

**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC**

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE**

**PAR  
ALFRED BOGRAH**

**EFFETS DES ANIONS INORGANIKES, DES POLYAMINES, ET DU  
CHOLESTÉROL SUR LES STRUCTURES SECONDAIRES DES PROTÉINES  
DU PHOTOSYSTÈME II**

**MARS 1998**

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.

## RÉSUMÉ

L'un des principaux rôles que jouent les plantes dans notre biosphère est la production de l'oxygène par la photosynthèse. La photosynthèse résulte principalement de la capture de l'énergie lumineuse par les chlorophylles. L'énergie lumineuse captée est ensuite convertie en molécules riches en énergie. Cette réaction photochimique fondamentale conduit à la synthèse d'innombrables composés organiques servant en premier niveau dans la chaîne alimentaire de tous les animaux et de la plupart des micro-organismes. Pour accomplir cette importante production primaire, les plantes utilisent 1% de l'énergie solaire reçue; elles recyclent annuellement le dixième du volume de l'atmosphère terrestre tout en produisant 300 milliards de tonnes de matière organique.

Afin de fonctionner et vivre, les cellules vivantes tirent leur énergie de deux sources. L'une des sources est essentiellement de la lumière solaire, l'autre source est celle des aliments (éléments minéraux, etc.) ou des deux (Heller et al., 1993). Les cellules végétales synthétisent aussi les substances telles que les polyamines. Ces substances jouent un rôle très important au niveau de plusieurs fonctions biologiques (Phillip et Russel, 1989). Elles se lient aux acides nucléiques et aux phospholipides des membranes, stabilisent la structure des protéines et règlent l'activité photosynthétique du photosystème II (PSII) (Grimes et al., 1986; Kim et Heinrich, 1995).

Le PSII comporte un système enzymatique qui produit l'oxygène photosynthétique. Ce système comporte une chaîne de transfert d'électrons et un site catalytique d'oxydation de l'eau situé à l'extrémité de cette chaîne. Le PSII contient le mécanisme de l'oxydation de l'eau.

Dans ce travail, c'est ce PSII que nous avons étudié. Il a été traité avec les polyamines, les anions inorganiques, et le cholestérol. Ce traitement a été effectué dans le but d'étudier les interactions moléculaires de ces substances avec le PSII, les changements structuraux, les changements de conformation des protéines du PSII. Nous avons aussi observé les effets de ces substances sur la fonction du dégagement d'oxygène du PSII.

Plusieurs travaux ont été effectués ces dernières années pour étudier les effets de certaines substances sur les structures des protéines du PSII. Parmi ces travaux nous pouvons citer ceux effectués par Ahmed et al., 1993; Tajmir et Ahmed, 1993; Nahar et Tajmir, 1996. Les travaux effectués par Tajmir et Ahmed, 1993 avec les ions de cuivre et de zinc; Nahar et Tajmir, 1996 sur les cations

métalliques Hg, Cd, et Pb. Ces travaux indiquent qu'en présence de ces substances, le PSII subit des changements de conformations à partir de certaines concentrations. Ces substances interagissent avec les protéines du PSII en provoquant des changements de structures et des changements de conformations.

Plusieurs autres travaux ont aussi été effectués dans le but d'observer les effets des substances sur la fonction de dégagement du PSII. On peut citer les travaux effectués par Papageorgiou et Lagoyanni, (1990) avec anions ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  et  $\text{NO}_3^-$ ) et les travaux effectués par Stanek, (1991) avec anions ( $\text{Cl}^-$ , et  $\text{NO}_3^-$ ). Ces travaux ont permis à ces chercheurs d'observer que les anions  $\text{I}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  et  $\text{NO}_3^-$  affectent la fonction de dégagement d'oxygène du PSII.

Malgré le nombre de travaux qui ont été réalisés jusqu'à ce jour sur le PSII, aucune corrélation n'a été établie entre sa structure et sa fonction de dégagement d'oxygène.

Afin de combler ce vide, nous avons effectué dans ce travail une étude qui nous a permis d'établir une corrélation entre la structure et la fonction du dégagement d'oxygène du PSII. Pour établir cette corrélation, avons utilisé comme substances les anions inorganiques, les polyamines, et le cholestérol. Les concentrations de ces substances sont comprises entre 0.01 et 20 mM. L'étude a été effectuées principalement dans les régions de 1800 à 1500  $\text{cm}^{-1}$  (région de l'amide I et l'amide II).

Les méthodes les plus fiables généralement utilisées pour l'étude des protéines du PSII sont : la résonance magnétique (RMN), le dichroïsme circulaire (DC), la spectroscopie Raman, etc. Ces différentes techniques apportent d'importantes informations sur la structure moléculaire des protéines. Mais ces techniques comportent des inconvénients qui rendent limité le type de molécules étudiés (Ahmed, 1996).

Les méthodes d'analyses utilisées dans ce travail sont la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et la méthode de dégagement d'oxygène. La spectroscopie FTIR est une méthode d'analyse assez récente dont la particularité réside dans la qualité des spectres qu'on obtient. Contrairement aux autres spectroscopies citées plus haut, elle nécessite généralement une petite quantité de protéines autour de 1 mM qui peuvent être dans divers types d'environnements telles les solutions aqueuses, les lipides. Elle peut aussi être en cristaux, ou encore dans les solvants organiques. On peut utiliser la spectroscopie FTIR pour tous les types de molécules, de pigments, de protéines ou de produits synthétiques (Dong et al., 1990).

La spectroscopie FTIR est donc une méthode très efficace dans l'étude de la conformation des protéines en solution à cause de sa grande sensibilité à la conformation de la bande amide I (qui apparaît entre 1700 et 1612  $\text{cm}^{-1}$ ). Cette bande est due aux vibrations d'élongation du groupement C=O. Combinée avec les autres techniques qui sont la dérivée seconde, la déconvolution et la simulation spectrale, la spectroscopie FTIR fournit d'importantes informations sur la structure des protéines. En outre, les informations sur la conformation tirée de la bande amide I mènent à discerner les corrélations qui existent entre les types de conformations spécifiques et les composantes des bandes dans la région de l'amide I.

La spectroscopie infrarouge FTIR et la méthode de dégagement d'oxygène ont donc occupé une place de choix dans ce travail. Les effets sur la structure ont été observés à partir de la spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (FTIR) tandis que les effets sur la fonction du dégagement d'oxygène ont été observés avec la méthode du dégagement d'oxygène.

Les résultats obtenus à partir de ces deux méthodes d'analyse nous ont permis de constater qu'au niveau de la structure, les substances utilisées (certains anions inorganiques, les PAs tels que la Spm, la Spd ainsi que le cholestérol) interagissent avec les protéines du PSII. Ces interactions provoquent des changements de conformation et des changements structuraux à certaines concentrations. Au niveau de la fonction ces substances affectent le dégagement d'oxygène en entraînant une inhibition de ce dernier à partir de certaines concentrations (Bograh et al., 1997).

Ainsi, nous avons observé avec la spectroscopie FTIR, de faibles liaisons hydrogènes, des interactions des anions ( $\text{NO}_3^-$  et  $\text{I}^-$ ), les polyamines (PAs), et le cholestérol avec les protéines du PSII à des concentrations entre 0.01 et 0.1 mM. Par contre rien a été observé avec les anions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Br}^-$ . Les liaisons avec les anions, les PAs, et le cholestérol se font principalement via le groupement carbonyle des protéines à faibles concentrations. À fortes concentrations, on observe des liaisons avec les groupements C=O et C=N des protéines. Nous avons aussi observé des changements de conformations des anions tels  $\text{NO}_3^-$ , et  $\text{I}^-$ , des PAs et du cholestérol à des concentrations comprises entre 5 et 20 mM. Des déplacements de bandes au cours de ces changements de conformation des structures secondaires du PSII ont aussi été observés. Des liaisons avec la tyrosine ont été observés avec les anions ( $\text{NO}_3^-$ , et  $\text{I}^-$ ), les PAs, et le cholestérol.

Avec la spectroscopie FTIR, nous avons utilisé les techniques de la dérivée seconde et la simulation spectrale. Ces deux techniques nous ont permis de déterminer les proportions des structures secondaires de la bande amide I présentes dans le PSII non traité. Nos résultats indiquent que la bande amide I du

PSII contient en proportion, 47% d'hélice- $\alpha$ , 11% feuillet- $\beta$ , 19% de coude, 16% en structure non ordonnée, et finalement 7% en structure  $\beta$ -antiparallèle (Bograh et al., 1997).

Les changements intervenus au sein du PSII sur la structure ont entraîné une diminution de la quantité (pourcentage) de l'hélice- $\alpha$  présents dans le PSII non traité et l'augmentation de la quantité des autres sous-structures telles que le feuillet- $\beta$ , le  $\beta$ -antiparallèle, structure non ordonnée et celle en forme de coude. Ces observations nous indiquent que la structure du PSII est profondément affectée par les solutés présents dans leurs environnements. Nos résultats indiquent que ces changements varient en fonction des solutés présents dans le PSII et de leurs concentrations.

De la même façon qu'en FTIR, nous avons observé avec la méthode de dégagement d'oxygène, une augmentation du taux d'inhibition du dégagement d'oxygène avec l'augmentation de la concentration en solutés. Dans le cas des anions  $\text{Cl}^-$  et de  $\text{Br}^-$ , le dégagement d'oxygène n'est pas affecté. Par contre il l'est avec les anions  $\text{I}^-$  et de  $\text{NO}_3^-$  avec lesquels il atteint respectivement 77% et 38% avec une concentration de 20 mM. Dans le cas de la Spm et de la Spd, il atteint 100% avec une concentration de 1 mM. Dans le cas du cholestérol il atteint 33% avec une concentration de 20 mM.

Nos résultats indiquent que les changements de conformation et les changements structuraux provoqués par les substances utilisées dans le PSII, entraînent l'inhibition de la fonction de dégagement d'oxygène du PSII. C'est le cas avec les anions ( $\text{I}^-$  et  $\text{NO}_3^-$ ), les polyamines (Spm, Spd), et le cholestérol. Nous avons aussi observé que la fonction du dégagement d'oxygène pouvait être inhibée sans que la structure du PSII ne soit affectée. Cela a été observé avec les polyamines à une concentration de 0.01 mM avec les PAs.

Les effets observés (l'un sur la structure et l'autre sur la fonction) ont donc permis d'établir la corrélation entre la structure et la fonction du PSII.

Les changements de conformation et les changements structuraux des protéines secondaires du PSII en présence des substances utilisées provoquent systématiquement une inhibition de la fonction de dégagement d'oxygène au niveau du PSII. Tandis qu'une inhibition du dégagement d'oxygène n'induit pas forcément des changements de conformations.

Ce travail démontre une fois de plus l'efficacité des méthodes utilisées (spectroscopie infrarouge FTIR et méthode de dégagement d'oxygène). La spectroscopie infrarouge FTIR a permis de confirmer la structure secondaire des protéines et de suivre les changements relatifs de ces mêmes structures. La

méthode de dégagement d'oxygène a permis de mesurer le taux d'inhibition au sein du PSII.

## REMERCIEMENTS

Ce travail est l'aboutissement de longs efforts et de grands travaux de recherche. Ces efforts auraient été vains n'eurent été les encouragements et les conseils et la collaboration de certaines personnes auxquelles il doit d'être très reconnaissant. C'est la raison pour laquelle, je voudrais témoigner ici ma reconnaissance envers elles. Mes remerciements s'adressent d'abord aux *Hiérarchies* sous lesquelles j'ai eu la chance d'apprendre, de comprendre et de réaliser ce travail intellectuel. Ensuite à mes parents qui m'ont soutenu jusqu'ici. Ces mêmes remerciements s'adressent également à mon Directeur de projet (le Professeur *Robert Carpentier*, Ph.D.), mon codirecteur de projet (le Docteur *Tajmir-Riahi Heidar Ali*, Ph.D.), pour toute l'attention, tous leurs conseils et le support inestimable qu'ils ont su m'apporter tout au long de ce travail de recherche. Il me fait aussi plaisir de remercier les personnalités de mon pays qui ont bien voulu m'aider et me soutenir tout au long de mon séjour au Canada. À tous, j'exprime un remerciement spécial pour leur soutien moral et constant durant mes études supérieures ici.

Toujours dans le même esprit, je remercie tous mes amis pour le soutien qu'ils m'ont apporté. Pour terminer, je remercie tous ceux et celles qui de près ou de loin ont collaboré à la réalisation de ce travail ainsi qu'à ceux et celles dont l'aide au laboratoire m'a été très bénéfique. Ce sont *Yves Gingras, Jean-François Neault, Jacob Ségui, Dr. Lucie Lorrain* et tous les autres. ***Grand merci à tous!***



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADP:	adénosine diphosphate
ATP:	adénosine triphosphate
CChl:	concentration en chlorophylle
CDO:	complexe de dégagement d'oxygène
Chl:	chlorophylle
CYT $b_6f$ :	cytochrome $b_6f$
DCBQ:	2,5 dichloro-p-benzoquinone
DCMU:	3-(3,4-dichlorophényl)-1,1 diméthylurée
DMSO:	diméthylsulfoxyde
Fd:	ferrédoxine
Fp:	ferrédoxine $\text{NADP}^+$ réductase
FTIR:	spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier
LHC-I:	complexe collecteur de lumière associé au PSI
LHC-II:	complexe collecteur de lumière associé au PSII
NADP:	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
PAs:	polyamines
PC:	plastocyanine
Pch:	phosphatocyanine
Ph:	phéophytine
Pi:	phosphate inorganique
PMSF:	phénylméthylsulfonyl fluoride
PQ:	plastoquinone

PSI:	photosystème I
PSII:	photosystème II
Put:	putrescine
P680:	centre réactionnel du photosystème II
P700:	centre réactionnel du photosystème I
Q <sub>A</sub> :	quinone A
Q <sub>B</sub> :	quinone B
rpm:	tour par minute
Spm:	spermine
Spd:	spermidine
Z:	tyrosine.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>ii</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>viii</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>x</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>xiv</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>xvi</b>

### CHAPITRE I

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
1.1 Généralités.....	1
1.2 État des travaux .....	3
1.3. Objectifs des travaux.....	7

### CHAPITRE II

<b>LA PHOTOSYNTÈSE.....</b>	<b>12</b>
2.1 Définition de la photosynthèse .....	12
2.2 Les phases de la photosynthèse.....	14
2.3. Structure du chloroplaste .....	17
2.4. Structure de la membrane du thylacoïde .....	18
2.5. Organisation de la membrane des thylacoïdes .....	20
2.6. Les pigments chlorophylliens .....	21
2.6.1. Localisation et organisation des pigments photosynthétiques ..	25

2.6.2. Rôle des pigments photosynthétiques.....	25
2.7. Le transfert d'électrons entre PSII et PSI .....	27
2.8. Les photosystèmes .....	31
2.8.1 Le photosystème I (PSI) .....	31
2.8.2. Le photosystème II (PSII) .....	33
2.8.3 Organisation moléculaire et composition polypeptidique du PSII .....	35
2.9. Le complexe du dégagement d'oxygène (CDO) .....	39

### CHAPITRE III

MATÉRIELS ET MÉTHODES .....	42
3.1 Matériel utilisé .....	42
3.1.1 Produits chimiques utilisés .....	42
3.1.2 Fenêtres utilisées .....	42
3.1.3 Logiciel de calcul utilisé .....	43
3.2 Méthodes expérimentales et techniques utilisées.....	43
3.2.1 Préparation des membranes du PSII et des complexes.....	43
3.2.2. Composition des différents tampons utilisés pendant l'extraction du PSII.....	45
3.3. Techniques de mesures et d'analyses utilisées .....	45
3.3.1 Préparation des films (complexes) .....	45
3.3.2. Enregistrement des spectres d'absorption FTIR .....	46
3.3.3. Méthodes d'analyse des spectres d'absorption FTIR.....	47
3.3.4. Méthode de différences de spectres d'absorption FTIR.....	48
3.3.5. Détermination des structures secondaires des protéines du PSII .....	49
3.3.6. Mesure du dégagement d'oxygène .....	51
3.3.7. Principe de mesure du dégagement d'oxygène.....	52

## CHAPITRE IV

GÉNÉRALITÉS SUR LA SPECTROSCOPIE INFRAROUGE (FTIR).....	56
4.1 Spectroscopie infrarouge .....	56
4.1.1. L'infrarouge.....	56
4.1.2 Rayonnement électromagnétique.....	57
4.1.3. Absorption infrarouge .....	59
4.2. Transformation de l'énergie absorbée.....	62
4.2.1. Vibrations de valence et de déformation .....	63
4.2.2. Absorption d'une radiation lumineuse par une molécule en vibration.	67
4.3. Le diagramme énergétique .....	69
4.4. Spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (FTIR) .....	73
4.4.1. Principe de fonctionnement de l'appareil à infrarouge FTIR.....	74
4.4.2. Principe de la transformée de Fourier .....	76

## CHAPITRE V

### RÉSULTATS ET DISCUSSION DE L'ÉTUDE DES STRUCTURES

SECONDAIRES DU PSII.....	78
5.1. Étude des polypeptides du PSII avec la spectroscopie (FTIR) .....	78
5.1.1. Mode de vibration des liaisons peptidiques .....	78
5.1.2. Caractéristiques spectroscopiques du complexe de PSII utilisé.....	81
5.2 Résultats expérimentaux.....	85
5.2.1. Spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (FTIR).....	85
5.2.1.1. Mode de vibration des complexes en FTIR.....	85
5.2.1.2. Méthode de dérivée, de différence de spectres et de simulation spectrale .....	85

5.3. Le dégagement d'oxygène .....	88
5.4. Effets des sur les protéines du PSII en FTIR.....	90
5.4.1. Effets sur les modes de vibration du PSII.....	90
5.4.2. Effets sur la structure du PSII à travers la différence de spectre et la simulation spectrale.....	103
5.4.3. Effets des anions sur le dégagement d'oxygène .....	109
5.5. Effets des polyamines sur le PSII .....	110
5.5.1. Effets des polyamines sur les modes de vibration du PSII.....	110
5.5.2. Effets des polyamines sur la structure.....	118
5.5.3. Effets des polyamines sur le dégagement d'oxygène du PSII.....	126
5.6. Effets du cholestérol sur le PSII .....	127
5.6.1. Effets du cholestérol sur les modes de vibration du PSII .....	127
5.6.2. Effets du cholestérol sur la structure du PSII .....	131
5.6.3. Effets du cholestérol sur le dégagement d'oxygène du PSII .....	136
5.7. Discussion des résultats obtenus .....	136
5.7.1 Méthode spectroscopie infrarouge FTIR.....	138
5.7.2 Méthode du dégagement d'oxygène.....	139
 <b>CHAPITRE VI</b>	
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>143</b>
 <b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>148</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1.	A) Structure et configuration de la liaison peptidique. B) Mode de vibration des fonctions amide (Tu, 1982).....	11
Figure 2.1.	(A) Schéma résumé du cycle biologique de l'énergie au cours de la photosynthèse, (B) cycle d'hydratation de l'ATP (N. van Yperzeele), tiré de Biophysical: an introduction (Sybesma, 1989).....	15
Figure 2.2.	Schéma représentant les réactions des deux phases de la photosynthèse.....	16
Figure 2.3.	(A) Schéma du chloroplaste (Wolfe, 1993); (B) . Coupe de thylacoïdes d'épinard, d'après la micrographie électronique de S. Ollsko et E. N. Moudrianakis, 1974, (Heller et al., 1993).....	19
Figure 2.4.	Structure chimique de la chlorophylle-a. Le groupement -CH <sub>3</sub> encadré est remplacé par un -CHO dans le cas de la chlorophylle-b. (Heller et al., 1993).....	22
Figure 2.5.	Spectre d'absorption des chlorophylles a et b. (Heller et al., 1993)	24
Figure 2.6.	Schéma des thylacoïdes. (Wolfe, 1993).....	26
Figure 2.7.	Schéma en Z décrivant le transfert d'électrons entre le PSI et le PSII. En continu le trajet acyclique. Étoiles: sites des photophosphorylations. Entre ( ), les potentiels d'oxydoréduction en volts. (Heller et al., 1993).....	29
Figure 2.8.	Modèle de membrane des thylacoïdes avec la distribution des photosystèmes (Svensson et al., 1991) Le PII $\alpha$ et le PSII $\beta$ qui possèdent une antenne captrice de lumière de taille beaucoup plus importante se trouvent dans les grana. Le PSII $\alpha$ est localisé dans la partie centrale de la région granaire, alors que le PSI $\alpha$ se trouve en périphérie. Le PSI $\beta$ et le PSII $\beta$ sont localisés dans la région stromatique.....	34
Figure 2.9.	Représentation schématique du centre réactionnel du PSII avec les antennes proximale et distale (Hansson et Wydrzynski, 1990).....	37

