue, Y. Characterization of oxygen evolution by a wheat photosystem II reaction center: disjunction of secondary acceptor quinone and enhanced  $Ca^{++}$  demand. Arch. Biochem. Biophys., 1986, 247, 97-115.
- Imaoka, S., Akabori, K., Yanagi, M., Izumi, K., Toyoshima, A., Kawamori, A. et Sato, J. Roles of the three lumen-surface proteins in the formation of  $S_2$ -state and  $O_2$  evolution in photosystem II particles from spinach thylakoid membranes. Biochim. Biophys. Acta, 1986, 848, 201-211.
- Itoh, S. et Uwano, S. Characteristics of the  $Cl^-$  action site in the  $O_2$  evolving reaction in PSII particles. Plant Cell Physiol., 1986, 27, 25-36.
- Itoh, S., Yerkes, C.T., Koike, H., Robinson, H.H. et Crofts, A.R. Effect of chloride depletion on electron donation to the water-oxidizing complex to the photosystem II reaction center as measured by the microsecond rise of chlorophyll fluorescence in isolated pea chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta, 1984, 766, 612-622.
- Izawa, S., Muallem, A. et Ramaswamy, N.K. Chloride ion-sensitive inactivation of oxygen evolving centers. In Y. Inoue (Ed.) The Oxygen Evolving System of Photosynthesis. Tokyo: Academic Press, 1983, pp. 293-302.
- Jacobson, J.S., Troiano, J.J., Heller, L.I. et Osmeloski, L. Effect of fertilizer on the growth of radish plants exposed to simulated acidic rain containing different sulfate to nitrate ratios. Environm. Poll., 1987, 44, 71-79.
- Jensen, A. Chlorophylls and carotenoids. In J.A. Hellebust et J.C. Craigie (Eds). Handbook of phycolgical methods, physiological methods and biochemical methods. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1978, pp 59-70.
- Joliot, P. et Kok, B. Oxygen evolution in photosynthesis. In Govindjee (Ed.), Bioenergetics of Photosynthesis. New York: Academic Press, 1975, pp.387-412.
- Junge, W. et Jackson, J.B. The development of electrochemical potential gradients across photosynthetic membranes. In Govindjee (Ed.), Photosynthesis (Vol. 1)

- New York: Academic press, 1982, pp. 598-646.
- Jursinic, P. et Stemler, A. Multiple anion effects on photosystem II in chloroplast membranes. Photosynth. Res., 1988, 15, 41-56.
- Jursinic, P. Arch. Biochem. Biophys., 1979, 196, 484-492.
- Karukstis K.K. et Sauer K. The effects of cation-induced and pH-induced membrane stacking on chlorophyll fluorescence decay kinetics. Biochim. Biophys. Acta, 1985, 806, 374-388.
- Katase, M., Ushijima, T. et Tazake, T. The relationship between absorption of sulfur dioxide and inhibition of photosynthesis in several plants. Bot. Mag. Yokyo, 1983, 96, 1-13.
- Kelley, P. et Izawa, S. Effects of chloride ion in photosystem II: I. Effects of chloride ion on photosystem II electron transport and on hydroxylamine inhibition. Biochim. Biophys. Acta, 1978, 725, 198-210.
- Kleinbaum, D.G. et Kupper, L.L. In Service to publishers Inc. (Ed.) Applied regression analysis and other multivariate methods. North Scituate: Duxbury Press, 1978, pp. 72-94.
- Klimov, V.V., Klevanik, A.V. et Shuvalov, V.A. Reduction of pheophytin in the primary light reaction of photosynthesis. FEBS Lett., 1977, 82, 183-186.
- Krause, G.H. et Weis, E. Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II, Interpretation of fluorescence signals. Photosynth. Res., 1984, 5, 139-157.
- Kropff, M.J. Physiological effect of sulfur dioxide. 1. The effect of SO<sub>2</sub> on photosynthesis and stomatal regulation on *Vicia faba* L. Plant Cell Envir., 1987, 10, 753-760.
- Kuwabara, T., Miyao, M., Murata, T. et Murata, N. The function of the 33 kDa in the photosynthétique system studied by reconstitution experiments. Biochim. Biophys. Acta, 1985, 806, 283-289.
- Kuwabara, T. et Murata, N. Inactivation of photosynthetic O<sub>2</sub> evolution concomitant release of the three polypeptides in the photosystem II particles of spinach chloroplasts. Plant cell Physiol., 1982, 23, 533-541.