Figure 3.1.	Principe de l'électrode à oxygène dans la méthode du dégagement d'oxygène par la méthode polarographique. Mb: membrane perméable à l'oxygène. (Heller et al., 1993).....	55
Figure 4.1.	Mouvement des atomes lors du phénomène de vibration (Hamon et al., 1990).....	60
Figure 4.2.	Représentation schématique d'un groupement triatomique covalent <b>A, X, Y</b> . (Hamon et al., 1990).....	65
Figure 4.3.	Vibration d'allongement d'un groupement <b>AXY</b> . Au cours d'une vibration d'allongement symétrique, <b>X</b> et <b>Y</b> sont en phase, ils se rapprochent ou s'éloignent de <b>A</b> en même temps. (Hamon et al., 1990).....	65
Figure 4.4.	Vibration de déformation; (A) déformation dans le plan, (B) déformation hors du plan.....	66
Figure 4.5.	Différence des distances entre pôles diélectriques $d_c$ et $d_e$ dans le cas des molécules ne présentant pas de centre de symétrie. (Hamon et al., 1990).....	68
Figure 4.6.	(A) Vibrations symétriques, (B) vibrations antisymétriques dans le cas des molécules présentant de centre de symétrie. (Hamon et al., 1990).....	70
Figure 4.7.	Courbe traduisant le mouvement des molécules assimilées à un oscillateur harmonique (l'énergie de dissociation en fonction de la distance qui sépare deux atomes). (a) Mouvement de rotation et d'oscillation d'un atome. (b) Différents états énergétiques d'une molécule. (Sybesma, 1989).....	72
Figure 4.8.	Système optique FTIR (Pachler et al., 1988). a) Schéma d'un interféromètre de Michelson: (S) source de radiation; (Sa) échantillon; (D) détecteur; (A) amplificateur; (M1) miroir fixe; (M2) miroir mobile; (BS) séparateur de faisceau ou beam splitter; (X) déplacement du miroir; (L) distance parcourue par le faisceau réfléchi. b) Interférogramme ou signal enregistré par le détecteur. c) Spectre obtenu par transformée de Fourier de l'interférogramme. (Pacher et al., 1988). ....	75



- Figure 5.1. A) Vibration de deux atomes A et B représenté sous forme de vibration de deux balles reliées par un ressort. B) Représentation des différents mouvements (étirement, repliement, torsion, etc.) dans la structure chimique d'une molécule (Tu, 1982).....79
- Figure 5.2. Spectre d'absorption FTIR des membranes de PSII natif (pur).....84
- Figure 5.3. Dérivée seconde et simulation de la bande amide I des polypeptides du PSII natif (pur). (A) Simulation spectrale, (B) dérivée seconde. Pourcentage des structures secondaires: hélice- $\alpha$  47%, feuillet- $\beta$  11%, coude 19%, structure non ordonnée (random) 16%, structure  $\beta$ -antiparallèle 7%.....87
- Figure 5.4. Spectres d'absorption FTIR dans la région 4000-600  $\text{cm}^{-1}$  des polypeptides du PSII pur et du complexe PSII-NaCl. (A) PSII pur; (B) PSII+NaCl, 5 mM; (C) PSII+NaCl, 10 mM; (D) PSII+NaCl, 20 mM...91
- Figure 5.5. Spectres d'absorption FTIR dans la région 1800-1000  $\text{cm}^{-1}$  des polypeptides du PSII pur et du complexe PSII-NaCl. (A) PSII pur; (B) PSII+NaCl, 5 mM; (C) PSII+NaCl, 10 mM; (D) PSII+NaCl, 20 mM...92
- Figure 5.6. Spectres d'absorption FTIR dans la région 4000-600  $\text{cm}^{-1}$  des polypeptides du PSII pur et du complexe PSII-NaBr. (A) PSII pur; (B) PSII+NaBr, 5 mM; (C) PSII+NaBr, 10 mM; (D) PSII+NaBr, 20 mM...94
- Figure 5.7. Spectres d'absorption FTIR dans la région 1800-1000  $\text{cm}^{-1}$  des polypeptides du PSII pur et du complexe PSII-NaBr. (A) PSII pur; (B) PSII+NaBr, 5 mM; (C) PSII+NaBr, 10 mM; (D) PSII+NaBr, 20 mM...95
- Figure 5.8. Spectres d'absorption FTIR dans la région 4000-600  $\text{cm}^{-1}$  des polypeptides du PSII pur et du complexe PSII-NaNO<sub>3</sub>. (A) PSII pur; (B) PSII+NaNO<sub>3</sub>, 5 mM; (C) PSII+NaNO<sub>3</sub>, 10 mM; (D) PSII+NaNO<sub>3</sub>, 20 mM.....98
- Figure 5.9. Spectres d'absorption FTIR dans la région 1800-1000  $\text{cm}^{-1}$  des polypeptides du PSII pur et du complexe PSII-NaNO<sub>3</sub>. (A) PSII pur; (B) PSII+NaNO<sub>3</sub>, 5 mM; (C) PSII+NaNO<sub>3</sub>, 10 mM; (D) PSII+NaNO<sub>3</sub>, 20 mM.....99

- Figure 5.10. Spectres d'absorption FTIR dans la région  $4000-600\text{ cm}^{-1}$  des polypeptides du PSII pur et du complexe PSII-Nal. (A) PSII pur; (B) PSII+Nal, 5 mM; (C) PSII+Nal, 10 mM; (D) PSII+Nal, 20 mM.....101
- Figure 5.11. Spectres d'absorption FTIR dans la région  $1800-1000\text{ cm}^{-1}$  des polypeptides du PSII pur et du complexe PSII-Nal. (A) PSII pur; (B) PSII+Nal, 5 mM; (C) PSII+Nal, 10 mM; (D) PSII+Nal, 20 mM.....102
- Figure 5.12. Spectre d'absorption FTIR du PSII pur et spectre de différence [(PSII+anions)-(PSII)] en solution aqueuse dans la région de  $1800-1500\text{ cm}^{-1}$  .....105
- Figure 5.13. Simulation spectrale du PSII pur et du spectre PSII+I<sup>-</sup>, 20 mM dans la région de  $1700-1612\text{ cm}^{-1}$ . Pourcentage des structures secondaires: hélice- $\alpha$  43%, feuillet- $\beta$  14%, coude 20%, structure non ordonnée (random) 15%, structure  $\beta$ -antiparallèle 8%.....107
- Figure 5.14. Simulation spectrale du PSII pur et du spectre PSII+NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 20 mM dans la région de  $1700-1612\text{ cm}^{-1}$ . Pourcentage des structures secondaires: hélice- $\alpha$  44%, feuillet- $\beta$  13%, coude 20%, structure non ordonnée (random) 15%, structure  $\beta$ -antiparallèle 8%.....108
- Figure 5.15. Spectres d'absorption FTIR dans la région  $4000-600\text{ cm}^{-1}$  des polypeptides du PSII pur et du complexe PSII-Spm. (A) PSII pur; (B) PSII+Spm, 5 mM; (C) PSII+Spm, 10 mM; (D) PSII+Spm, 20 mM.....112
- Figure 5.16. Spectres d'absorption FTIR dans la région  $1800-1000\text{ cm}^{-1}$  des polypeptides du PSII pur et du complexe PSII-Spm. (A) PSII pur; (B) PSII+Spm, 5 mM; (C) PSII+Spm, 10 mM; (D) PSII+Spm, 20 mM.....113
- Figure 5.17. Spectres d'absorption FTIR dans la région de  $4000-600\text{ cm}^{-1}$  des polypeptides du PSII pur et du complexe PSII-Spd. (A) PSII pur; (B) PSII+Spd, 5 mM; (C) PSII+Spd, 10 mM; (D) PSII+Spd, 20 mM.....115
- Figure 5.18. Spectres d'absorption FTIR dans la région  $1800-1000\text{ cm}^{-1}$  des polypeptides du PSII pur et du complexe PSII-Spd. (A) PSII pur; (B)

PSII+Spd, 5 mM; (C) PSII+Spd, 10 mM; (D) PSII+Spd, 20 mM.....	116
Figure 5.19. Spectre d'absorption FTIR du PSII pur et spectre de différence [(PSII+Spm)-(PSII)] en solution aqueuse dans la région de 1800-1500 $\text{cm}^{-1}$ .....	120
Figure 5.20. Spectre d'absorption FTIR du PSII pur et spectre de différence [(PSII+Spd)-(PSII)] en solution aqueuse dans la région de 1800-1500 $\text{cm}^{-1}$ .....	121
Figure 5.21. Simulation spectrale du PSII pur et des spectres PSII+Spm, 10 et 20 mM dans la région de 1700-1612 $\text{cm}^{-1}$ . Pourcentage des structures secondaires: hélice- $\alpha$ 37%, feuillet- $\beta$ 18%, coude 19%, structure non ordonnée (random) 17%, structure $\beta$ -antiparallèle 9%.....	123
Figure 5.22. Simulation spectrale du PSII pur et des spectres PSII+Spd, 10 et 20 mM dans la région de 1700-1612 $\text{cm}^{-1}$ . Pourcentage des structures secondaires: hélice- $\alpha$ 40%, feuillet- $\beta$ 17%, coude 18%, structure non ordonnée (random) 17%, structure $\beta$ -antiparallèle 8%.....	124
Figure 5.23. Spectres d'absorption FTIR dans la région de 4000-600 $\text{cm}^{-1}$ des polypeptides du PSII pur et du complexe PSII-cholestérol. (A) PSII pur; (B) PSII+cholestérol, 5 mM; (C) PSII+cholestérol, 10 mM; (D) PSII+cholestérol, 20 mM.....	128
Figure 5.24. Spectres d'absorption FTIR dans la région 1800-1000 $\text{cm}^{-1}$ des polypeptides du PSII pur et du complexe PSII-cholestérol. (A) PSII pur; (B) PSII+cholestérol, 5 mM; (C) PSII+cholestérol, 10 mM; (D) PSII+cholestérol, 20 mM.....	129
Figure 5.25. Spectre d'absorption FTIR du PSII pur et spectre de différence [(PSII+cholestérol)-(PSII)] en solution aqueuse dans la région de 1800-1500 $\text{cm}^{-1}$ .....	132
Figure 5.26. Simulation spectrale du PSII pur et des spectres FTIR PSII + cholestérol, 10 mM dans la région de 1700-1612 $\text{cm}^{-1}$ . Pourcentage des structures secondaires (10 mM): hélice- $\alpha$ 39%, feuillet- $\beta$ 16%, coude 20%, structure non ordonnée (random) 16%, structure $\beta$ -antiparallèle 9%.....	134

Figure 5.27. Simulation spectrale du PSII pur et des spectres FTIR PSII + cholestérol, 20 mM dans la région de  $1700\text{-}1612\text{ cm}^{-1}$ . Pourcentage des structures secondaires (20 mM): hélice- $\alpha$  37%, feuillet- $\beta$  17%, coude 20%, structure non ordonnée (random) 17%, structure  $\beta$ -antiparallèle 9%.....135

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1. Composition des protéines et des pigments-protéines dans le complexe du photosystème II d'épinard (Murata et Miyao, 1987)....	38
Tableau 5.1. Effets des différentes concentrations de NaCl sur les polypeptides du PSII étudiés par la spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (FTIR).....	93
Tableau 5.2. Effets des différentes concentrations de NaBr sur les polypeptides du PSII étudiés par la spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (FTIR).....	97
Tableau 5.3. Effets des différentes concentrations de NaNO <sub>3</sub> sur les polypeptides du PSII étudiés par la spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (FTIR).....	100
Tableau 5.4. Effets des différentes concentrations de NaI sur les polypeptides du PSII étudiés par la spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (FTIR).....	103
Tableau 5.5. Effets des anions Cl <sup>-</sup> et Br <sup>-</sup> , sur les structures secondaires des protéines du PSII à travers la simulation spectrale entre 1700 et 1612 cm <sup>-1</sup> à 0.01, 0.1, 1, 10, et 20 mM de concentration.....	106
Tableau 5.6. Effets des anions NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> et I <sup>-</sup> sur les structures secondaires des protéines du PSII à travers la simulation spectrale entre 1700 et 1612 cm <sup>-1</sup> à 0.01, 0.1, 1, 10, et 20 mM de concentration.....	109
Tableau 5.7. Pourcentage de l'inhibition du dégagement d'oxygène du centre réactionnel du PSII en présence des anions inorganiques (Cl <sup>-</sup> , Br <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> et I <sup>-</sup> ) à 0.01, 0.1, 1, 10 et 20 mM de concentration.....	110
Tableau 5.8. Effets des différentes concentrations de Spm sur les polypeptides du PSII étudiés par la spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (FTIR).....	114

Tableau 5.9 Effets des différentes concentrations de Spd sur les polypeptides du PSII étudiés par la spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (FTIR).....	117
Tableau 5.10. Effets des PAs sur les structures secondaires des protéines du PSII à travers la simulation spectrale entre 1700 et 1612 $\text{cm}^{-1}$ à 0.01, 0.1, 1, 10, et 20 mM de concentration.....	125
Tableau 5.11. Pourcentage de l'inhibition du dégagement d'oxygène du centre réactionnel du PSII en présence de PAs (Spm et Spd) à 0.01, 0.1, 1, 10 et 20 mM de concentration.....	126
Tableau 5.12. Effets des différentes concentrations de cholestérol sur les polypeptides du PSII étudiés par la spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (FTIR).....	130
Tableau 5.13. Effets du cholestérol sur les structures secondaires des protéines du PSII à travers la simulation spectrale entre 1700 et 1612 $\text{cm}^{-1}$ à 0.01, 0.1, 1, 10, et 20 mM de concentration.....	133
Tableau 5.14. Pourcentage de l'inhibition du dégagement d'oxygène du centre réactionnel du PSII en présence de cholestérol à 0.01, 0.1, 1, 10, et 20 mM de concentration.....	136

## **CHAPITRE I**

### **INTRODUCTION**

#### **1.1. Généralités**

Au Québec, la forêt constitue une ressource économique de premier plan car elle génère de façon directe ou indirecte plus de 15% du produit national brut. Par ailleurs, cette forêt est soumise à des stress importants dus à l'exploitation et à la pollution humaine. Devant l'ampleur des phénomènes comme le dépérissement des forêts dans l'hémisphère nord et les changements climatiques à l'échelle planétaire, il importe d'effectuer des recherches. Celles-ci permettent de disposer de techniques assurant aussi le suivi de l'état du couvert forestier sur de vastes territoires en vue de se doter d'outils permettant d'en prévoir l'évolution. Certaines de ces techniques sont orientées vers l'étude de la photosynthèse des plantes supérieures que nous allons définir brièvement.

En effet, la photosynthèse est le mécanisme à partir duquel les plantes convertissent l'énergie lumineuse en énergie chimique. Chez les plantes supérieures, les réactions primaires de la photosynthèse ont lieu dans les membranes thylacoïdiennes des chloroplastes. La membrane des thylacoïdes renferme de nombreuses protéines, des complexes pigments-protéiniques et des anions inorganiques. Tous participent à divers degrés à la photosynthèse (Govindjee et Coleman, 1990; Peter et al., 1992; Wolfe, 1993).

D'une façon spécifique, le PSII joue essentiellement le rôle d'un minuscule condensateur dans la membrane photosynthétique. En effet, le PSII emmagasine l'énergie lumineuse captée, la sépare et stabilise les charges positives et négatives. Il assure le processus de transfert d'électrons vers le PSI où a lieu la réduction du  $\text{NADP}^+$  en NADPH à la face stromale de la membrane des thylacoïdes (Wolfe, 1993; Darnell et Baltimore, 1993).

Le transfert d'électrons et la dégradation de l'eau conduisant à la production de l'oxygène moléculaire a lieu dans la région granaire des thylacoïdes au niveau des polypeptides du PSII (Govindjee et Coleman, 1990; Darnell et al., 1993; Wolfe, 1993). L'absorption de l'énergie lumineuse (photons) est assurée par les pigments spécialisés qui sont les chlorophylles et les caroténoïdes (Govindjee et Coleman, 1990).

Le PSII confère donc à la plante la capacité d'utiliser l'eau comme donneur d'électrons et de libérer de l'oxygène. En l'absence de toutes ces étapes, la photosynthèse n'a plus lieu et la plante ne peut plus croître. C'est pour cette raison que l'étude du PSII revêt un intérêt important dans les recherches. Son étude permet de mieux comprendre l'impact des facteurs extérieurs (herbicides commerciaux, forte intensité lumineuse, gel, etc.) sur ce dernier (Govindjee et Coleman, 1990; Darnell et Baltimore, 1993).

La recherche sur la photosynthèse, et plus spécifiquement sur le PSII, connaît un essor considérable depuis ces dernières décennies. Ainsi, afin de mieux situer notre travail, il convient au préalable d'énoncer quelques travaux



d'envergure sur le PSII qui ont été effectués par divers chercheurs. Ces travaux sont brièvement décrits dans l'état des travaux.

## **1. 2. État des travaux**

Pour mieux cerner l'impact de la pollution sur les plantes, plusieurs chercheurs ont orienté leurs travaux des dernières années vers l'étude des plus petits fragments photosynthétiques. Ces chercheurs ont étudié l'influence de certains agents externes ou internes (éléments minéraux, régulateurs de croissance, ions métalliques, polyamines, etc.). Ces agents sont capables de modifier l'ultrastructure et le fonctionnement du PSII ou des autres fragments, pour éventuellement accroître leur productivité et éviter les problèmes de croissance des végétaux. Nous pouvons citer Ahmed et Tajmir, (1993) qui ont étudié les interactions des ions métalliques sur les complexes collecteurs de lumière. Menikh, (1994) qui a étudié le rôle de digalactosyldiacylglycérol (DGDG) dans l'empilement des thylacoïdes et dans l'activité du PSII. Bograh et al., (1997) ont étudié les effets des anions inorganiques, des PAs et du cholestérol sur les structures secondaires du PSII. Au plan fondamental, ces études permettent d'évaluer les effets des facteurs externes ou internes sur le processus d'agencement des membranes photosynthétiques. Au plan pratique, les caractéristiques structurales du PSII permettent de mesurer le degré de perturbation et de fonctionnement de la plante provoqués par des conditions de croissance défavorables.

Dans les travaux antérieurs, Phillip et Russel, (1989); et Kotzabasis et al., 1993) ont rapporté que les PAs non seulement se rencontrent dans les plantes (au niveau des chloroplastes, des membranes des thylacoïdes, des LHCI et LHCII et dans les complexes du PSII), mais sont aussi impliqués dans la croissance des plantes (processus de développement). On retrouve seulement la Spm dans le centre réactionnel du PSII (Kiriakos et al., 1993).

On retrouve généralement les polyamines sous différentes formes. On peut les retrouver sous forme de cations organiques produits par la décarboxylation des acides aminés basiques (Iordanov et al., 1989; Bersford et al., 1991, et 1993), ou sous forme conjuguée avec de petites molécules phénoliques acides. Ils peuvent aussi se retrouver sous la forme liée avec les macromolécules (protéines et des acides nucléiques). Le mécanisme de l'action des PAs est basé sur leurs propriétés chimiques et leur facilité à établir des interactions physico-chimiques avec les acides nucléiques (Flink et Pettijohn, 1975). Ils établissent aussi des interactions physico-chimiques avec les protéines (Mehta et al., 1991) et les phospholipides (Chapel et al., 1984; Taylor et al., 1995). La régulation moléculaire de leurs enzymes biosynthétiques et l'étendue de leur mode d'action sont presque inconnus (Beigbeder et Kiriakos, 1994).

Les effets des polyamines sur l'activité fonctionnelle des membranes des thylacoïdes ont été étudiés par Iordanov et al., 1988. Ces chercheurs ont trouvé que les PAs sont très importants pour les activités physiologiques des végétaux supérieurs à de faibles concentrations. Ils ont montré qu'à concentrations élevées, les PAs influencent négativement la membrane photosynthétique du PSII. Il a aussi été démontré que l'empilement de la membrane des thylacoïdes dépend

d'une façon directe de la concentration des espèces cationiques dans le milieu environnant (Barber, 1982). Ce phénomène est lié aux charges de surface et a fait l'objet de nombreux travaux (Staechelein et Arntzen, 1983).

Selon Phillip et Russel, 1989 les PAs sont très importants pour de multiples fonctions physiologiques. De plus, les récentes études de Kotzabasis et al., 1993, ont permis de montrer que les polyamines telles que la putrecine (Put), la spermine, et la spermidine se rencontrent à de très faibles concentrations dans le PSII: putrecine (1.18 nmol/mg de Chl et 1.28 nmol/mg de protéine); spermidine (0.38 nmol/mg de Chl et 0.41 nmol/mg de protéine); spermine (0.17 nmol/mg de Chl et 0.19 nmol/mg de protéine). Dans le centre réactionnel du PSII on a une concentration de spermine de 72.46 nmol/mg de Chl, et de 2.56 nmol/mg de protéine.

Les liaisons des PAs avec les molécules biologiques favorisent le mécanisme de régulation de base au niveau des plantes. Leurs effets positifs sont similaires à ceux des cations inorganiques tels que le  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$ , mais ils ne peuvent pas les remplacer (Klappauf et al., 1979). Outre les PAs énoncés ci-dessus, les ions  $Cl^-$ , et Mn sont de grande importance dans le maintien de la structure et le fonctionnement du PSII (Chritchley, 1985; Govindjee et Homann, 1989; Debus, 1992).

Quant aux anions  $Br^-$ ,  $I^-$ , ils se rencontrent généralement de faibles taux entre 0.001 et 1 ppm dans la membrane photosynthétique (Heller et al., 1993). Papageorgiou et al., 1990 rapportèrent les effets des anions  $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $I^-$ ,  $NO_2^-$  et  $NO_3^-$ , sur le dégagement d'oxygène du centre réactionnel du PSII. D'après leurs

recherches, ces anions sont très importants pour les activités physiologiques des plantes vertes à certaines concentrations. Il a aussi été rapporté qu'en l'absence des ions  $\text{Cl}^-$ , les ions  $\text{I}^-$  stimulent le dégagement d'oxygène entre 3 et 6 mM (Papageorgiou et al., 1990). Ryszard, (1991) a observé les effets des ions  $\text{NO}_3^-$  sur l'inhibition du PSII. Ryszard a trouvé que ces ions inhibent le dégagement d'oxygène du PSII à concentration élevée.

D'après les travaux de Papageorgiou et Lagoyanni (1991) et Foyer et al., (1994), les ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Br}^-$  n'ont pas d'effets négatifs connus sur les protéines et les lipides du PSII, tandis que la présence des ions  $\text{I}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  et  $\text{NO}_3^-$  réduit le taux de dégagement d'oxygène. Il est donc primordial, pour l'activité maximale du complexe de dégagement d'oxygène d'avoir les ions  $\text{Cl}^-$  (Bernier et al., 1993).

D'autre part, d'après les travaux de Blubaugh et al., (1990), quand le complexe de manganèse est non fonctionnel, l'anion  $\text{I}^-$  est oxydé dans un premier temps par la tyrosine Z de la protéine D-1. Elle l'est très peu par la tyrosine D de la protéine D-2. En l'absence d'ions chlorure, l'anion  $\text{I}^-$  est oxydé par l'état  $\text{S}_2$  du complexe de manganèse (Ikeuchi et al., 1988).

Dans notre laboratoire, les chercheurs tels, Ahmed et Tajmir, 1993 ont étudié les interactions des ions métalliques ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ , et  $\text{Pb}^{2+}$ ) avec les protéines PSII des membranes thylacoïdiennes à travers la spectroscopie infrarouge FTIR. Ces derniers ont trouvé que ces cations métalliques induisent des perturbations et provoquent des changements de conformation aux protéines secondaires pour des concentrations supérieures à 10 mM. Nahar et al., 1994 ont réalisé une étude des interactions des ions  $\text{Hg(II)}$ ,  $\text{Fe(II)}$  et  $\text{Fe(III)}$  sur la structure

des protéines LHCII des membranes thylacoïdiennes avec la spectroscopie infrarouge FTIR. Cette étude a montré, tout comme la précédente, que ces ions induisent des perturbations aux structures secondaires des protéines de LHCII à des concentrations élevées.

Bien que l'influence de ces polyamines et des anions sur l'aspect structural et fonctionnel du PSII a été mis en évidence de façon exhaustive, il n'en demeure pas moins que leurs impacts précis sur la structure et la fonction reste encore un mystère qui doit être élucidé. En d'autres mots, des travaux énumérés ci-dessus ne nous permettent pas de localiser de façon précise les sites d'interactions des PAs et des anions dans le complexe du PSII et donc de comprendre leur influence réelle sur le dégagement d'oxygène. Ils ne nous permettent pas non plus de statuer clairement sur les interactions des polyamines avec les diverses protéines et lipides de la membrane photosynthétique (Kotzabasis et al., 1993). Par conséquent, ces chercheurs ne pouvait pas obtenir une corrélation entre la structure et la fonction du PSII.

### **1. 3. Objectif des travaux**

Les travaux effectués sur le PSII ne nous rapportent pas leurs modes de liaisons ou d'interactions exacts avec les protéines du PSII. Les effets exacts sur la structure et la fonction du dégagement d'oxygène ne sont pas non plus connus.

Pour élucider d'avantage les interactions protéines-protéines et protéines-lipides, comprendre le fonctionnement du PSII et établir une corrélation entre la

structure et la fonction du PSII, nous proposons dans un premier temps, d'étudier les effets des anions et des PAs sur sa structure. Dans un second temps, nous utiliserons le cholestérol comme molécule modèle afin d'observer ses effets sur le PSII, la structure du cholestérol étant différente de celle des autres lipides (Maillet, 1995).

Les effets des substances sur le PSII seront étudiés pour déterminer les interactions avec les protéines du PSII, les changements de conformation, les changements structuraux du PSII et sa fonction de dégagement d'oxygène. Ces effets seront ensuite comparés afin de tirer des conclusions.

Pour parvenir à la compréhension de l'effet des facteurs externes ou internes sur les métalloprotéines et donc du PSII, plusieurs techniques sont utilisées. Ces nombreuses techniques sont d'un intérêt général pour l'ensemble des métalloprotéines (Govindjee et al., 1990). Généralement, les techniques les plus utilisées dans l'étude des complexes chlorophylles-protéines sont la spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier FTIR, l'électrophorèse, la diffraction des rayons X, la spectroscopie Raman, la méthode de dégagement d'oxygène, le transfert d'électrons etc.

Dans ces travaux, nous avons utilisé la méthode de la spectroscopie infrarouge FTIR et la méthode du dégagement d'oxygène. Ces deux méthodes sont excellentes pour l'analyse structurale et fonctionnelle très souvent utilisées en photosynthèse. La méthode de dégagement d'oxygène permettra de quantifier les différents taux d'inhibition provoqués par les substances utilisées. Quant à la spectroscopie, elle permettra d'observer les d'interactions, les changements de

conformation et de structure dans les protéines du PSII. La structure et la configuration des liaisons peptidiques sont présentés à la figure 1.1.

La méthode spectroscopique infrarouge FTIR sera utilisée dans un premier temps pour observer les déplacements des pics et les bandes des amides. Par la suite, elle permettra d'effectuer des différences entre les spectres des complexes (PSII traité) et le spectre du PSII non traité dans la région des amides I et II, (de 1800 à 1500  $\text{cm}^{-1}$ ) afin d'observer les diverses interactions physico-chimiques (électrostatiques, les interactions hydrophobes, les liaisons hydrogène, etc.) qui pourront se produire sous l'action des substances chimiques utilisées. Enfin dans un troisième temps nous allons utiliser la simulation spectrale pour quantifier les structures secondaires du PSII dans la région de 1700 à 1612  $\text{cm}^{-1}$  (région de l'amide I).

Par la suite, on compare les structures secondaires du PSII traité avec les diverses substances précitées et celles du PSII non traité. Cette comparaison permettra d'observer les effets des substances et leurs sites d'interactions sur les structures secondaires des protéines du PSII. D'après la forme et les réarrangements structuraux que les protéines du PSII vont subir, on peut s'attendre à une modification de l'activité du PSII, entre autres au niveau du complexe de dégagement d'oxygène. Pour cette raison nous avons procédé aux mesures de dégagement d'oxygène pour observer l'effet des anions inorganiques, des PAs (Spm et Spd), et du cholestérol sur ce complexe de dégagement d'oxygène.

La méthode de dégagement d'oxygène sera donc utilisée pour savoir si l'effet sur la structure influence la fonction de dégagement d'oxygène du PSII. À partir de cette méthode et celle de la spectroscopie FTIR, on pourra donc établir si possible, une corrélation entre la structure et la fonction des protéines du centre réactionnel du PSII.

Ce travail nous renseigne sur les types d'interactions ou les modes de liaisons des anions inorganiques, des polyamines, et du cholestérol avec les lipides et les protéines du PSII en solution aqueuse à  $\text{pH} = 7 - 6$  à des concentrations comprises entre 0.01 et 20 mM. Nous avons déterminé les modes de liaison, les sites les plus probables d'interactions. Nous avons aussi établi une analyse quantitative des effets des diverses substances sur les structures secondaires et le dégagement d'oxygène du PSII. Par ailleurs, les corrélations entre les structures secondaires des protéines et le dégagement d' $\text{O}_2$  du centre réactionnel du PSII en présence de ces substances ont été établies et les résultats reportés dans ce rapport.



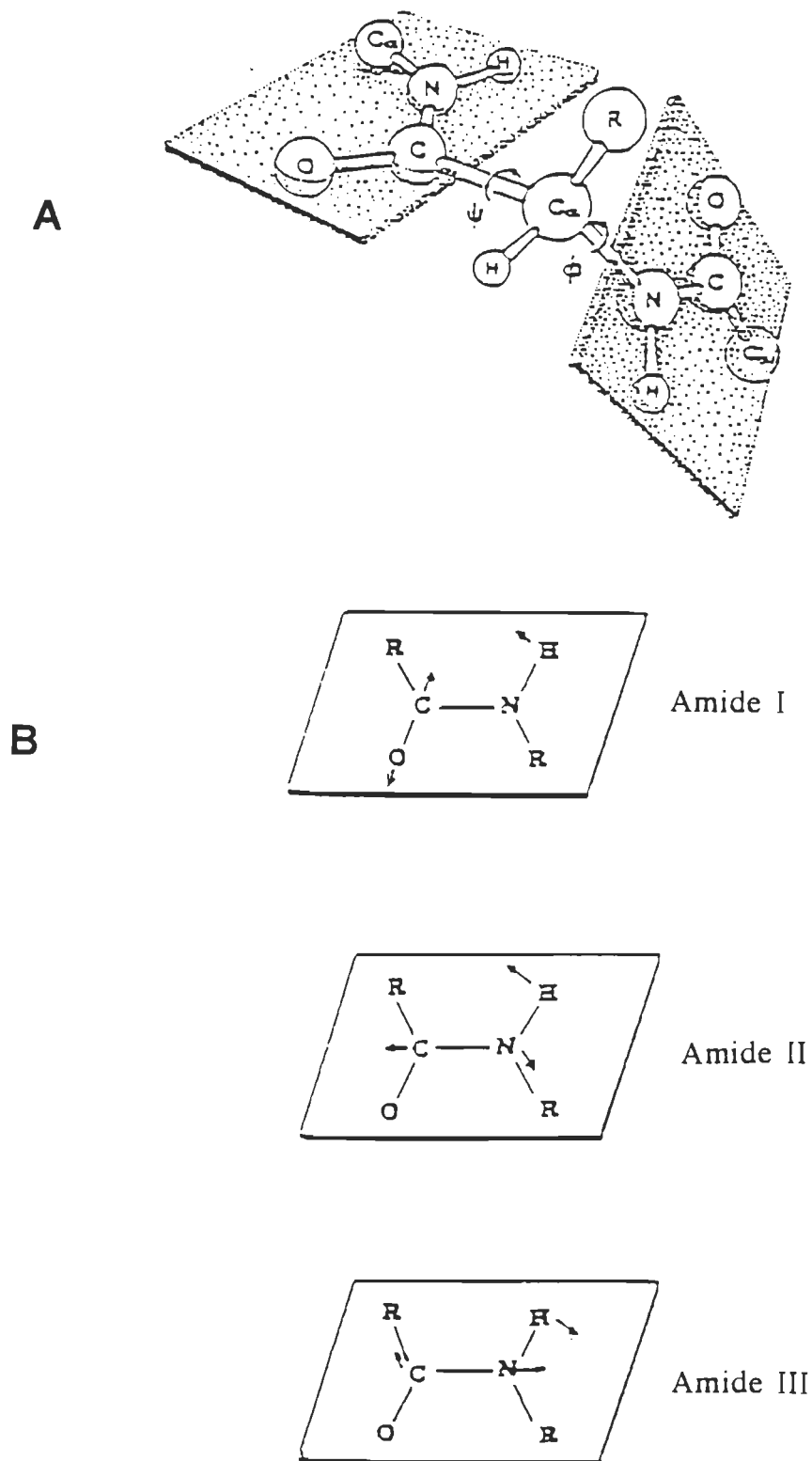


Figure 1.1. A) Structure et configuration de la liaison peptidique. B) Mode de vibration des fonctions amide (Tu, 1982).

## CHAPITRE II

### LA PHOTOSYNTHÈSE

#### 2.1 Définition de la photosynthèse

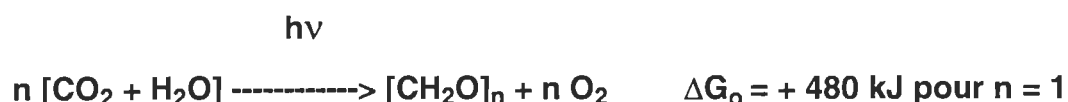
La photosynthèse est le mécanisme à partir duquel les plantes vertes et les algues convertissent l'énergie lumineuse en énergie chimique pour produire des hydrates de carbone tels que le glucose et de l'oxygène à partir du  $\text{CO}_2$  et de l'eau (Peter et al., 1992; Darnell et Baltimore, 1993). En Angleterre, Priestley (1771-1773), montra qu'une plante mise sous une cloche peut vivre de longs mois sans renouvellement d'air. Contrairement à l'animal, elle peut régénérer l'air vicié par la combustion d'une bougie et permettre à une souris de demeurer avec elle sous une cloche sans être asphyxiée. À l'époque, Priestley ne comprit pas l'importance de la lumière dans le phénomène. C'est Ingen-Housz (physicien hollandais ), qui en 1779 démontra que l'émission «d'air déphlogistiqué», c'est-à-dire d'oxygène, n'est produite que par les organes verts exposés à la lumière. Enfin, Senebier (1782-1783), montra que le gaz carbonique ou «air fixé» disait-on, était absorbé en même temps que de l'oxygène était émis (Heller et al., 1993).

Beaucoup plus tard, en 1845, et après que le phénomène eut été précisé par différents chercheurs, le physicien Mayer suggéra que la lumière agit en tant que source d'énergie. Enfin Sachs, en 1864, montra que les chloroplastes

exposés à la lumière synthétisent des grains d'amidon. L'équation de la photosynthèse est alors clairement dégagée (Peter et al., 1992; Wolfe, 1993) :



équation qui peut s'écrire plus précisément comme suit :



En d'autres mots, nous pouvons dire que la photosynthèse est la synthèse d'innombrables composés organiques servant en premier niveau dans la chaîne alimentaire de tous les animaux et de la plupart des micro-organismes. L'énergie lumineuse absorbée par la chlorophylle-a au cours de la photosynthèse est utilisée dans la photolyse de l'eau et dans la réduction du gaz carbonique en provenance de l'atmosphère. Dans ce procédé, le phosphate inorganique forme un ester avec l'adénosine diphosphate (ADP) pour donner l'adénosine triphosphate (ATP) un composé riche en énergie. Ce dernier sera utilisé conjointement avec le réducteur NADPH dans la réduction du CO<sub>2</sub> via le cycle de Calvin (Arnon, 1987).

Les réactions primaires de la photosynthèse ont lieu au niveau des photosystèmes localisés dans les membranes appelées thylacoïdes, elles-mêmes présentes dans des organites cellulaires spécialisées, les chloroplastes. La membrane des thylacoïdes renferme de nombreuses protéines qui participent à la photosynthèse. Leur maintien de la conformation et leur orientation adéquate est nécessaire aux fonctions essentielles des plantes vertes. Les lipides

membranaires jouent un grand rôle dans cette organisation (Wolfe, 1993 ; Heller et al., 1993). Le schéma résumé de la photosynthèse est présenté à la figure 2.1.

## 2.2 Les phases de la photosynthèse

La photosynthèse comporte deux types de réactions séparées en deux phases (figure 2.2): la **phase lumineuse** (ou **phase claire**) et la **phase sombre** (ou **phase obscure**) (Peter et al., 1992; Wolfe, 1993). Dans la phase lumineuse, se déroulent les réactions photochimiques, dont l'ensemble très rapide constitue ce que l'on peut appeler *l'acte photochimique*. Tandis que dans la phase sombre se déroulent les réactions chimiques qui prolongent l'acte photochimique vers les synthèses ou la reconstitution des précurseurs (Heller et al., 1993).

La première phase (phase lumineuse) correspond à la capture de l'énergie lumineuse par des pigments absorbant la lumière et sa conversion en énergie chimique sous forme d'ATP et de NADPH. Dans la seconde phase (phase obscure), les produits riches en énergie de la première phase (NADPH et ATP) sont utilisés comme sources d'énergie pour effectuer la réduction du gaz carbonique en glucose. Simultanément le NADPH est oxydé en  $\text{NADP}^+$  et l'ATP est transformé en ADP et en phosphate (Wolfe, 1993).