- Kuwabara, T. et Murata, N. In: Y. Inoue (Ed), The Oxygen Evolving Complex of Photosynthesis. Tokyo: Academic Press, 1983a, pp. 223-228.
- Kuwabara, T. et Murata, N. Quantitative analysis of the inactivation of photosynthetic oxygen evolution and the release of polypeptides and manganese in the photosystem II particles of spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol., 1983b, 24, 741-747.
- Kuwabara, T. Reddy, K.J. et Sherman, L.A. Nucleotide sequence of the gene from the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2 encoding the Mn-stabilizing protein involved in photosystem II water oxidation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 8230-8234.
- Kyle, D.J., Ohad, I., Guy, R. et Arntzen, C.J. Assignemnt of function to polypeptides of 32-34 kilodaltons in thylakoids. In Y. Inoue (Ed.), The Oxygen Evolving system of photosynthesis. Tokyo:

- Academic Press, 1983, pp.
- Kylin, A. The incorporation of radio-sulfur from external sulphate into different sulphur fractions of isolated leaves. Physiol. Plant., 1960, 13, 366-379.
- Lam, E. et Malkin, R. Topography of the protein complexes of the chloroplast thylakoid membrane. Plant Physiol., 1985, 79, 1118-1124.
- Lavorel, J., Breton, J. et Lutz, M. Methodological principles of measurement of light emitted by photosynthetic systems. In J. Barber (Ed.), Light Emission by plants and bacteria. New York: Academic Press, 1986, 57-99.
- Lavorel, J. Matrix analysis of the oxygen evolving system of photosynthesis. J. Theor. Biol., 1976, 57, 171-185.
- Lendzian, K.J., Unsworth, M.H. Ecophysiological effects of atmospheric pollutants. In O.L. Lange et coll., (Eds.), Physiological Plant Ecology IV. Ecosystem Processes: Minerla cycling, productivity and man's influence. Berlin: Springer-Verlag, 1983, pp. 466-491.
- Leonova, T.G. et Stroganov, B.P. Growth of Dunaliella maritima at high sodium sulfate concentrations in the medium. Fiziol. Rast., 1985, 32, 573-578.
- Machold, O. et Meister, A. Resolution of the LHC a/b-protein of vicia faba chloroplasts into 2 different chl-protein complexes. Biochim. Biophys. Acta, 1979, 546, 472-480.
- Malhotra, S.S. et Khan, A.A. Sensitivity to SO<sub>2</sub> of various metabolic processes in an epiphytic lichen, Evernia mesomorpha. Biochem. Physiol. Pflanzen, 1983, 178, 121-130.
- Mansfield, R.W. et Evans, M.C.W. Optical difference spectrum of the electron acceptor A<sub>0</sub> in photosystem I. FEBS Lett., 1985, 190, 237-241.
- Marques, I.A. et Anderson, L.E. Effects of arsenite, sulfite, and sulfate on photosynthetic carbon metabolism in isolated pea (Pisum sativum L., cv Little Marvel) chloroplasts. Plant Physiol., 1982, 82, 488-493.
- Masojidek, J., Droppa, M. et Horvath, G. Biochim. Biophys. Acta, 1987, 894, 49-58.
- McCauley, S.W., Melis, A., Tang, G.M.-S. et Arnon, D.I. Protonophores induce plastoquinol oxidation and quench chloroplast fluorescence: Evidence for a cyclic, proton conducting pathway in oxygenic photosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 8424-8428.
- McClintock, M., Higinbotham, E.G., Uribe, R.E. et Cleland, R.E. Active, irreversible accumulation of extrem levels of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in the brown alga, Dasmarestia. Plant Physiol., 1982, 70, 771-774.
- Melis, A. Functional properties of photosystem IIb in spinach chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta, 1985, 808, 334-342.
- Melis, A. et Duysens, L.N.M. Biphasic energy conversion kinetics and absorbance difference spectra of photosystem II of chloroplasts. Evidence for two different photosystem II reaction centers. Biochim. Biophys. Acta,

- 1979, 29, 373-382.
- Melis, A. et Harvey, G.W. Regulation of photosystem stoichiometry, chlorophyll a and b content and relation to chloroplast ultrastructure. Biochim. Biophys. Acta, 1981, 637, 138-145.
- Melis, A. et Homann, P. Kinetic analysis of the fluorescence induction in 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea poisoned chloroplasts. Photochem. Photobiol., 1975, 21, 431-437.
- Melis, A. et Homann, P.H. Heterogeneity of the photochemical centers in system II of chloroplasts. Photochem. Photobiol., 1976, 23, 343-350.
- Melis, A. et Homann, P.H. Selective effect of  $Mg^{2+}$  on the photochemistry at one type of reaction center in photosystem II of chloroplast. Arch. Biochem. Biophys., 1978, 190, 523-530.
- Metzner, U., Hankem, T. et Hebert, B. Studies on the mechanism of sulfite toxicity. Effect of sulfite on ESR signals of isolated thylakoids. Studia Biophys., 1987, 118, 25-34.
- Meunier, P.C. et Popovic, R. Optimization of the bare platinum electrode as an oxygen measurement system in photosynthesis. Photosynth. Pes., 1988b, 15, 271-279.
- Meunier, P.C. et Popovic, R. High-accuracy polarography for photosynthetic systems. Rev. Sci. Instr., 1988a, 59, 486-491.
- Michel, H. et Deisenhofer, J. Relevance of the photosynthetic reaction center from purple bacteria to the structure of photosystem II. Biochem., 1988, 27, 1-7.
- Michel, J.-M. et Sironval, C. Evidence for induction of photosystem II activity in primary thylakoids when illuminated with continuous light for a short time. FEBS Lett., 1972, 27, 231-234.
- Miszalski, Z. Photochemical activity of chloroplasts isolated from  $SO_2$ -fumigated leaves in relation to changes in RuDPC activity. Bull. Acad. Pol. Sci. Cl., 1983, 29, 484-488.
- Mitchell, F. Coupling of photophosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. Nature, 1961, 191, 144-148.
- Miyao, N. et Murata, M. Calcium ions can be substituted for the 24 kDa polypeptide in photosynthetic oxygen evolution. FEBS Lett., 1984, 166, 118-120.
- Morissette, J.-C., Meunier, P.C. et Popovic, R. Automatic integrating fluorometer using an Apple-II and Scope-85. J. Sci. Instr., 1988, 59, 934-936.
- Morissette, J.-C. et Popovic, R. A new method for the separation of the constant and variable fluorescence of chlorophyll in *in vivo*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1987, 149, 385-390.
- Muallem, A. et Izawa, S. Inactivation of the  $O_2$  evolving mechanism by exogenous  $Mn^{2+}$  on  $Cl^-$  depleted chloroplasts. FEBS Lett., 1980, 115, 49-53.
- Murata, N., Miyao, M. et Kuwabara, T. Organization of the

- photosynthetic oxygen evolving system. In Y. Inoue et coll. (Eds.), The oxygen evolving system of photosynthesis. Tokyo: Academic Press, 1983, pp. 213-222.
- Murata, N. et Sugahara, K. Control of excitation transfer in photosynthesis III. Light-induced decrease of chlorophyll *a* fluorescence related to photophosphorylation system in spinach chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta, 1969, 189, 182-192.
- Nanba, O. et Satoh, K. Isolation of photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome b-559. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 109-112.
- Nelson, N. Structure, function, and evolution of proton-ATPases. Plant Physiol., 1988, 86, 1-3.
- Nevell, W. et Wainwright, M. Seasonal changes in the sulphate content of deciduous woodland soils exposed to atmospheric pollution. Environm. Poll., 1987, 47, 195-204.
- Nickless, G. Inorganic sulfur chemistry New York: Elsevier, 1968, pp. 514-517.
- Nieboer, E., Ridcharson, D.H.S., Puckett, K.J. et Tamassini, F.D. The phytotoxicity of sulfur dioxide in relation to measurable responses in lichens. In T.A. Mansfield (Ed.) Effect of air pollutants on plants. Cambridge: Cambridge University Press, 1976, pp. 27-35.
- O'Connor, C.J., Coldham, J.K.J. et Spedding, D.J. Uptake of <sup>35</sup>sulfur from thiosulfate by isolated spinach chloroplasts. J. Plant Physiol., 1986, 125, 137-145.
- Olszyk, D.M. et Tingey, D.T. Phytotoxicity of air pollutants. Evidence for the detoxification of SO<sub>2</sub> but not O<sub>3</sub>. Plant Physiol., 1984, 74, 999-1005.
- Omasaka, K., Shimazaki, K.-I., Aiga, I., Larcher, W. et Onoe, M. Image analysis of chlorophyll fluorescence transients for diagnosing the photosynthetic system of attached leaves. Plant Physiol., 1987, 84, 748-752.