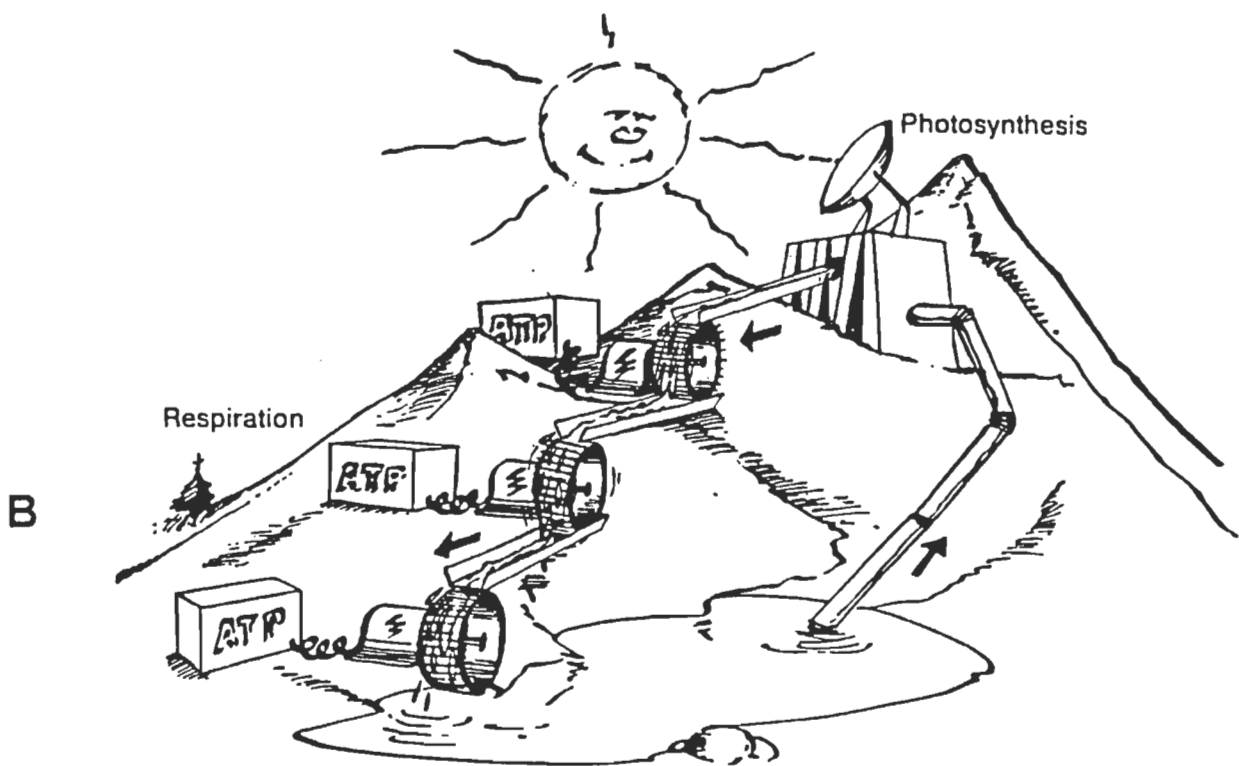
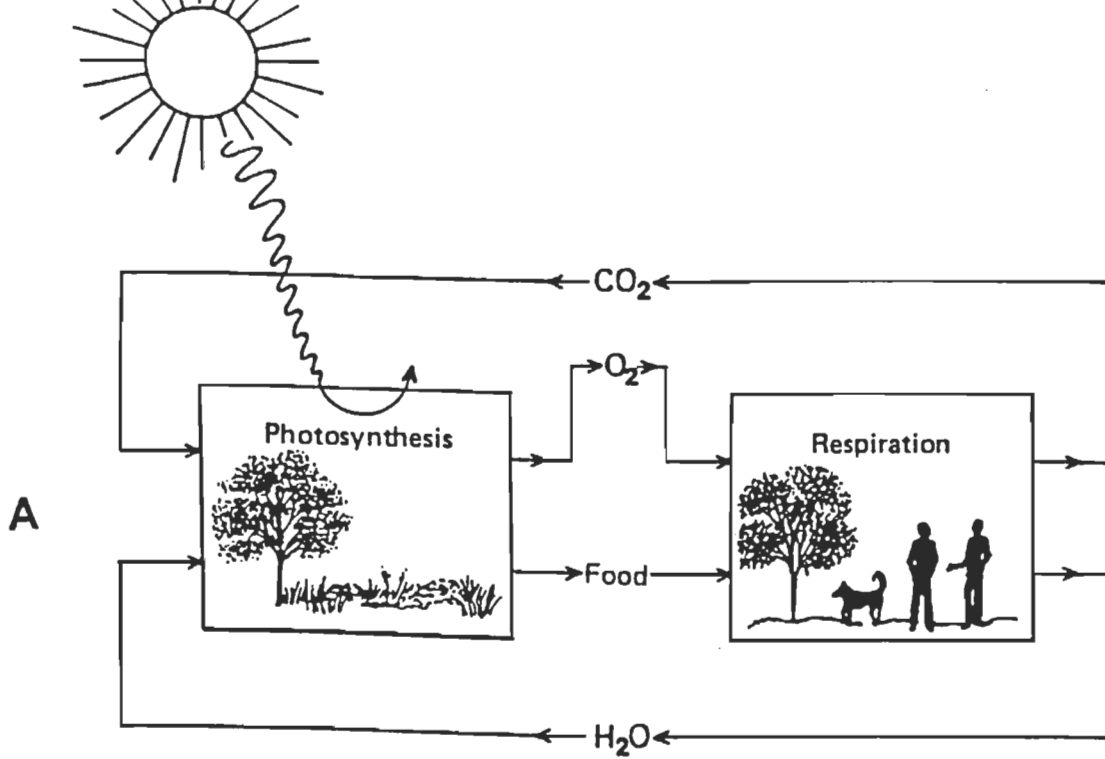


Figure 2.1. (A) Schéma résumé du cycle biologique de l'énergie au cours de la photosynthèse, (B) cycle d'hydratation de l'ATP (N. van Yperzeele), tiré de Biophysical: an introduction (Sybesma, 1989).

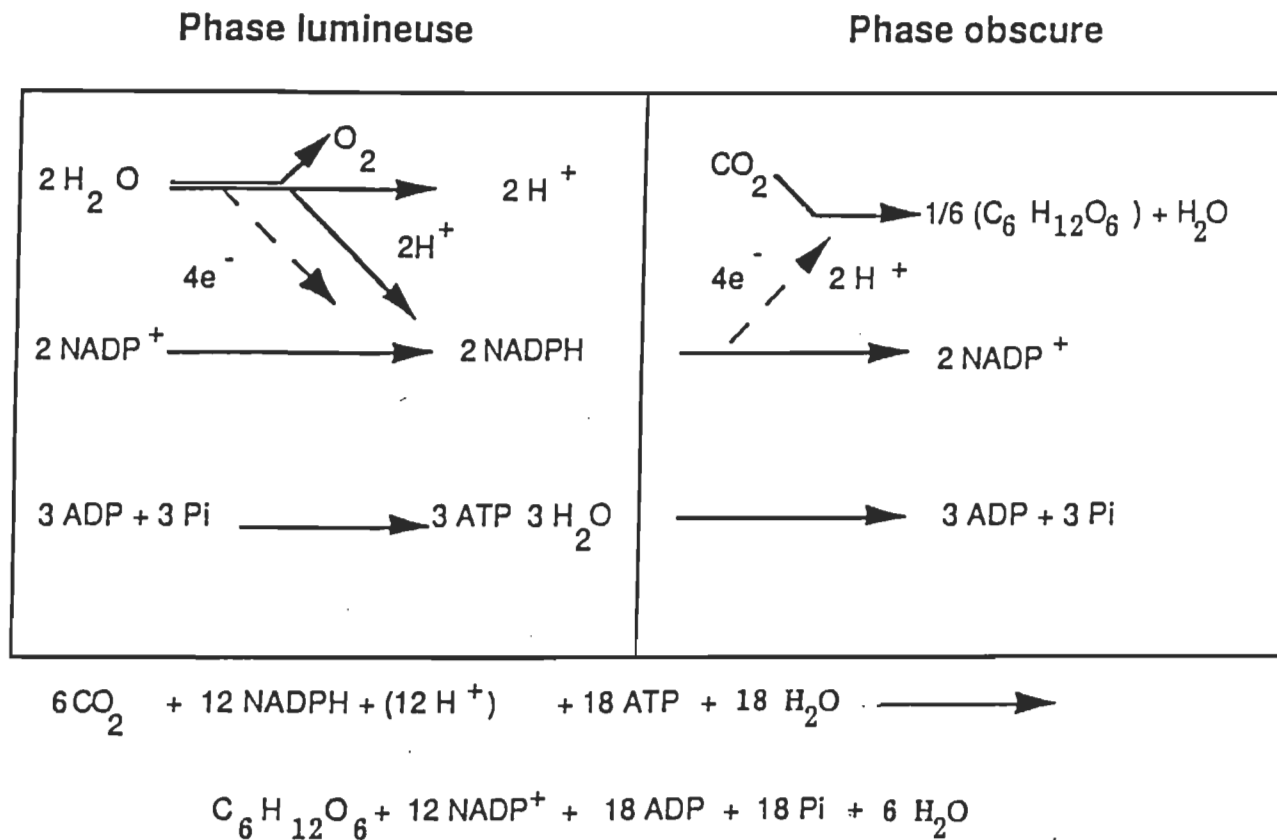


Figure 2.2. Schéma représentant les réactions des deux phases de la photosynthèse.

## 2.3 Structure du chloroplaste

Le chloroplaste provient soit de la division d'autres chloroplastes, soit de la différenciation de proplast non pigmentés, résultant de la division de proplast antérieurs. Il est entouré de deux membranes topologiquement et fonctionnellement distinctes, l'une interne et l'autre externe. Ces deux membranes sont séparées l'une de l'autre par un espace de 10 à 20 nm. La membrane interne du chloroplaste entoure le stroma (Wolfe, 1993). Le chloroplaste contient des enzymes solubles et des structures membranaires qui sont des vésicules (les thylacoïdes) aplaties empilées transversalement en travers du chloroplaste. Ce dernier possède habituellement une forme globulaire ou discoïde. La membrane interne du chloroplaste, constituée de biocouche lipidique et de protéines transmembranaires, contrôle les échanges avec le cytosol et le stroma (Maillet, 1995). Elle s'invagine dans le chloroplaste pour former les **membranes des thylacoïdes** qui portent les systèmes photosynthétiques.

Le stroma, c'est-à-dire la partie liquide du chloroplaste, contient les enzymes nécessaires à la fixation du CO<sub>2</sub> ainsi que les réactions qui lui sont associées (réduction des nitrites, sulfates, etc.). Il contient l'ADN, les ribosomes et à la synthèse des glucides ; tandis que le grana est spécialisé dans les réactions photochimiques de la photosynthèse. Le stroma est également le siège de toutes les activités (protéogénèse, etc.). Ces activités font du chloroplaste une unité largement autonome dans la vie cellulaire et une unité largement autonome dans la vie cellulaire. C'est aussi dans ce réseau complexe de membranes que se trouvent les composantes protéiques. Ces complexes sont nécessaires à la phase

lumineuse (absorption de la lumière, séparation de charges et transport d'électrons) de la photosynthèse (Govindjee et Coleman, 1990).

#### 2.4. Structure de la membrane du thylacoïde

Les membranes thylacoïdiennes sont classées en deux groupes selon qu'elles sont empilées ou non. Nous avons les **thylacoïdes granaires** (empilés) qui forment des sacs aplatis (grana) et qui contiennent surtout les PSII et les cytochromes  $b_6f$  (cyt  $b_6f$ ). Nous avons aussi les **thylacoïdes stromatiques** (non empilés) qui contiennent surtout les PSI, cyt  $b_6f$  et l'ATP synthétase. Les thylacoïdes du stroma sont très allongés. Quant aux autres (thylacoïdes des grana), ils sont empilés en amas sombres visibles en microscopie optique. Il existe de nombreux grana par chloroplaste. Chaque granum est relié à un autre par une lamelle intergranaire. Ils contiennent tous les pigments et les enzymes nécessaires aux réactions primaires de la photosynthèse. À l'intérieur des thylacoïdes granaires et stromatiques se trouvent le lumen. Ces thylacoïdes (figure 2.3) renferment les protéines impliquées dans la photosynthèse. Ces protéines forment cinq complexes membranaires : les complexes antennes du PSII, les centres réactionnels du PSI et du PSII, le complexe  $b_6f$ , et le complexe de l'ATP synthèse ( $CF_0$ - $CF_1$ ) (Murphy, 1986a).



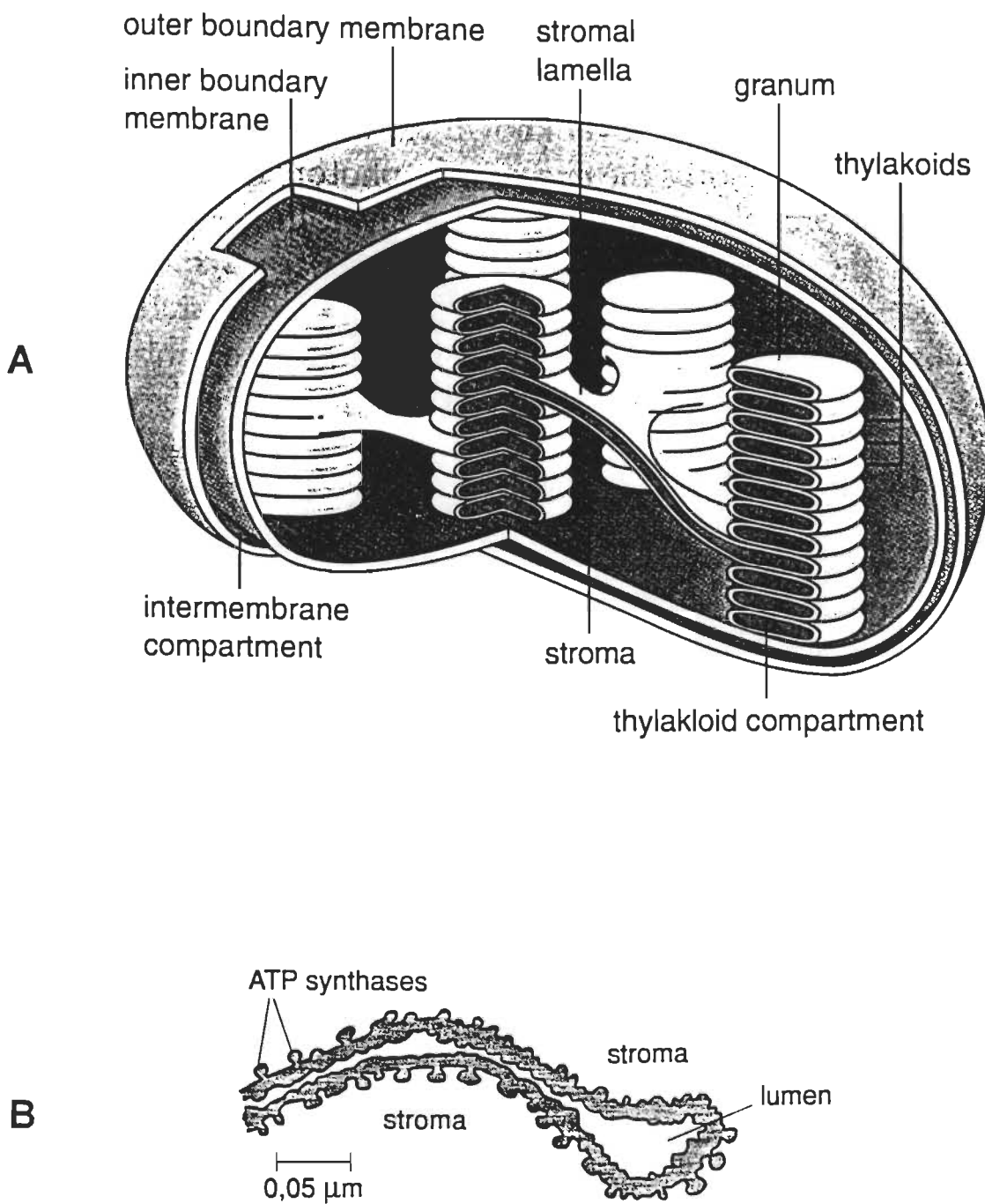


Figure 2.3. (A) Schéma du chloroplaste (Wolfe, 1993); (B) . Coupe de thylacoïdes d'épinard, d'après la micrographie électronique de S. Ollsko et E. N. Moudrianakis, 1974, (Heller et al., 1993).

## 2.5. Organisation de la membrane des thylacoïdes

Les thylacoïdes présentent une structure bien ordonnée à l'intérieur du système membranaire. Ils contiennent des lipides, des protéines et des pigments. Chaque membrane de thylacoïde contient à peu près 100 000 molécules de pigments photosynthétiques (Witt, 1975) dont la chlorophylle-a, la chlorophylle-b et les caroténoïdes. Ces molécules sont solubles dans les solvants organiques et représentent 20 à 22% du poids moléculaire des lipides dans les thylacoïdes (Hooper, 1984). Les membranes des thylacoïdes renferment les pigments et les enzymes nécessaires à la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique, les photosystèmes. L'ensemble des pigments est organisé en deux types de complexes thylacoïdaux, le PSI et le PSII. D'après Murphy 1986, les thylacoïdes renferment cinq complexes membranaires qui sont: les complexes antennes du PSII, les centres réactionnels des deux PS, le complexe cyt  $b_6f$  et le complexe de l'ATP synthétase  $CF_0$ - $CF_1$ .

Toutes les chlorophylles de la membrane thylacoïdienne qui constituent environ 20 à 30% du total lipidique de la membrane sont associées à des polypeptides spécifiques pour former des complexes pigment-protéine (Ortega et al., 1989). Les autres pigments des thylacoïdes sont les caroténoïdes qui exercent un rôle au niveau de la photoprotection de la collection de l'énergie lumineuse (Murphy, 1986).

## 2.6. Les pigments chlorophylliens

Ce sont des *chromoprotéines* dont le groupement prosthétique aisément détachable est une chlorophylle porphyrine (quatre noyaux pyrroles en cercle) avec un atome de magnésium au centre, quelques substitutions à la périphérie et en particulier un alcool à longue chaîne : *le phytol* (Darnell et Baltimore, 1993; Wolfe, 1993).

Schématiquement la molécule de chlorophylle se présente comme une sorte de cerf-volant dont le corps (1.5 nm de diamètre) tétrapyrrolique, serait hydrophile tandis que la queue (le reste phytol, 2 nm de long) serait lipophile. La chlorophylle-a est donc formée d'une porphyrine et d'une chaîne phytol. La porphyrine contient des noyaux appelés pyrroles. Ces noyaux sont disposés en une structure macrocyclique dans laquelle les quatre atomes d'azote centraux sont coordonnés au magnésium (Mg) pour former une structure extrêmement stable, située dans un seul plan. Le phytol est une longue chaîne latérale hydrophobe terpénoïde formée d'un alcool (Heller et al., 1993) (figure 2.4).

Il existe plusieurs chlorophylles qui ne diffèrent que par des détails. La chlorophylle-a est présente chez tous les végétaux. La chlorophylle-b dans laquelle un **-CH<sub>3</sub>** (encadré sur la figure 2.4) est remplacé par un **-CHO**. Elle ne se rencontre que chez les végétaux supérieurs (Cormophytes) et les algues vertes (Chlorophycées).

Dans les chloroplastes, les chlorophylles ne sont pas libres. Elles sont liées aux protéines membranaires des thylacoïdes. En outre, pour la chlorophylle-a

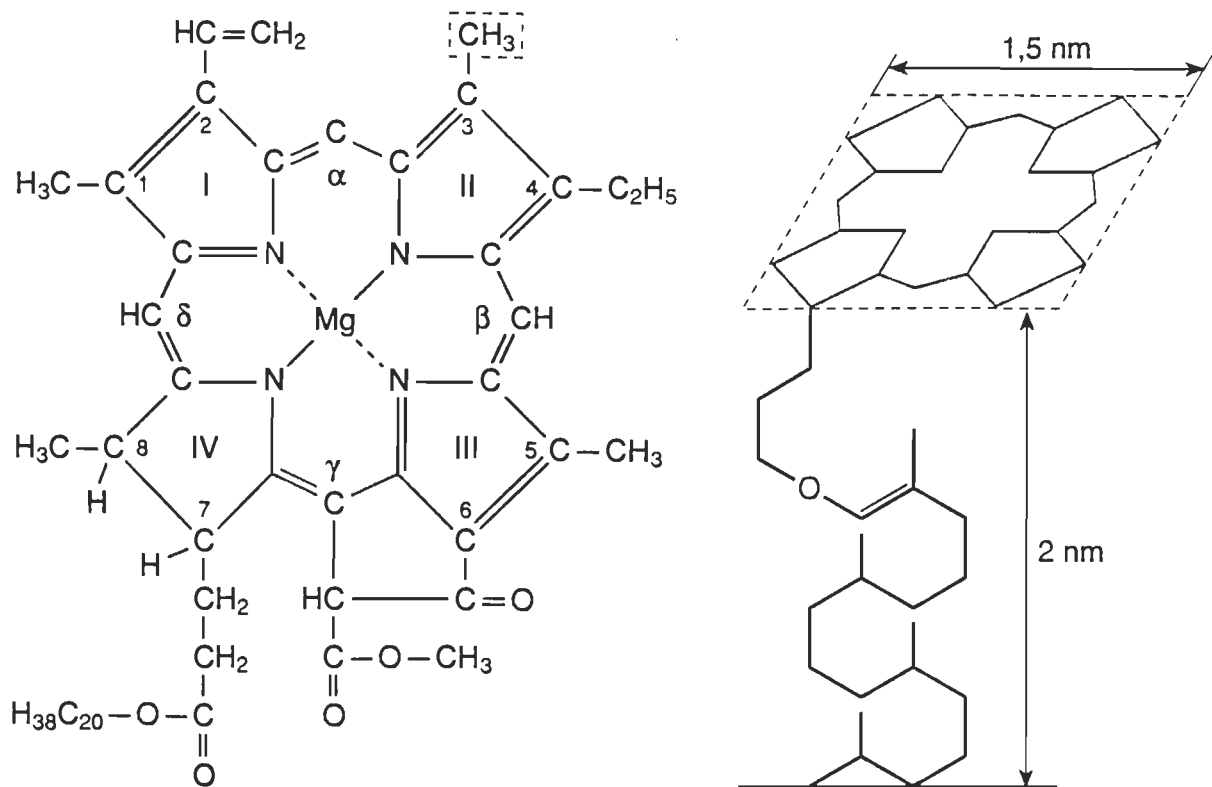


Figure 2.4. Structure chimique de la chlorophylle-a. Le groupement -CH<sub>3</sub> encadré est remplacé par un -CHO dans le cas de la chlorophylle-b. (Heller et al., 1993).

molécules voisines peuvent se souder entre elles par des liaisons de coordination. Les molécules voisines sont les molécules d'oxygènes, les molécules d'azotes, et le magnésium; d'où des «paquets» de chlorophylles aux phytols enchevêtrés, les dimères, les tétramères ou polymères de rang élevé. Ces complexes nommés parfois holochromes, se distinguent par leur spectre d'absorption et on les désigne par le pic de leur spectre dans le rouge (Heller et al., 1993).

Dans le PSII, on rencontre aussi les pigments actifs et accessoires. On appelle pigments actifs ceux qui interviennent directement dans l'acte photochimique initial de séparation des charges. Il s'agit pour les végétaux proprement dits de deux complexes de la chlorophylle-a dont nous avons déjà parlé : le P680 et le P700. Les pigments accessoires sont les autres formes de chlorophylle-a dont le rôle est cependant considérable du fait qu'elles retransmettent par résonance aux pigments actifs l'énergie qu'elles ont absorbée. Les caroténoïdes interviennent aussi à ce même titre.

Le spectre d'absorption des pigments photosynthétiques (figure 5) nous montre que les chlorophylles ont deux bandes d'absorption situées l'une dans le bleu et l'autre dans le rouge. La majeure proportion des formes de la chlorophylle-a absorbant aux plus courtes longueurs d'ondes sont fluorescentes et se situent dans le PSII. Les autres formes de chlorophylle-a qui absorbent aux plus grandes longueurs d'ondes sont faiblement fluorescentes et se situent dans le PSI.

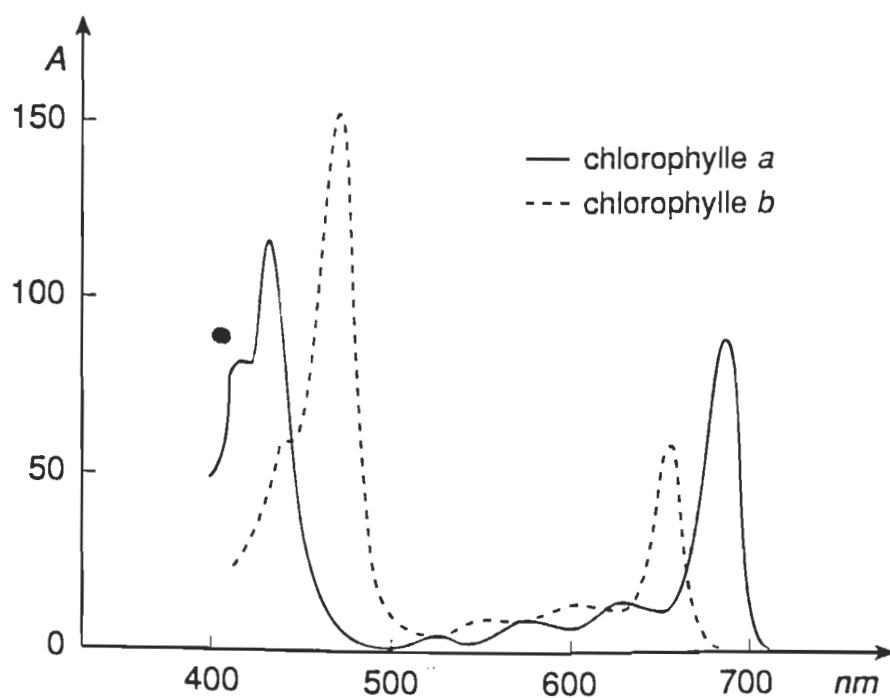


Figure 2.5. Spectre d'absorption des chlorophylles *a* et *b*. (Heller et al., 1993).

### **2.6.1. Localisation, et organisation des pigments photosynthétiques**

Chez les végétaux proprement dits, les pigments photosynthétiques sont localisés dans les chloroplastes. Ces derniers sont de volumineux organites de formes variées. Chez les Cormophytes, ils ont généralement l'aspect de lentilles arrondies (longueur 3 à 10  $\mu\text{m}$ , épaisseur 1 à 4  $\mu\text{m}$ ). Chez les algues ils peuvent se présenter sous forme de rubans (*Spirogyra*), de cloche (*Chlamydomonas*), d'étoiles (*Zygnéma*), etc. Ils garnissent presque tout le cytoplasme. Chez les bactéries phototrophes, les chloroplastes sont remplacés par des replis de la membrane interne, les chromophores (20 x 100 nm) (Heller et al., 1993).

Les pigments photosynthétiques sont situés dans les membranes des thylacoïdes, les pôles hydrophiles (porphyrine) des chlorophylles étant associés aux protéines de soutien. Leurs pôles lipophiles (phytol) sont associés aux lipides membranaires. Cette disposition très structurée joue un rôle essentiel dans l'acte photosynthétique, permettant notamment le transfert de l'excitation de pigment à pigment (Heller et al., 1993; Wolfe, 1993). Les systèmes d'oxydoréduction sont généralement en bonne position dans les membranes des thylacoïdes, ainsi que les ATP synthétases qui font saillie sur les faces donnant sur le stroma en de grosses verrues bien visibles au microscope électronique (figure 2.6).

### **2.6.2 Rôle des pigments photosynthétiques**

Le rôle principal des pigments photosynthétiques est d'absorber l'énergie

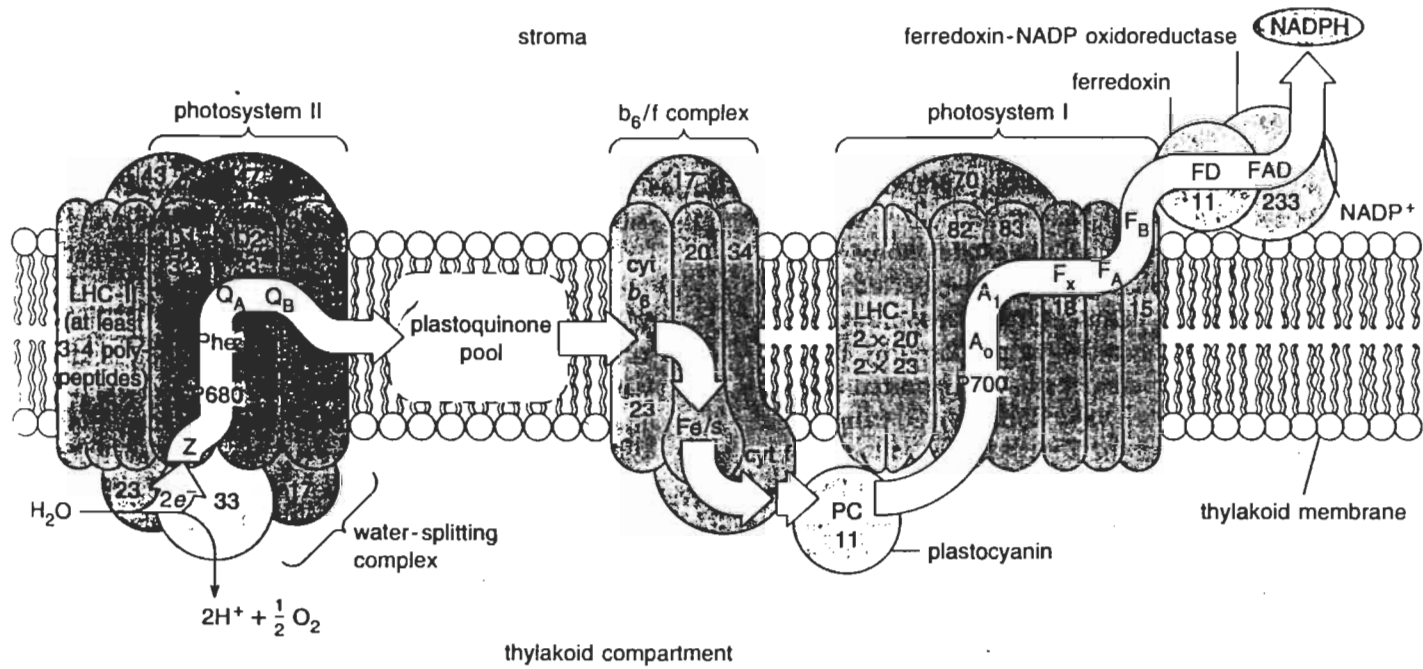


Figure 2.6. Schéma des thylacoïdes. (Wolfe, 1993).



électromagnétique (énergie lumineuse) et de l'acheminer vers les centres réactionnels des photosystèmes. À chaque photosystème est associé un accepteur et un donneur d'électrons ayant des potentiels rédox différents. Le transport d'électrons dans le photosystème II est formé d'une "paire d'électrons" de pigment chlorophyllien le P680 (donneur primaire d'électrons), d'un composé Z (donneur secondaire d'électrons) qui réduit la chlorophylle de la "paire spéciale"; d'une phéophytine (accepteur primaire) qui accepte l'électron provenant de la chlorophylle; de la quinone  $Q_A$  qui accepte l'électron de la phéophytine et de la quinone  $Q_B$  qui accepte l'électron de  $Q_A$  (Murata et Miyao, 1989). Grâce à leurs connexions aux chaînes caractéristiques de transport d'électrons (le cytochrome-b, le cytochrome-f et la plastocyanine), le transfert d'électrons s'ensuit vers le P700 (au niveau du PSI) et on aboutit finalement à la synthèse de NADPH. Cela donne à ces pigments la capacité de convertir l'énergie lumineuse captée par les antennes collectrices en énergie chimique nécessaire à la réduction du gaz carbonique. Les processus chimiques dans lesquels les électrons sont transformés d'une molécule à l'autre entre les deux photosystèmes, sont appelés réactions d'oxydoréduction. L'ensemble de ces réactions est décrit dans le paragraphe qui suit.

## **2.7. Le transfert d'électrons entre PSII et PSI**

Dans la phase lumineuse de la photosynthèse, les chlorophylles du LHCII sont excités (figure 2.7). Ces chlorophylles sont des pigments photosensibles qui par excitation vont voir leurs électrons passer du niveau fondamental au niveau

excité. L'énergie d'excitation sera donc transférée vers d'autres chlorophylles qui sont proches du centre réactionnel du PSII, le P680. Lorsque le P680 (un dimère de chlorophylle) qui trouve son maximum d'absorption à 680 nm (Diner, 1986) reçoit l'excitation électronique d'une chlorophylle du LHCII, il devient excité (P680\*). Pour perdre cette énergie, il libère un électron ( $e^-$ ) pour devenir P680<sup>+</sup>. Ce dernier se trouve dans un état oxydé avec un potentiel d'oxydoréduction de **+0.85 V** lui permettant ainsi de tirer un électron du donneur primaire Z. Le P680<sup>+</sup> va donc être un oxydant pour la tyrosine Z sur la protéine D-1 (Mino et al., 1993). La tyrosine deviendra Z<sup>+</sup> et servira à oxyder l'H<sub>2</sub>O par l'intermédiaire du complexe de dégagement d'oxygène (CDO) afin d'arracher des électrons à H<sub>2</sub>O pour que la tyrosine soit réduite et devenir Z (Govindjee et Coleman, 1990).

L'électron venant du P680<sup>+</sup> va réduire la phéophytine (Ph). Cette dernière va à son tour réduire une quinone A (Q<sub>A</sub>). La séparation des charges augmente lorsque successivement la phéophytine transmet son électron à la quinone A. Cette dernière donnera 2  $e^-$  au site de la quinone B (Q<sub>B</sub>) pendant que la charge positive portée par P680<sup>+</sup> est neutralisée par un électron provenant de Z, et que P680 recouvre sa configuration électronique. Lorsque la quinone B a acquis des électrons après deux cycles, elle capte 2 H<sup>+</sup> du stroma. Par la suite elle intègre le «pool» de plastoquinone (PQ) dans la matrice lipidique de la membrane pour former le plastoquinol (PQH<sub>2</sub>). Ce qui veut dire que PQ est réduite par les électrons et les 2H<sup>+</sup> au site Q<sub>B</sub>. Cette quinone sera remplacée par une autre non réduite (Barber, 1987; Govindjee et Coleman, 1985). La PQH<sub>2</sub> qui est mobile va perdre 2  $e^-$  au centre de Rieske (protéine Fe-s) du Cyt b<sub>6</sub>f ce qui permet le relargage de 2 H<sup>+</sup> dans le lumen du grana. Ces 2 H<sup>+</sup> en plus des 4 H<sup>+</sup> provenant de l'oxydation de l'H<sub>2</sub>O par le CDO vont créer un gradient de protons nécessaire

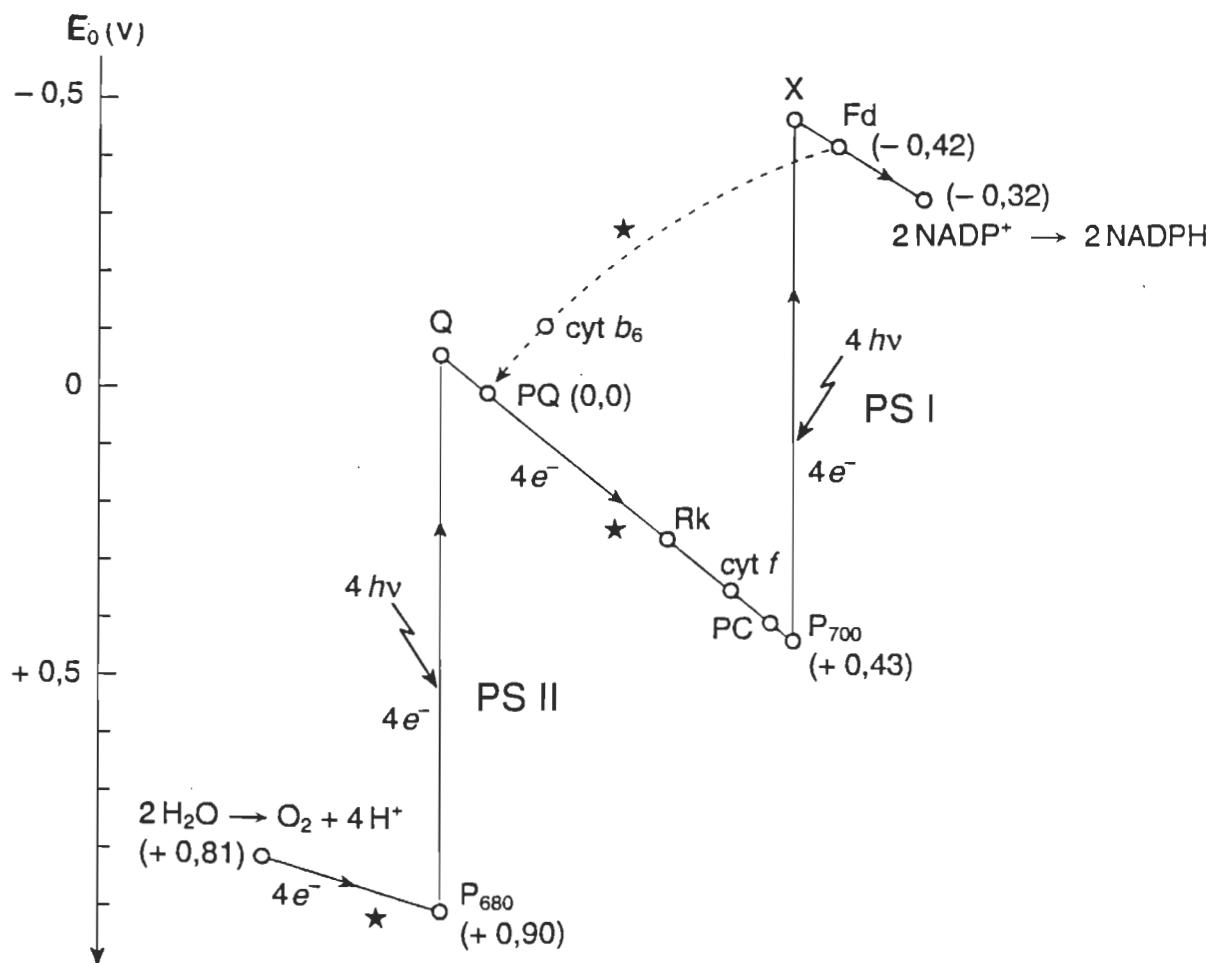


Figure 2.7. Schéma en Z décrivant le transfert d'électrons entre le PSI et le PSII. En continu le trajet acyclique. Étoiles: sites des photophosphorylations. Entre ( ), les potentiels d'oxydoréduction en volts. (Heller et al., 1993).

au fonctionnement de l'ATP synthétase. Le transport des électrons au niveau du complexe du PSII s'achève quand la tyrosine Z située à la face interne de la membrane recouvre son électron qui sera fourni par le cycle d'oxydation de l'eau  $S_0$ - $S_4$  (Ghanotakis et Yocum, 1985a).

Le transfert des électrons se poursuit vers le PSI. L'absorption de la lumière par le PSI induit une excitation des pigments, excitation qui est canalisée vers des molécules de chlorophylles spéciales appelées P700. Le P700 ainsi excité est capable de transférer un électron à l'accepteur primaire  $A_0$ . C'est la première étape d'une succession de transfert d'électrons depuis la plastocyanine (PC) jusqu'à la ferrédoxine (Golbeck, 1987). Ce phénomène correspond à une stabilisation de la séparation de charge. Le centre de Rieske réduit la PC qui est mobile. Les électrons de la PC sont transférés au centre réactionnel du PSI où le P700 réduit l'accepteur primaire  $A_0$ . Cet dernier ( $A_0$ ) réduit l'accepteur secondaire  $A_1$ .  $A_1$  à son tour réduit un complexe Fe-S ( $F_x$ ) qui donne ses électrons à une protéine contenant deux complexes Fe-S soit la  $F_A$  ou la  $F_B$ . Les propriétés chimiques des accepteurs  $A_1$  et  $F_x$  ne sont pas bien connues mais l'on pense que  $A_1$  serait une phylloquinone (vitamine  $K_1$ ) et  $F_x$  un centre de sulfure ferreux (FeS);  $F_A$  et  $F_B$  seraient liés au FeS alors que la ferrédoxine et la plastocyanine seraient respectivement un accepteur et un donneur d'électrons extrinsèques (Lagoute et Mathis, 1989). Les électrons venant de  $F_A$  ou de  $F_B$  réduisent la ferrédoxine (Fd). La ferrédoxine participe ainsi au flux d'électrons cyclique au niveau du PSI, un processus couplé à la translocation des protons et à la synthèse de l'ATP. Sous sa forme réduite, la ferrédoxine perdra son électron pour la réduction du  $NADP^+$  par l'intermédiaire du ferrédoxine nucléotide réductase FNR. Le trou d'électrons

laissé au niveau de la plastocyanine lors de cette séparation de charges sera comblée par des électrons provenant du PSII via le complexe cytochrome b<sub>6</sub>f.