- Ono, T. et Inoue, Y. Requirement of divalent cations for photoactivation of the latent FEBS Lett., 1983, 164, 255-260.
- Ono, T.-A., Kajikawa, H. et Inoue, Y. Changes in protein composition and Mn abundance in photosystem II particles on photoactivation of the latent O<sub>2</sub>-evolving system in flash-grown leaves. Plant Physiol., 1986a, 80, 85-90.
- Ono, T.-A., Nakayama, H., Gleiter, H., Inoue, Y. et Kawamori, A. Modification of the properties of S<sub>2</sub>-state in photosynthetic O<sub>2</sub>-evolving center by replacement of chloride with other anions. Arch. Biochem. Biophys., 1987, 256, 618-624.
- Ono, T., Zimmermann, J.L., Inoue, Y. et Rutherford, A.W. EPR evidence of a modified S-state transition in chloride-depleted photosystem II. Biochim. Biophys. Acta, 1986b, 851, 193-201.
- Ortiz, W., Lam, E., Chollar, S., Munt, D. et Malkin, S. Topography of the protein complexes to the chloroplasts thylakoid membrane. Studies of photosystem I using a chemical probe and protolytic digestion. Plant Physiol.,

- 1985, 77, 389-397.
- Owens, T. G. Photosystem II heterogeneity in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. Photochem. Photobiol., 1986, 43, 535-544.
- Pakrasi, H.B., Williams, J.G.K. et Arntzen, C.J. Targeted mutagenesis of the psbE and psbF genes blocks photosynthetic electron transport: evidence for a functional role of cytochrome b559 in photosystem II. EMBO J. 1988, 7, 325-332.
- Papageorgiou, G. Chlorophyll fluorescence: An intrinsic probe of photosynthesis. In Govindjee (Ed.) Bioenergetic of Photosynthesis. New York: Academic Press, 1975, pp. 319-371.
- Pearlstein, R.M. Chlorophyll singlet excitons. In Govindjee (Ed.) Photosynthesis I. Energy conversion by plants and bacteria. New York: Academic Press, 1982, pp. 293-330.
- Percival, M.P., Webber, A.N. et Baker, N.R. Evidence for the role of light-harvesting chlorophyll a/b protein complex in photosystem II heterogeneity. Biochim. Biophys. Acta, 1984, 767, 582-589.
- Plumley, F.G. et Schmidt, G.W. Reconstitution of chlorophyll a/b light-harvesting complexes: Xanthophyll-dependent assembly and energy transfer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 146-157.
- Popovic, R., Beauregard, M. et Leblanc, R.M. Photosynthetic action spectra of the energy storage in bundle sheath of *Zea mays*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1987a, 144, 198-202.
- Popovic, R., Beauregard, M. et Leblanc, R.M. Study of energy storage in bundle sheath cells of *Zea mays*. Plant Physiol., 1987b, 84, 1437-1441.
- Popovic, R., Bruce, D., Colbow, K. et Vidaver, W. A study of the flash-induced 518 nm absorbance change kinetics under anaerobic conditions. Photochem. Photobiol., 1984, 40, 377-380.
- Popovic, R., Leblanc, R.M. et Beauregard, M. Photoacoustic studies of bundle sheath cell photosynthesis in *Zea mays*. J Plant Physiol., 1988, 132, 94-97.
- Popovic, R., Kyle, D.J., Cohen, A.S. et Zalik, S. Stabilization of thylakoid membranes by spermidine during stress-induced senescence of barley leaf discs. Plant Physiol., 1979, 64, 721-726.
- Post, F.J. The microbial ecology of the Great Salt lake. Microb. Ecol., 1977, 3, 143-165.
- Preston, C., Mackie, N.D. et Critchley, C. Differential thylakoid membrane stacking in mangrove and spinach. In J. Biggins (Ed.) Progress in photosynthesis Research (Vol.2). Dordrecht: Martinus Nijhoff Publ., 1987, pp. 3.273-3.276.
- Radmer, R. et Ollinger, O. Topography of the O<sub>2</sub>-evolving site determined with water analogs. FEBS Lett., 1983, 152, 39-43.
- Remy, R. Appearance and development of photosynthetic activities in wheat atoplasts greened under continuous or

- intermittent light. -Evidence for water-side deficiency after greening under intermittent light. Photochem. Photobiol., 1973, 18, 409-416.
- Renger, G. et Schulze, A. Quantitative analysis of fluorescence induction curves in isolated spinach chloroplasts. Photobiochem. Photobiophys., 1985, 9, 79-87.