Le Cyt b<sub>6</sub>f en plus des deux autres complexes protéiques (PSII, PSI) sont responsables du transport d'électrons. Ils permettent d'oxydation de l'H<sub>2</sub>O et la réduction du NADP<sup>+</sup> ainsi que les deux navettes mobiles associées.

## 2.8. Les photosystèmes

Un photosystème (PS) ou unité photosynthétique comprend *les pigments actifs* et des *antennes collectrices* de lumière. Les pigments actifs assurent les transferts d'électrons. Ils constituent le centre réactionnel de l'unité avec au moins une molécule de pigment actif par unité. L'acte photochimique fait intervenir successivement les deux photosystèmes PSII et PSI (dans l'ordre d'intervention), avec respectivement pour pigments actifs, le P680 et le P700. Les antennes collectrices formées de **pigments accessoires** constituent le complexe collecteur (LHC). On trouve deux types de LHC : le LHCII et LHCI. Ils sont respectivement associés aux photosystèmes PSII et PSI.

### 2.8.1 Le système photosynthétique I (PSI)

Le potentiel normal d'oxydoréduction du centre photosynthétique du PSI (c'est-à-dire le P700) est de **+0.43 V**. Le centre photosynthétique reçoit ses électrons de la plastocyanine. À l'autre bout de la chaîne, le PSI est capable de

réduire le  $\text{NADP}^+$ . La réduction s'effectue bien avec un maximum de rendement vers 700 nm. Mais elle n'est pas directe, elle passe par la ferrédoxine (Fd) dont le potentiel d'oxydoréduction est très bas: **-0.42 V**; la remontée thermodynamique est alors de **+0.85 V** comparable par conséquent à celle qui est assurée par PSII (Heller et al., 1993; Wolfe, 1993).

Le PSI des plantes supérieures est composé de huit sous-unités protéiniques d'environ deux cents molécules de chlorophylle-a, des caroténoïdes, des phylloquinones et des ions sulfureux. Le PSI peut être défini comme une unité structurale capable de catalyser la photo-réduction de la ferrédoxine en utilisant la plastocyanine ou le cytochrome  $b_6f$  comme un donneur d'électrons. Des mesures cinétiques de photo-oxydation du centre réactionnel du PSI ont permis à Svensson et al., (1991) de déterminer deux populations ( $\alpha$  et  $\beta$ ) de PSI. Ces deux types de PSI diffèrent les uns des autres par la taille de leur LHC, par leur composition en pigments chlorophylliens et par leur localisation au niveau de la membrane des thylacoïdes. Ce sont : le  $\text{PSI}_\alpha$  et le  $\text{PSI}_\beta$ . Le  $\text{PSI}_\alpha$  est localisé en périphérie de la région granaire et représente environ 35% du PSI total, alors que le  $\text{PSI}_\beta$  se trouve dans les lamelles du stroma en proportion beaucoup plus élevée (65%). Le LHC du PSI (LHCI) est une antenne périphérique constituée de chlorophylle-a/b-protéine avec une proportion importante de chlorophylle-b (Thornber, 1986). La taille de cette antenne est beaucoup plus grande dans la région granaire que dans la région stromatique, et le LHC du  $\text{PSI}_\alpha$  contient beaucoup plus de chlorophylle-b. Le pigment actif de PSI, est localisé dans un autre complexe de chlorophylle-a, le CPI (Svensson et Albertsson, 1991).

### 2.8.2 Le système photosynthétique II (PSII)

Ce système est appelé ainsi parce qu'il a été découvert après le PSI. Comparativement au PSI, il est activé par la lumière de longueurs d'onde plus courtes (680 nm). Des études cinétiques de fluorescence permirent à Anderson et Melis, 1983 de conclure qu'il existerait deux types PSII, à savoir *le PSII $\alpha$*  et *le PSII $\beta$* .

*Le PSII $\alpha$*  qui représenterait environ 70 à 80% du PSII total dans la membrane des thylacoïdes serait localisé uniquement dans les grana. *Le PSII $\alpha$*  participerait au transport linéaire d'électrons et à la photorylation non-cyclique (Horvath et al., 1987, et 1989). Quant au *PSII $\beta$* , il constituerait environ 20 à 30% du PSII total et se trouverait localisé presque en totalité dans les lamelles du stroma (figure 2.8).

Ces deux types de PSII diffèrent également par la dimension de leurs LHC. Le PSII $\alpha$  contient le LHCII intrinsèque et périphérique (mobile) alors que le PSII $\beta$  contiendrait uniquement le LHCII intrinsèque qui reste intimement lié (Horvath et al., 1989).

Le pigment actif du PSII serait le complexe de la chlorophylle-a (le P680). Les pigments accessoires seraient la chlorophylle-a 672, les complexes de la chlorophylle-b, les phycobilines chez les algues et certains caroténoïdes (Heller et al., 1993). Le potentiel normal d'oxydoréduction est de + 0.9 V. Ce pigment peut donc recevoir sans difficulté les électrons issus de l'eau selon la réaction d'Hill

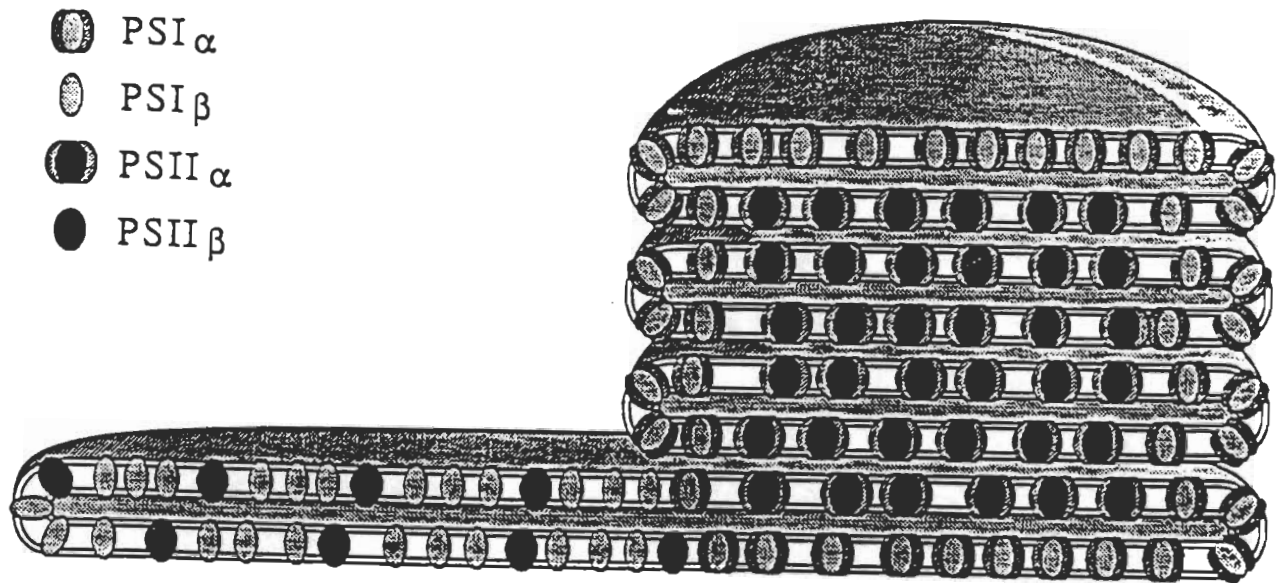
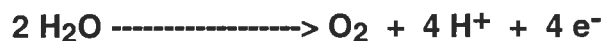


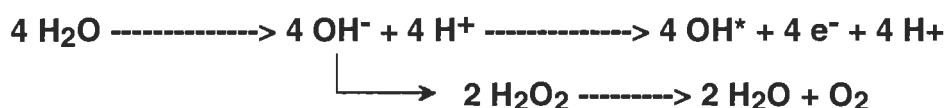
Figure 2.8. Modèle de membrane des thylacoïdes avec la distribution des photosystèmes (Svensson et al., 1991) Le  $\text{PSII}\alpha$  et le  $\text{PSII}\beta$  qui possèdent une antenne captrice de lumière de taille beaucoup plus importante se trouvent dans les grana. Le  $\text{PSII}\alpha$  est localisé dans la partie centrale de la région granaire, alors que le  $\text{PSI}\alpha$  se trouve en périphérie. Le  $\text{PSI}\beta$  et le  $\text{PSII}\beta$  sont localisés dans la région stromatique.



suivante :



Sur le mécanisme de cette réaction, on est peu renseigné. Le schéma anciennement proposé était le suivant:



(OH\*: hydroxyle ayant une valence libre du fait du départ d'un électron (e<sup>-</sup>))

### 2.8.3. Organisation moléculaire et composition polypeptidique du PSII

Certaines techniques telles que l'électrophorèse ont permis de connaître la composition photosynthétique du PSII plus en détail (Miyao et Murata, 1987). Selon cette technique, il serait constitué d'une vingtaine de polypeptides, des molécules de phéophytine, des quinones, des ions inorganiques, des lipides, des polyamines, etc. (figure 2.9). Il contient aussi environ deux cents molécules de chlorophylle (a et b), et des pigments accessoires. Le PSII peut être subdivisé en cinq groupes de constituants qui sont décrits au Tableau 2.1 (Murata et Miyao, 1987).

Le «**core**» complexe du PSII comporte cinq polypeptides hydrophobes et environ cinquante molécules de chlorophylle-a associées aux polypeptides de 47

et 43 kDa (Camm et Green, 1980). Selon Yamagishi et Katoh (1984), ces polypeptides peuvent être arrachés au complexe du PSII sans qu'il y ait une perte significative de photoactivité. Les polypeptides de 43 et 47 kDa agissent comme collecteurs de lumière interne en plus du LHCII qui est un complexe périphérique.

Deux autres polypeptides d'environ 34 et 32 kDa appelés respectivement D-1 et D-2, (Arntzen et Pakrasi, 1986; Barber, 1987; Nanba et Satoh, 1987; Govindjee et al., 1990) constituent le centre réactionnel proprement dit du PSII. Le polypeptide D-1 forme un site de fixation pour la quinone  $Q_B$  (accepteur secondaire d'électrons du PSII) et aurait une grande affinité pour les herbicides tels l'atrazine et le DCMU (3-[3,4-dichlorophylleorophényl]-1,1-diméthyl-urée) (Sandmann et Böger, 1986; Heller et al., 1993). Le polypeptide D-2 lie la quinone  $Q_A$  (Govindjee et al., 1990).

La tyrosine (Z) donneur primaire d'électrons au P680, serait localisée sur le polypeptide D-1 (Takahashi et al., 1986). La tyrosine D (semblable et symétrique à la tyrosine Z photo-oxydable et qui ne participe pas au transfert d'électrons de l'eau au centre réactionnel P680) serait quant à elle, localisée sur le polypeptide D-2 (Rutherford, 1989), (figure 9).

Proche de ces quatre polypeptides du "core" complexe, existe le **cytochrome b-559** localisé du côté oxydant du PSII et de masse moléculaire variant entre 4 et 10 kDa. C'est un dimère- $\alpha\beta$  (Widger et al., 1985) qui, avec les polypeptides de 47 kDa et 43 kDa entoure le complexe D-1 et D-2 (Murata et al., 1984; Rutherford, 1989; simpso et Von, 1989).

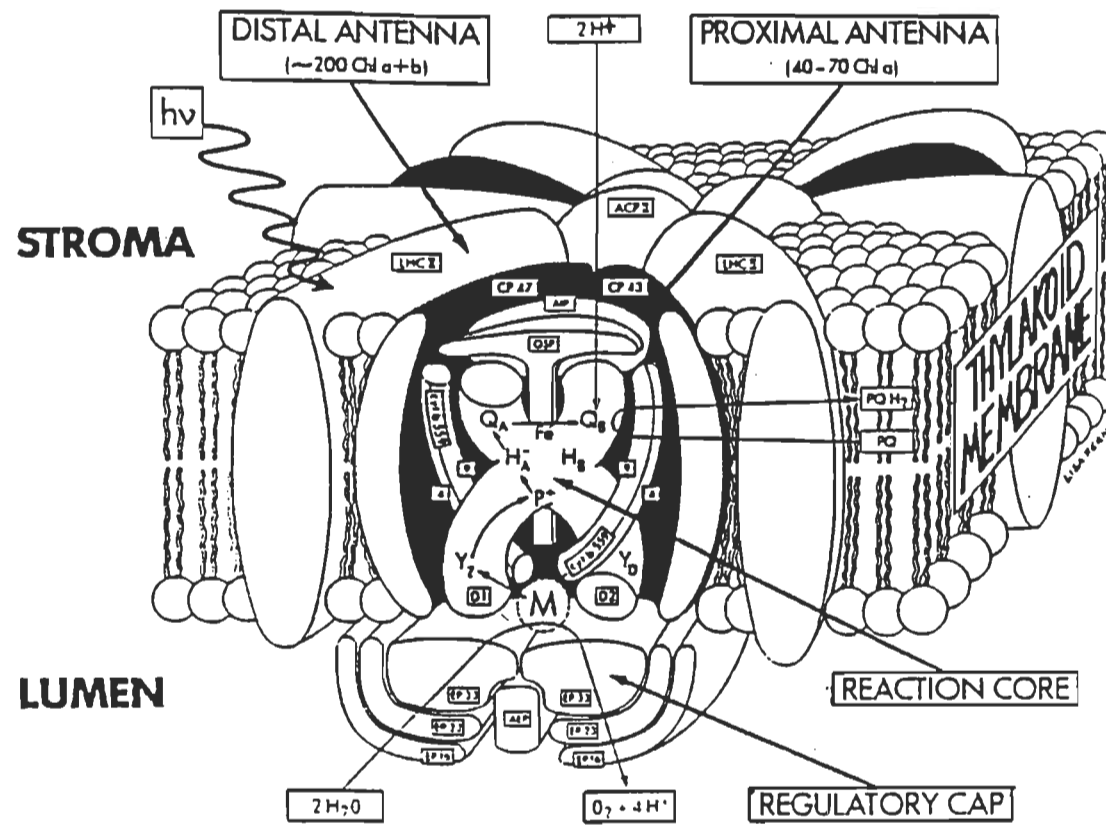


Figure 2.9. Représentation schématique du centre réactionnel du PSII avec les antennes proximale et distale (Hansson et Wydrzynski, 1990).

Tableau 2.1. Composition des protéines et des pigments-protéines dans le complexe du photosystème II d'épinard (Murata et Miyao, 1987).

Composés	Caractéristiques	Stoechiométrie
<u>Protéines du core complexe</u>		
47 kDa	Chl-protéine	1
43 kDa	Chl-protéine	1
34 kDa	protéine D1	1
32 kDa	protéine D2	1
9 kDa ]	cyt b-559	2
4 kDa ]		2
<u>Protéines extrinsèques</u>		
33 kDa	hydrophile	1
23 kDa	hydrophile	1
18 kDa	hydrophile	1
<u>Complexes capteurs de lumière</u>		
25 et 28 kDa	Chl-protéine	-
<u>Autres protéines</u>		
24 kDa	hydrophobe	-
22 kDa	hydrophobe	-
10 kDa	hydrophobe	-
10 kDa	phosphoprotéine	-
5 kDa	hydrophile	-
<u>Pigments et autres composés</u>		
chl a + b		~200
Pheophytine		2
Plastoquinone		3
Lipides		~300
Mn <sup>2+</sup>		4

Au centre réactionnel du PSII se trouve le LHC intimement lié. Le LHC est constitué à moitié de chlorophylle-a et -b, et de protéines de 25 et 28 kDa. Selon Staehelin (1986), il existerait un deuxième type de LHC qui se déplacerait latéralement au travers de la membrane suite à sa phosphorylation parce qu'il est mobile (Kyle et al., 1984) pour servir le PSI et qui aurait de ce fait un rôle dans la régulation de la distribution de l'énergie lumineuse entre les deux photosystèmes. Notons aussi que ces LHC joueraient non seulement le rôle d'antennes mais contribueraient aussi à l'empilement des thylacoïdes pour la formation des grana (Iordanov et Goltsev, 1987; Allen, 1992).

Des chercheurs tels qu'Ikeuchi et al., 1985 ont tenté de mieux comprendre la complexité du PSII. Ils l'ont scindé en ses plus petits composants par chromatographie. Ils ont aussi caractérisé par électrophorèse à deux dimensions. Ils ont prouvé que le petit appareil qui pourrait oxyder la molécule d'eau et produire de l'oxygène est le centre réactionnel comprenant les atomes de manganèse et la protéine de 33 kDa.

## **2.9. Le complexe de dégagement d'oxygène (CDO)**

Le CDO est constitué de trois protéines extrinsèques du PSII de poids moléculaires de 16 kDa, 23 kDa, et 33 kDa, et de quatre atomes de manganèse (Mn). Ces atomes assurent son rôle catalytique pour oxyder deux molécules d'eau ( $2\text{H}_2\text{O}$ ) en quatre protons ( $4\text{H}^+$ ), quatre électrons ( $4\text{e}^-$ ) et en molécule d'oxygène ( $\text{O}_2$ ) (Govindjee et Coleman, 1990). Il existe d'autres constituants protéiniques qui sont des composés hydrophobes. Ce sont les polypeptides de

10, 22, et 24 kDa, une phosphoprotéine de 10 kDa et une protéine hydrophile de 5 kDa (Murata et Miyao, 1987b; Murata et Miyao, 1985; Ghanotakis et Yocum, 1985; Andersson, 1986). Le rôle de ce complexe est de dégrader l'eau et de produire de l'oxygène (Murata et Miyao 1985, Ghanotakis et Yocum 1985, Andersson 1986). Il est composé de protéines de masse moléculaire de 16 kDa 23 kDa et de 33 kDa, associé au PSII par la surface interne de la membrane des thylacoïdes (figure 2.9). Ces polypeptides sont très hydrophiles en raison de leurs indices de polarité respectifs (49, 49, 52); ils sont respectivement acide, neutre et basique. Ils ont des points isoélectriques respectifs de 5.2, 6.4 à 7.3 et 9.5 (Kuwabara et Murata, 1984; Jansson, 1984; Miyao et Murata, 1985).

Le polypeptide de 33 kDa est relié au système photosynthétique par des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogène (Miyao et Murata, 1989). Quant aux protéines de 23 et 16 kDa, leur rattachement au complexe du PSII est régi par des liaisons électrostatiques (Andersson, 1986). Miyao et Murata, 1987b, ont montré que le polypeptide de 33 kDa est capable d'accélérer la transition de l'état  $S_3$  à l'état  $S_0$ , c'est-à-dire la catalyse de la réaction de dégradation de l'eau, et que cette protéine joue le rôle de régulateur dans la stabilisation des atomes de manganèse (Miyao et Murata, 1987b; Ghanotakis et Yocum, 1990). Les atomes de Mn sont indispensables pour la production d'oxygène. Ils catalysent l'oxydation des nouvelles molécules d'eau.

L'activité de dégradation de l'eau nécessite quatre atomes de manganèse par centre réactionnel P680 (Govindjee et Coleman, 1990). Les polypeptides de 23 et 16 kDa ne participeraient pas directement au mécanisme catalytique de la dégradation de l'eau car on peut obtenir une production d'oxygène en leur

absence du complexe du PSII (Ghanotakis et al., 1985). La protéine de 23 kDa, serait un régulateur qui augmenterait l'affinité du site d'oxydation de l'eau aux ions chlorures (Andersson et al., 1984). Elle peut être remplacée par des ions calcium (Ghanotakis et al., 1984; Miyao et Murata, 1984). La protéine de 16 kDa est fixée sur le polypeptide de 23 kDa. Son rôle n'est pas encore très bien connu. On pense qu'elle augmenterait aussi l'affinité du PSII aux ions chlorures et calcium (Ghanotakis et al., 1984; Miyao et Murata, 1985).