- Rennenberg, H. The fate of sulfate in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol., 1984, 35, 121-153.
- Samson, G., Morissette, J.-C. et Popovic, R. Cooper quenching of the variable fluorescence in Dunaliella tertiolecta. New evidence for the copper inhibition effect on oxidizing side of PSII. Photosynth. Res., sous presse.
- Sandusky, P.O., Selvius-DeRoo, C.L., Hicks, D.B., Yocum, C.F., Ghanotakis, D.F. et Babcock, G.T. Electron transport activity and polypeptide composition of the isolated evolving photosystem II complex. In Y. Inoue et coll. (Eds.), The Oxygen Evolving System of Photosynthesis. Tokyo: Academic Press Japan, 1983, pp. 189-199.
- Sandusky, P.O. et Yocum, C.F. Analysis of the effects of  $\text{Cl}^-$  and other anions on the amine inhibition of the  $\text{O}_2$ -evolving complex. Biochim. Biophys. Acta, 1984, 766, 603-611.
- Sandusky, P.O. et Yocum, C.F. The  $\text{Cl}^-$  requirement for photosynthetic oxygen evolution: factors affecting nucleophilic displacement of  $\text{Cl}^-$  from the oxygen evolving complex. Biochim. Biophys. Acta, 1986, 849, 85-91.
- Sato, K. Protein-pigments and photosystem II reaction center. Photochem. Photobiol., 1985, 42, 845-853.
- Sauer, K. Charge separation in the light reactions of photosynthesis. In G. Akoyunoglou (Ed.) Photosynthesis III (Vol. III). Philadelphia: Balban Internat. Sci. Services, 1981, pp. 685-700.
- Schatz, G.H. et Holzwarth, A.R. Mechanism of chlorophyll fluorescence revisited: Prompt or delayed emission from photosystem II with closed reaction centers? Photosynth. Res., 1986, 10, 309-318.
- Schreiber, U. et Neubauer, C. The polyphasic rise of chlorophyll fluorescence upon onset of strong continuous illumination: II. Partial control by the photosystem II donor side and possible ways of interpretation. Z. Naturforsch., 1987, 42c, 1255-1264.
- Seibert, M., DeWit, M. et Staehelin, L.A. Structural localization of the  $\text{O}_2$ -evolving apparatus to multimeric (tetrameric) particles on the lumenal surface of freeze-etched photosynthetic membranes. J. Cell Biol., 1987, 105, 2257-2265.
- Shimazaki, K.I., Ito, K., Kondo, N. et Sugahara, K. Reversible inhibition of the photosynthetic water-splitting enzyme system by  $\text{SO}_2$ -fumigation assayed by chlorophyll fluorescence and EPR signal in vivo. Plant Cell Physiol., 1984a, 25, 795-803.

- Shimazaki, K., Nakamachi, K., Kondo, N. et Sugahara, K. Sulfite inhibition of photosystem II in illuminated spinach leaves. Plant Cell Physiol., 1984b, 25, 337-341.
- Shimazaki, K.I. et Sugahara, K. Inhibition site of the electron transport system in lettuce chloroplasts by fumigation of leaves with SO<sub>2</sub>. Plant Cell Physiol., 1980, 21, 125-135.
- Silvius, J.E., Ingle, M. et Baer, C.H. Sulfur dioxide inhibition of photosynthesis in isolated spinach chloroplasts. Plant Physiol., 1975, 56, 434-437.
- Sinclair, J. The influence of anions on oxygen evolution by isolated spinach chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta, 1984, 764, 247-252.
- Sironval, C., Brouers, M., Michel, J.M. et Kuiper, Y. The reduction of protochlorophyllide into chlorophyllide. Photosynthetica, 1968, 2, 268-287.
- Sironval, C., Franck, F., Gysemberg, R., Bereza, B. et Dujardin, E. The Franck-Inoue chlorophyllide microcycle II in vivo and in vitro. In C. Sironval et M. Brouers (Eds.), Protochlorophyllide reduction and greening. The Hague: Martinus Nijhoff Publ., 1984, pp. 197-222.
- Staehelin, L.A. Chloroplast structure and supramolecular organization. In L. A. Staehelin et C.J. Arntzen (Eds.) Photosynthesis III (Encyclopedia of Plant Physiology Vol. 19). Heidelberg: Springer-Verlag, 1986, pp. 48-57.
- Strasser, R.J. et Sironval, C. Correlation between the induction of oxygen evolution and of variable fluorescence in flashed bean leaves. Plant Sci. Lett., 1974, 3, 135-141.