## CHAPITRE III

### MATÉRIELS ET MÉTHODES

#### 3.1 Matériel utilisé

##### 3.1.1 Produits chimiques utilisés

Les produits chimiques (DCBQ, DMSO,  $\text{MgCl}_2$ , NaBr,  $\text{NaNO}_3$ , NaI, Spermine, PMSF, Spermidine, et cholestérol) utilisés dans ce travail pour la préparation des solutions proviennent de Sigma Chemical Company (St-Louis, MO, USA). Le NaCl provient de Fisher Scientifique (Ottawa, ON, Canada).

##### 3.1.2 Fenêtres utilisées

Les fenêtres de AgBr de dimensions de 25 mm de diamètre et 2 mm d'épaisseur, couvrant la région allant de  $5000\text{ cm}^{-1}$  à  $500\text{ cm}^{-1}$  avec pour indice de réfraction  $n = 1.5$ , proviennent de la compagnie Harrick Scientific (Ossining, NY, USA).



### **3.1.3 Logiciel de calcul utilisé**

Les manipulations spectrales et les calculs ont été effectués accomplis avec le logiciel Spectra Calc de la compagnie Galactic Industries Co., (Salem, New Hampshire, USA).

## **3.2 Méthodes expérimentales et techniques utilisées**

### **3.2.1 Préparation des membranes du PSII et des complexes**

Les particules submembranaires du PSII ont été isolées des feuilles fraîches d'épinard en se reportant à la méthode de Berthold, Babcock, et Yocum, (1981) suivi d'une petite modification. Les feuilles découpées d'épinard (100 g) sont rincées à l'eau distillée en présence de glace, puis coupées plus ou moins finement après avoir déshydraté leurs surfaces.

Les feuilles sont ensuite broyées dans un broyeur domestique en présence d'un tampon d'homogénéisation contenant 50 mM de tricine-NaOH (pH=7.6), 10 mM de NaCl, 5 mM de  $MgCl_2$ , 0.4 M de Sorbitol, 6 mM d'ascorbate et 1 mM de PMSF (phényl méthyl-sulfonyl fluoride) à une vitesse maximale pendant 30 secondes. La solution résultante est filtrée à travers un coton fromage afin d'éliminer les débris de feuilles. Le filtrat contenant les chloroplastes et les autres organelles du cytoplasme est centrifugé pendant 6 minutes à 4000 rpm avec un

rotor SS-34. Cette centrifugation permet de les séparer des enzymes (libérées lors du broyage) ainsi que les débris cellulaires de petites dimensions.

Le culot contenant les chloroplastes isolés est resuspendu dans un tampon de resuspension qui a la même composition que le tampon d'homogénéisation sans Sorbitol, puis centrifugé à 4000 rpm (rotor SS-34) pendant 6 minutes. Cette étape permet aux chloroplastes de s'éclater et de libérer le compartiment stromatique.

Le culot résultant est resuspendu dans un tampon de lavage contenant 20 mM de MES-NaOH (pH = 6.5), 15 mM de NaCl, 10 mM de  $MgCl_2$  et 4% de Triton X-100 afin d'obtenir une concentration de 1 mg de Chl/ml. Après l'incubation de 20 minutes de l'extrait à 2° C et à l'obscurité, le mélange est centrifugé à 9500 rpm (rotor SS-34) pendant 6 minutes. Les particules de PSII sont récupérées puis centrifugées à 17500 rpm (rotor SS-34) pendant 25 minutes et resuspendues dans le même tampon précédent cette fois-ci dépourvue de triton X-100 à une concentration en Chl de  $2 \text{ mg.ml}^{-1}$ . Cette concentration de la chlorophylle été déterminée à partir de la mesure de la densité optique d'un mélange de 5 ml d'acétone (80%) selon la formule suivante:

$$CChl \text{ (mg/ml)} = [8.02 \text{ (densité optique à 663 nm)} + 20.2 \text{ (densité optique à 645 nm)}] * 0.4, \text{ (Arnon, 1949).}$$

### 3.2.2. Composition des différents tampons utilisés pendant l'extraction du PSII

Le tampon d'homogénéisation est composé de Tricine-NaOH (1 M)-(pH 7.6), de NaCl (2 M), de  $MgCl_2$  (1 M), de Sorbitol (2 M), d'ascorbate (acide), PMSF (100 ml/100 ml), le tout dans un *volume total*: 300 ml.

Le tampon de resuspension Tricine-NaOH (1 M)-(pH 7.6), du NaCl (2 M), de NaCl (2 M), du  $MgCl_2$  (1 M), d'ascorbate (100 mg), le tout dans un *volume total*: 100 ml.

Le tampon de lavage est composé de MES-NaOH (1 M)-(pH 6.2), du NaCl (2 M), du  $MgCl_2$  (1 M), le tout dans un *volume total*: 100 ml.

## 3.3. Techniques de mesures et d'analyses utilisées

### 3.3.1 Préparation des films (complexes)

Les échantillons des complexes anions-PSII, polyamines-PSII, et cholestérol-PSII ont été préparés par addition de quantités appropriées d'anions, de polyamines, et de cholestérol dans la solution de PSII déjà préparée pour obtenir les concentrations désirées de 0.01, 0.1, 1, 5, 10, et 20 mM de complexes. Une quantité de 100  $\mu$ l de chaque préparation ont été déposés sur les fenêtres de AgBr pour être séchés à la lumière verte ou à l'obscurité pendant 10 à 24 heures à une température ambiante d'environ 25° C pour éliminer les traces d'eau ( $H_2O$ ) des préparations. Cela évite l'apparition de larges bandes dans les régions

étudiées. La référence de chaque échantillon sur chaque fenêtre de AgBr est préalablement prise avant l'enregistrement des spectres FTIR.

### 3.3.2. Enregistrement des spectres d'absorption FTIR

Le spectromètre utilisé pour l'analyse en infrarouge est un **spectromètre Bomem DA3.02 infrared Fourier transform** (Bomem Inc, Vanier, Québec, Canada). Ce dernier est équipé d'un détecteur MCT (Mercure-Cadmium-Tellure ou HgCdTe) et d'une séparatrice en bromure de potassium (KBr). Son séparateur de faisceau est constitué de germanium et couvre la région de  $5000$  à  $500\text{ cm}^{-1}$ , la vitesse de balayage est de  $0.50\text{ cm/sec}$  avec une ouverture de faisceau de  $1.5\text{ mm}$  et une résolution de  $2$  à  $4\text{ cm}^{-1}$ . Son système est muni d'un filtre passe-bas de  $20.0\text{ kHz}$  et d'un filtre passe-haut de  $2.0\text{ Hz}$ . Les spectres d'absorption ont été obtenus par addition de 100 interférogrammes pour chaque spectre. Les spectres infrarouge ont été reproduits dans la région de  $4000\text{ cm}^{-1}$  à  $600\text{ cm}^{-1}$ . Ils ont été enregistrés avec une résolution de  $2\text{ cm}^{-1}$  et traité par la suite avec le logiciel Spectra Calc afin d'en obtenir la différence entre deux spectres, la dérivée seconde et faire la simulation spectrale de la bande amide I. Cette simulation permet de quantifier les sous-bandes de l'amide I.

Un exemple de spectre FTIR enregistré avec l'appareil utilisé dans ce travail est présenté plus loin dans le texte à la figure 4.3.

### 3.3.3. Méthodologie d'analyse des spectres d'absorption FTIR

La spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (FTIR) est l'une des méthodes spectroscopiques les plus performantes récemment mises au point. Elle permet de faire ressortir les changements électroniques et structuraux qui surviennent au niveau des molécules. L'analyse des spectres d'absorption FTIR révèlent la nature chimique des éléments ou des substances associées à la protéine et renseigne sur son environnement moléculaire.

L'enregistrement des spectres d'absorption FTIR nous a donc permis d'interpréter au cours de notre investigation les interactions, les changements conformationnels et structuraux intervenus au niveau du PSII traité. Durant la période d'expérimentation, les échantillons se trouvaient tous dans le même état. Par la suite, en comparant les spectres on peut observer des déplacements de fréquences entre deux états différents d'une même substance (entre une molécule traitée et celle non traitée). Il suffit de vérifier l'identité de chacune des bandes du spectre de référence (non traité) et du spectre du produit étudié (traité) qui ont été tracés dans les mêmes conditions d'échantillonnage et avec le même appareil. Le nombre d'ondes doit être considéré comme déterminé avec une certaine précision de quelques  $\text{cm}^{-1}$  selon les zones du spectre (Hamon et al., 1990).

L'interprétation de l'ensemble d'un spectre infrarouge est beaucoup plus compliquée parce que les molécules qui absorbent des radiations infrarouges subissent non seulement des elongations, mais aussi divers mouvements de déformation angulaire, de même que des combinaisons de ces effets. Les vibrations de déformation angulaire sont le plus souvent de plus faible intensité.

Elles chevauchent avec d'autres absorptions et elles peuvent apparaître sous forme de profils compliqués.

Nous considérons ici deux types de vibrations : les vibrations d'élongation et les vibrations de déformation. La première est une vibration au cours de laquelle deux atomes se rapprochent et s'éloignent périodiquement (Tu, 1982). Dans la seconde, ce sont les angles entre les liaisons qui sont modifiés. Parmi ces vibrations, celles qui sont observées en infrarouge sont seulement celles qui entraînent des variations périodiques du moment dipolaire de la molécule. Ce sont en effet les perturbations survenant dans la molécule par les diverses vibrations qui sont responsables de l'interaction se produisant entre cette molécule et le champ électromagnétique oscillant de la radiation infrarouge.

#### **3.3.4. Méthode de différences entre spectres FTIR**

Les différences des spectres d'absorption sont effectuées afin de constater les interactions qui peuvent avoir lieu au niveau des protéines du PSII lorsque celles-ci forment des complexes avec les substances utilisées (anions inorganiques, polyamines, et cholestérol). La différence spectrale : [(solution de PSII + solution d'anions, de polyamines, ou de cholestérol) - (la solution de PSII)] est obtenue en utilisant la bande de C-H d'élongation à  $2900\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$  pour tous les échantillons enregistrés (contenant les mêmes quantités de protéines). Les corrections des spectres ont été fait en effectuant les lignes de base de chaque spectre. Ces lignes de base ont été effectuées à partir des bandes sur les spectres qui ne subissent pas de changement quelque soit la concentration entre 0.01 mM et

20 mM. Sur les figures de différence spectrale, nous avons reproduit les différents spectres dans la région des bandes amides I et II (entre 1800 et 1500  $\text{cm}^{-1}$ ).

### 3.3.5. Détermination des protéines secondaires du PSII

Les techniques différentes généralement utilisées en FTIR pour décomposer l'enveloppe de la bande de l'amide I en ses composantes primitives sont **la dérivée seconde** (Dong et Caughey, 1992), **la simulation spectrale** (Surewicz et al., 1987), et **l'analyse par la méthode des moindres carrés** (Dousseau et Pézolet, 1990).

La méthode de la simulation spectrale est une des méthodes efficaces pour déterminer et estimer des pourcentages relatifs des différentes structures (hélice- $\alpha$ , feuillet- $\beta$ , coude- $\beta$ ,  $\beta$ -antiparallèle, etc.) de la bande amide I (Byler et Susi, 1986). Dans l'étude de la conformation structurale des protéines, la bande amide I est généralement utilisée pour étudier la conformation des protéines, plutôt que la bande amide II. Cette bande est particulièrement intéressante à cause de sa très grande sensibilité (Byler et Susi, 1986). La structure fine de la bande amide I ne peut être déterminée que par la résolution de son spectre original.

L'analyse quantitative des structures secondaires des protéines à l'aide de la bande amide I du PSII a donc été mise en exergue dans ce travail en se reportant aux méthodes de (Byler, et Susi, 1986; Surewicz et Mantsch, 1988).

À partir de la dérivée seconde nous avons pu identifier cinq bandes dans la région de l'amide I entre  $1700\text{ cm}^{-1}$  et  $1612\text{ cm}^{-1}$ , dont l'attribution est basée sur des études antérieures des protéines à structure secondaire déjà connue. Avec la simulation spectrale, nous avons quantifié les surfaces des différentes sous-structures dans la région de l'amide I du PSII. Par la suite, nous avons utilisé les fréquences des bandes d'absorption qui ont été identifiées par la technique de la dérivée seconde pour localiser le maximum des bandes constituant l'enveloppe totale de l'amide I. Les intensités des pics ainsi que les largeurs à mi-hauteurs des sous bandes ont été ajustées par l'ordinateur. Les surfaces relatives des composantes secondaires ont été calculées en utilisant la méthode itérative de Lorentz. À partir des surfaces de chaque structure secondaire et de surface globale de l'enveloppe de l'amide I, l'on détermine les pourcentages des différentes structures présentes dans l'enveloppe (l'hélice- $\alpha$ , le feuillet- $\beta$ , le coude- $\beta$ , le  $\beta$ -antiparallèle, le random). On a essayé avec cette méthode, de reproduire avec une très bonne approximation l'enveloppe originale de la bande amide I à partir des enveloppes des composantes ou sous-structures secondaires. On a fait la même chose pour chaque spectre. Le cycle est répété plusieurs fois, jusqu'à ce que la marge d'erreur entre l'enveloppe originale et celle ajustée soit minimale et tende vers zéro. Ce qui résulte de la simulation est analysé. Chacune des bandes Lorentzienne secondaires obtenues par la simulation spectrale est assignée à une structure secondaire en fonction de sa fréquence.

Ainsi, dans le PSII pur, les composantes localisées autour de  $1658\text{ cm}^{-1}$  sont attribuées à hélice- $\alpha$ , les composantes localisées autour de  $1636\text{ cm}^{-1}$  attribuées aux feuillets- $\beta$ . Les composantes entre de  $1685\text{ cm}^{-1}$  et  $1674\text{ cm}^{-1}$  sont attribuées au coude- $\beta$ . Les composantes détectées autour de  $1643\text{ cm}^{-1}$  sont



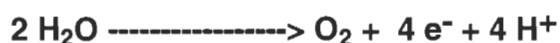
attribuées aux structures non ordonnées (random) (De Las Rivas et al., 1997). Celles autour de  $1691\text{ cm}^{-1}$  sont attribuées à  $\beta$ - antiparallèle (He et al., 1991; Byler et Susi, 1986).

### 3.3.6. Mesure du dégagement d'oxygène

L'appareil utilisé pour mesurer le dégagement d'oxygène provenant de l'illumination du complexe du PSII est constitué d'une anode (électrode d'argent), et d'une cathode de platine et un pont de solution de KCl à moitié saturé. Celui-ci assure une continuité électrique entre les deux électrodes (Hansatech D. W. Oxygen Electrode Unit, King's Lynn, Norfolk, England). L'ensemble des deux électrodes constitue ce qu'on appelle une électrode type "Clark". C'est avec cette électrode que le taux de dégagement d'oxygène est mesuré. L'électrode de type "Clark" est recouverte d'une membrane de Téflon (polymère) de **0.0125 mm** d'épaisseur perméable à l'oxygène qui la sépare du milieu réactionnel (Heller et al., 1993). Ce système d'électrodes beaucoup mieux adapté, permet d'enregistrer une réponse presque instantanée, caractéristique des réactions photosynthétiques (Delieu et Walker, 1972).

Dans la cellule de mesure se trouve un compartiment de verre en silicate de bore. Dans ce compartiment circule de l'eau maintenue à une température de  $22^{\circ}\text{C}$  ( $295\text{ K}$ ) donnée par un bain thermostaté. L'appareil de mesure a principalement la possibilité de réaliser des mesures dans un volume très faible de 0.5 à 2 ml.

L'activité des particules de PSII ( $0.02 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$  de Chl) est mesurée en présence de  $6 \text{ } \mu\text{l}$  de DCBQ (solution initiale de DMSO =  $31.86 \text{ mg/ml}$ ) utilisé comme accepteur artificiel d'électrons et de  $15 \text{ } \mu\text{l}$  de Chl. Après une période d'agitation, à une température de  $295 \text{ K}$  dans la chambre de réaction, avec un milieu tampon approprié (MES-NaOH  $20 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 6.2$ ; NaCl  $2 \text{ mM}$ ;  $\text{MgCl}_2$   $1 \text{ mM}$ ), les échantillons sont d'abord barbotés avec de l'azote pendant environ 30 secondes. On introduit l'électrode dans la cellule en prenant soin d'enlever les bulles d'air formées pendant le barbotage. Ensuite, on remet l'agitation en marche pour irradier les échantillons par une lumière blanche à intensité saturante. Cette irradiation dure environ une minute. Pendant ce temps, il se produit un dégagement d'oxygène selon la réaction suivante:



### 3.3.7. Principe de mesure du dégagement d'oxygène

Lorsqu'on plonge deux électrodes dans une solution contenant un système rédox (la cathode (pôle «-») étant susceptible de fournir des électrons au système, et l'autre l'anode (pôle «+») susceptible de lui en prélever), un flux d'électrons transitant par le système apparaît. Ce flux se retrouve dans le circuit sous forme d'un courant électrique dont l'intensité est proportionnelle à la concentration du système (Heller et al., 1993). L'enregistrement de ce courant ou polarogramme, permet donc de connaître cette concentration. Or l'oxygène est un accepteur d'électrons (en milieu neutre) selon la réaction suivante:



La méthode polarographique peut donc lui être appliquée. Tel est le principe de l'électrode à oxygène (électrode de Clark).

La cathode peut être en platine ou en or tandis que l'anode est en argent. Les deux baignent dans une solution de KCl à moitié saturée. L'ensemble se trouve dans un tube obturé par une membrane mince et résistante, perméable à l'oxygène (Téflon par exemple). L'électrode est plongée dans le milieu à analyser. L'équilibre s'installe entre les concentrations de O<sub>2</sub> dans le milieu et dans la solution de KCl à moitié saturée.

Lorsque la cathode est mise sous tension entre **0.6** et **0.8 V**, la réaction (1) se déclenche et des électrons sont émis par la cathode (figure 3.1). Ils seront acheminés à l'anode non pas par les ions OH<sup>-</sup> près de la cathode, mais par les ions Cl<sup>-</sup> qui réalisent avec l'argent la réaction suivante:



Le principe de la polarographie consiste donc à réduire au niveau de la cathode de l'oxygène en peroxyde d'hydrogène. Le courant ainsi généré est directement proportionnel à la quantité d'oxygène réduite, c'est à dire à la capacité du matériel photosynthétique de dégager ou de consommer de l'oxygène. Lorsque la différence de potentiel aux bornes des électrodes est comprise entre **-0.6** et **-0.9 V**, il se forme à la surface de l'électrode de platine du peroxyde d'hydrogène réduit. Ceci donne naissance à un courant proportionnel à la quantité d'oxygène produite par le matériel photosynthétique et consommée à la cathode. La variation de l'oxygène dans le milieu nous a permis d'étudier la modification de

l'activité de dégagement d'oxygène au niveau des particules de PSII. L'oxygène formé lors de la photolyse de l'eau peut être calculé par la formule:

$$X * 15.72 \mu\text{mole O}_2/\text{h mg Chl}$$

où **X** est la pente de la droite de dégagement d'oxygène à la vitesse de déroulement du papier de 1 cm / minute.