- Takahashi, M., Shiraishi, T. et Asada, K. Isolation of the D1 protein and a 28-kDa fragment of the D2 protein from spinach photosystem II membrane. Plant Cell Physiol., 1988, 29, 109-116.
- Theg, S.M., Ghiang, G. et Dilley, R.A. Protons in the thylakoid membrane-sequestered domain can directly pass through the coupling factor during ATP synthesis in flashing light. J. Biol. Chem., 1988, 262, 673-681.
- Theg, S.M., Jusrsinic, P.A. et Homann, P.H. Studies on the mechanism of chloride action on photosynthetic water oxidation. Biochim. Biophys. Acta, 1984, 766, 636-646.
- Thibault, P. A new attempt to study the oxygen evolving system of photosynthesis: Determination of transition probabilities of a State i. J. Theor. Biol., 1978, 73, 271-284.
- Thielen, A.P.G.M. et VanGorkom, H.J. Redox potential of electron acceptors in photosystem IIa and IIb. FEBS Lett., 1981, 129, 205-209.
- Trebst, A. Organization of the photosynthetic electron transport system of chloroplasts in the thylakoid membrane. In G. Schafer et M. Klingenberg (Eds.), Colloquium der Gesellschaft für biologische Chemie. Berlin: Springer-Verlag, 1978, pp. 84-95.
- Vallon, O., Wollman, F.A. et Olive, J. Distribution of photosystem II between appressed and non-appressed region

- of thylakoid membrane: an immunocytochemical study. FEBS Lett., 1985, 183, 245-250.
- Van Gorkom H. Fluorescence measurements in the study of photosystem II electron transport. In J. Barber (Ed.), Light Emission by Plants and Bacteria. New York: Academic Press, 1986, pp. 267-289 .
- Vass, I., Ono, T. et Inoue, Y. Stability and oscillation properties of thermoluminescent charge pairs in the O<sub>2</sub> evolving system depleted of Cl<sup>-</sup> on the 33 kDa extrinsic protein. FEBS Lett., 1987, 211, 215-220.
- Velthuys, B. Mechanism of electron flow in photosystem II and toward photosystem I. Ann. Rev. Plant Physiol., 1980, 31, 545-567.
- Velthuys, B.R. et Kok, B. Photosynthetic oxygen evolution from hydrogen peroxide. Biochim. Biophys. Acta, 1978, 502, 211-221.
- Volker, M., Ono, Y., Inoue, Y. et Renger, G. Effect of trypsin on PS-II particles. Correlation between Hill-activity, Mn-abundance and peptide pattern. Biochim. Biophys. Acta, 1985, 806, 25-34.
- Walker, D.A., Cerovic, Z.G. et Robinson, S.P. Isolation of intact chloroplasts: General principles and criteria of intactness. In Methods in Enzymology (Vol. 148), New York: Academic Press, 1987, pp. 145-179.
- Watanabe, T., Kobayashi, M., Hongu, A., Nakazato, M., Hiyama, T. et Murata, N. Evidence that chlorophyll a' dimer constitutes the photochemical reaction center I (P700) in photosynthetic apparatus. FEBS Lett., 1985, 191, 252-256.
- Weast, R.C. (Ed.) CRC Handbook of chemistry and physics (62nd ed.). Florida: CRC Press Inc., 1981, pp. D-135-139.
- Weis, E. Chlorophyll fluorescence at 77 K in intact leaves: Characterization of a technique to eliminate artifacts related to self-absorption. Photosynth. Res., 1985, 6, 73-86.
- Wellburn, A.R. Ion chromatographic determination of levels of anions in plants from fumigated and non-fumigated barley seedlings. New phytol., 1985, 100, 329-339.
- Witt, H.T. Primary acts of energy conservation in the functional membrane of photosynthesis. In Govindjee (Ed.), Bioenergetics of Photosynthesis, New York: Academic Press, 1975, pp. 493-554.
- Witt, H.T., Saygin, G., Brettel, K. et Schlodder, E. On the cleavage of water. In J. Biggins (Ed.), Progress in Photosynthesis Research (Vol.1). Dordrecht: Martinus Nijhoff Publ., 1987, pp. 1.5.523-531.
- Wydrzynski, T.J. Oxygen evolution in photosynthesis. In Govindjee (Ed.) Photosynthesis III (Vol.1) Energy conversion by plants and bacteria. New York: Academic Press, 1982, pp. 467-506.