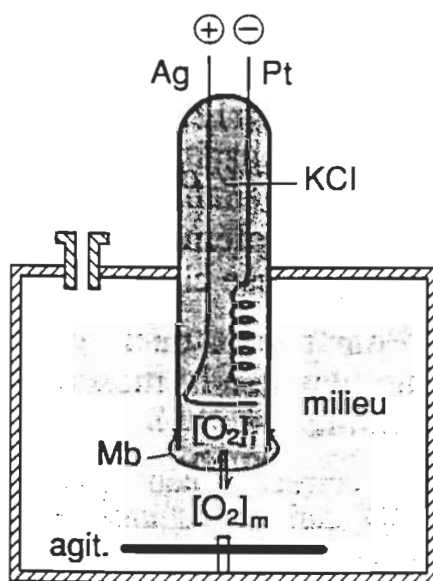


Figure 3.1 Principe de l'électrode à oxygène dans la méthode du dégagement d'oxygène par la méthode polarographique. Mb: membrane perméable à l'oxygène. (Heller et al., 1993).

## CHAPITRE IV

### GÉNÉRALITÉS SUR LA SPECTROSCOPIE INFRAROUGE (FTIR)

#### 4.1 Spectroscopie infrarouge

##### 4.1.1 L'infrarouge

Compris entre le visible et les micro-ondes, l'**infrarouge** se subdivise en trois parties : le proche infrarouge situé entre 13 000 et 4 000  $\text{cm}^{-1}$ , l'infrarouge moyen situé entre 4 000 et 200  $\text{cm}^{-1}$ , et l'infrarouge lointain situé entre 200 et 10  $\text{cm}^{-1}$  (Szafran et al., 1991). La spectroscopie infrarouge est basée sur l'étude des réactions entre la matière et un rayonnement électromagnétique. Ce dernier peut être défini par sa fréquence  $\nu$  exprimée en hertz (Hz) ou par son nombre d'onde,  $\nu$  s'exprime habituellement en  $\text{cm}^{-1}$  ou en kayser. Il représente le nombre d'onde contenu dans l'intervalle de **1 cm** (Chavanne et al., 1991). Dans notre investigation, nous nous sommes limités au domaine de l'infrarouge moyen (dans la région de 4000 à 600  $\text{cm}^{-1}$ ), ceci correspond à des énergies allant de 4 à 40  $\text{kJ.mol}^{-1}$ .

Un spectre infrarouge est complexe. Cette complexité peut être augmentée par l'apparition de bandes supplémentaires dues **aux harmoniques des fréquences fondamentales d'absorption  $\nu_f$**  de plus faible intensité. Elles

peuvent être observés à 2  $\nu_f$ , 3  $\nu_f$ , ou **aux bandes de combinaisons de fréquences**, qui correspondent à la somme de deux fréquences fondamentales.

Des bandes fondamentales peuvent ne pas apparaître dans les cas suivants : la vibration n'entraîne pas de variation du moment dipolaire de la molécule, ce qui se produit souvent dans le cas des composés à structure très symétrique; les vibrations se produisent à des fréquences très proches ou à la même fréquence; l'absorption est trop faible pour que la bande soit visible.

#### 4.1.2. Rayonnement électromagnétique

Un rayonnement électromagnétique est constitué d'un faisceau de particules : les photons, dont le mouvement est décrit au moyen d'équations de la mécanique ondulatoire. Cette dernière a montré que la lumière participe à la fois à des propriétés d'onde et de particules. Quand elle se heurte à la matière, on peut la considérer comme des paquets discrets d'énergie (quanta) appelés photons (Darnell et Baltimore, 1993). Les interactions entre la matière et un rayonnement auquel elle est soumise sont nombreuses. Les plus intéressantes et les plus étudiées font appel aux phénomènes d'absorption (les molécules peuvent absorber les quanta d'énergie de certaines radiations). Dans ce cas, leurs états énergétiques fondamentaux sont modifiés par passage, ou transition, à des états excités d'énergie supérieure. Chaque état de la matière est quantifié et l'excitation a lieu par absorption d'une quantité discrète d'énergie  $\Delta E$  (Szafran et al., 1991). Pour être absorbée, la radiation doit être à la même fréquence correspondant à cette quantité d'énergie soit : l'enregistrement de l'énergie absorbée ou transmise

en fonction de la fréquence ou de la longueur d'onde, constitue le spectre d'absorption du composé dans la région spectrale étudiée (Chavanne et al., 1991; Darnell et Baltimore, 1993). La fréquence  $\nu$  d'une onde électromagnétique est reliée à sa longueur d'onde par la relation:  $\nu = C/\lambda$  (Chavanne, 1991; Szafran, 1991) où  $C$  représente la vitesse de propagation de la lumière dans le vide et  $\lambda$  la longueur d'onde. L'énergie  $E$  du rayonnement ou du photon est directement proportionnelle à la fréquence de l'onde électromagnétique ou à l'onde du champ. Elle s'écrit  $E = h\nu$  où  $h$  représente la constante de Planck. L'ensemble des radiations électromagnétiques forme le spectre électromagnétique.

Normalement, un spectre devrait se présenter comme une succession de raies fines. En fait, il existe pour une molécule une succession d'états énergétiques proches les uns des autres. D'où l'obtention de pics ou de bandes d'absorption plus ou moins larges même avec un appareillage à haut pouvoir de résolution.

L'étude des spectres dans l'infrarouge a le plus souvent pour but de caractériser des composés ou la vérification de leur conformité à un échantillon de référence. L'absorption dans la région spectrale de l'infrarouge correspond à des transitions dans les énergies de vibrations moléculaires.



### 4.1.3. Absorption infrarouge

Toute molécule excitée par un rayonnement électromagnétique absorbe une quantité d'énergie et passe à un état excité. D'après la mécanique, le processus d'absorption est quantifié et seules les fréquences particulières pourront être absorbées par la molécule.

L'excitation vibrationnelle peut être envisagée simplement en considérant deux atomes  $A_1$  et  $A_2$  unis par une liaison comme étant deux masses reliées par un ressort (figure 4.1) qui se tend et se détend à une certaine fréquence  $\nu$ . Dans cette représentation, la fréquence des vibrations entre les deux atomes dépend à la fois de la force de liaison entre eux et de leurs masses atomiques. On peut démontrer qu'elle est régit par la **loi de Hooke** suivante qui décrit les mouvements d'un ressort.

$$\bar{\nu} = k \sqrt{f \frac{(m_1 + m_2)}{m_1 \cdot m_2}}$$

$\bar{\nu}$  = fréquence vibrationnelle en nombres d'ondes ( $\text{cm}^{-1}$ )

$k$  = constante

$f$  = constante de force, indiquant la raideur du ressort (de la liaison)

$m_1$  et  $m_2$  = valeurs des masses attachées au ressort (masses des atomes uni)

Cette équation pourrait nous amener à penser que chaque liaison individuelle dans une molécule donne lieu à une bande d'absorption spécifique

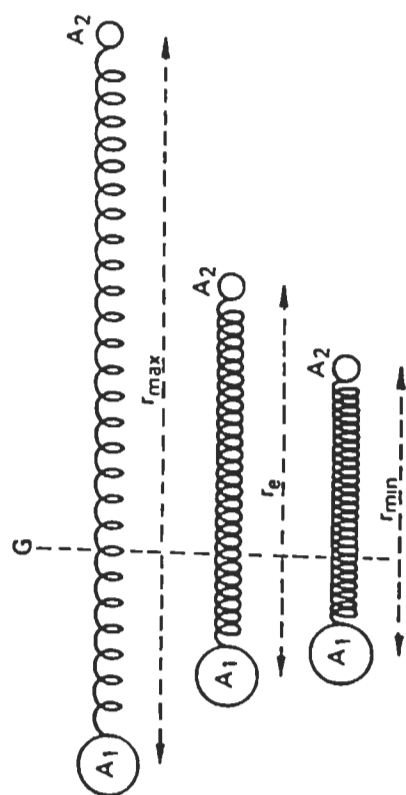


Figure 4.1. Mouvement des atomes lors du phénomène de vibration (Hamon et al., 1990).

dans le spectre infrarouge. Ce qui n'est pas le cas.

Les énergies de l'absorption de radiation correspondent à des mouvements d'élongation, ou de déformation de la plupart des liaisons covalentes des molécules. Dans le processus d'absorption, les fréquences des radiations infrarouge coïncident avec celles des fréquences de vibration naturelles des molécules (Tu, 1982). Les liaisons ne sont pas toutes capables d'absorber l'énergie infrarouge même si leur fréquence coïncide parfaitement à celle de mouvement de la liaison. Seuls les groupements dont le moment dipolaire varie lors de la vibration sont liaisons qui admettent un mouvement dipolaire sont capables d'absorber la radiation infrarouge (Chavanne et al., 1991).

Une liaison doit présenter un dipôle électrique qui doit osciller à la même fréquence que celle de la radiation d'excitation, afin que l'énergie puisse être transférée.

Dans le cas de la spectroscopie infrarouge la molécule absorbe la lumière infrarouge si et seulement si le moment dipolaire de la molécule change pendant la vibration (Tu, 1982). L'avantage avec l'infrarouge est qu'elle permet d'éviter des réactions photochimiques ou de luminescence non désirées. Les radiations électromagnétiques dans l'infrarouge (située dans la région de  $10\,000$  à  $20\text{ cm}^{-1}$ ), en provoquant un changement du niveau vibrationnel laissent néanmoins la molécule à son niveau électronique fondamental (Tu, 1982; Lutz et Mäntele, 1991).

Pour comprendre le phénomène de vibration atomique, il faut le visualiser comme l'interaction de deux particules reliées entre elles par un ressort (Tu, 1982). Lorsqu'on tire sur ce ressort et qu'on le relâche, les deux particules entrent en mouvement d'étirement. L'amplitude de leur mouvement est non seulement fonction de la masse des particules mais aussi de la force du ressort (voir figure 4.1). Au cours du phénomène de vibration, d'autres mouvements peuvent être décrits: étirements, repliements, torsions, balancements, cisaillement. Dans les membranes biologiques, ces mouvements deviennent d'autant plus complexes que les structures chimiques des constituants membranaires sont plus élaborées.

#### **4.2. Transformation de l'énergie absorbée.**

Chaque molécule possède un libre parcours moyen important et peut donc se mouvoir dans l'espace sur une distance relativement grande sans heurt, c'est-à-dire sans échange d'énergie. Il est donc possible de parler alors de l'énergie d'une molécule isolée. L'énergie que possède une molécule se répartie entre différents degrés de liberté correspondant soit à des mouvements d'ensemble de la molécule, soit à des déplacements relatifs de ses particules constitutives. Comme pour un objet à l'échelle macroscopique, il s'agit d'une énergie cinétique due aux divers mouvements qui peuvent correspondre à:

- 1) une translation et une rotation sur elle-même de la molécule (l'énergie correspondante est faible et ne peut être suffisante pour entraîner à elle seule une transformation chimique);

- 2) des vibrations des atomes les uns par rapport aux autres, soit suivant la direction de leur liaison, soit suivant une direction perpendiculaire;

3) la circulation des électrons sur des orbitales plus ou moins proches du noyau.

On appelle état fondamental celui pour lequel tous ces mouvements ont une énergie minimale. En général, l'agitation thermique modifie seulement l'énergie de translation, de rotation et de vibration des molécules; elle ne peut modifier l'énergie d'un électron car l'état électronique excité le plus bas d'une molécule est à plus d'un électron-volt, soit environ 23 kcal, au dessus de l'état fondamental. Mais en plus de cette énergie, il faut considérer une énergie électronique qui dépend de la répartition des électrons au sein de la molécule et qui peut prendre plusieurs valeurs, comme dans le cas de l'atome isolé.

#### 4.2.1. Vibrations de valence et de déformation

Les types ou modes les plus simples qui donnent une absorption due à des mouvements de vibration sont dus aux mouvements d'élongation ou de déformation. Une représentation imagée des molécules peut être fournie par un modèle à la figure 4.1.

L'absorption d'une radiation infrarouge aura pour effet de faire vibrer cet assemblage en modifiant les distances ou les angles normaux de liaisons. La durée de vie des états excités est très courte, de l'ordre de  $10^{-13}$  seconde, et l'ensemble revient rapidement à son état fondamental en restituant l'énergie sous forme de chaleur. On distingue **deux modes de vibrations: les vibrations**

**d'élongation** (stretching) et **les vibrations de déformation** (bending) qui peuvent être réalisées avec un groupement **A X Y** de la figure 4.2.

- **les vibrations d'élongation** (stretching) dites vibrations de valence ont lieu lorsque deux atomes se rapprochent ou s'éloignent périodiquement le long de leur axe commun (le mouvement des atomes a lieu le long de l'axe de liaison idéal qui les relie). Un groupement A X Y présente deux vibrations d'allongement (figure 4.3).

Ces vibrations sont habituellement observés pour les grandes énergies, c'est-à-dire pour les valeurs de  $\nu$  les plus grandes.

- **les vibrations de déformation** (bending) correspondent à une modification de l'angle de liaison (les atomes se déplacent à peu près perpendiculairement à la liaison de valence). Il en résulte que l'angle des deux liaisons n'est plus constant et que la molécule se déforme. Si on considère le plan formé par les trois atomes A X Y, il y a quatre vibrations possibles: **deux dans le plan**, et **deux autres hors du plan** (figure 4.4).

Dans le cas de la déformation dans le plan, ce qui dans le cas d'une molécule triatomique correspondrait à la *vibration de rotation plane* (en anglais rocking) et à la *vibration de cisaillement* dans le plan (scissoring en anglais) (figure 4.4.A). Dans le cas des vibrations qui se produisent **hors du plan** de la molécule, l'atome central étant sensiblement fixe, si les deux atomes périphériques se déplacent en même temps au-dessus, puis au-dessous du plan le mouvement est dit de *balancement* (wagging). Au contraire, si l'un des atomes périphériques se

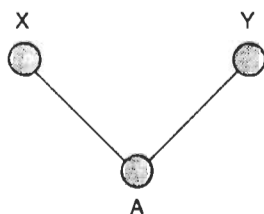


Figure 4.2. Représentation schématique d'un groupement triatomique covalent **A, X, Y**.

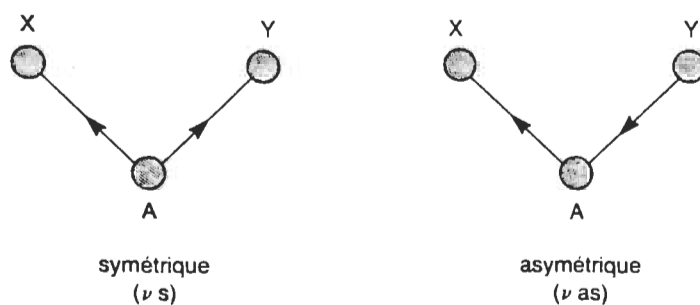


Figure 4.3. Vibration d'allongement d'un groupement **AXY**. Au cours d'une vibration d'allongement symétrique, **X** et **Y** sont en phase, ils se rapprochent ou s'éloignent de **A** en même temps. (Hamon et al., 1990).

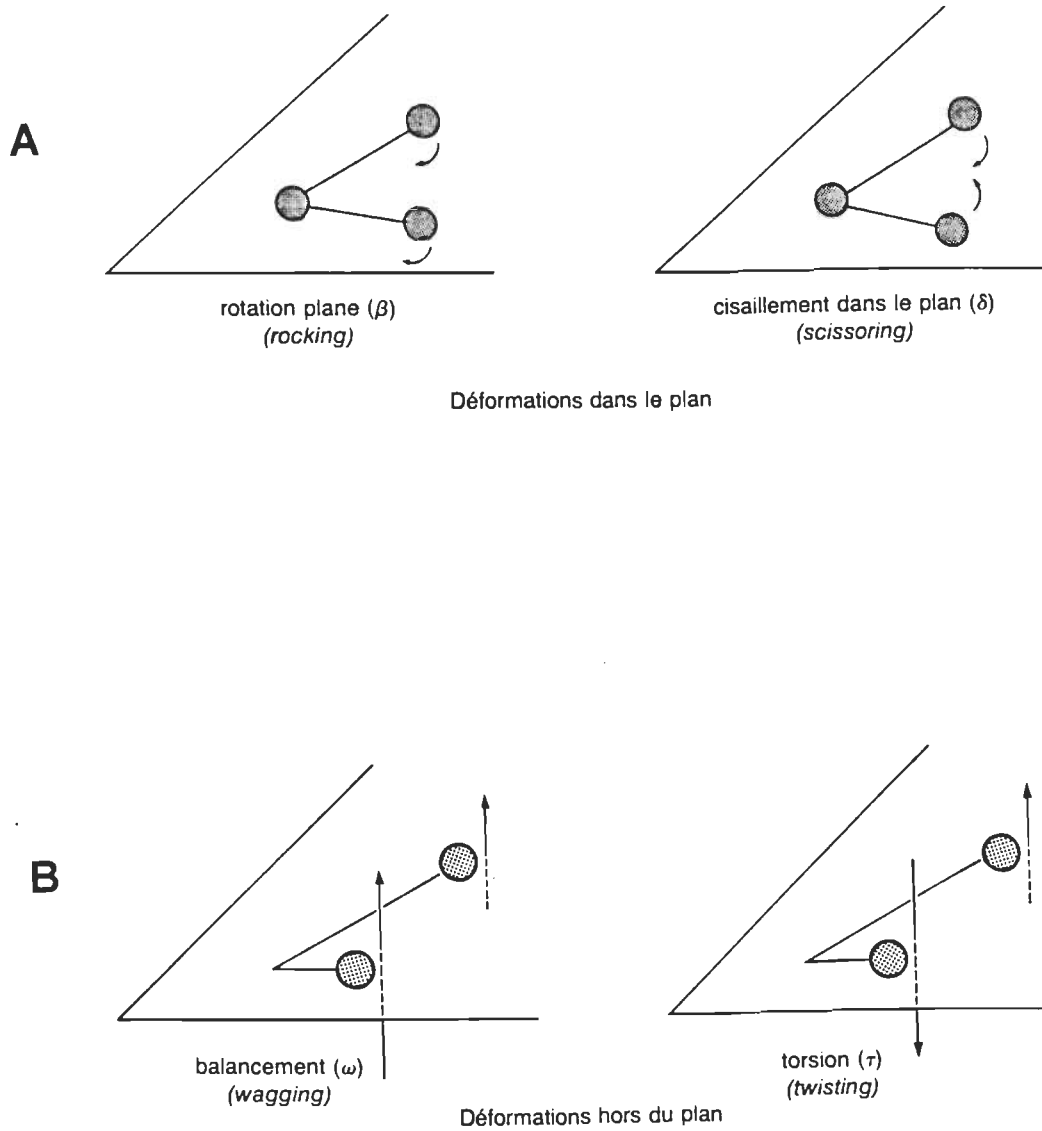


Figure 4.4. Vibration de déformation; (A) déformation dans le plan, (B) déformation hors du plan. (Hamon et al., 1990).



déplacent au-dessus du plan pendant que l'autre passe en-dessous, le mouvement obtenu correspond à une *torsion* (twisting) (figure 4.4.B).

Lorsqu'un nombre plus grand d'atomes sont en jeu, par exemple, un atome central et trois périphériques (groupement  $\text{-CCl}_3$ ) on observe des vibrations de valence symétriques et asymétriques, mais aussi des vibrations de déformation symétrique et asymétrique.

#### 4.2.2. Absorption d'une radiation lumineuse par une molécule en vibration

Lorsqu'une molécule vibre, les distances interatomiques varient. Il en résulte une modification de la position des pôles positifs et négatifs, et de la charge électrique résultante portée par chacun de ces pôles qui peut éventuellement varier en fonction de la position étirée ou comprimée de la molécule. Le moment électrique dipolaire de la molécule est donc variable. Si ces variations sont en phase avec celles du champ électrique oscillant de la molécule biatomique, il est nécessaire, comme pour l'absorption d'énergie par rotation, que la molécule soit dissymétrique pour absorber. Dans le cas plus général de molécules polyatomiques, il faut considérer deux possibilités, selon qu'elles présentent ou non un centre de symétrie (Hamon et al., 1990).

Pour les *molécules ne présentant pas de centre de symétrie*, toutes les vibrations normales sont en principes actives puisqu'il y a variation du moment dipolaire, comme le montre la figure 4.5 la différence des distances entre pôles électriques  $d_c$  et  $d_e$ .

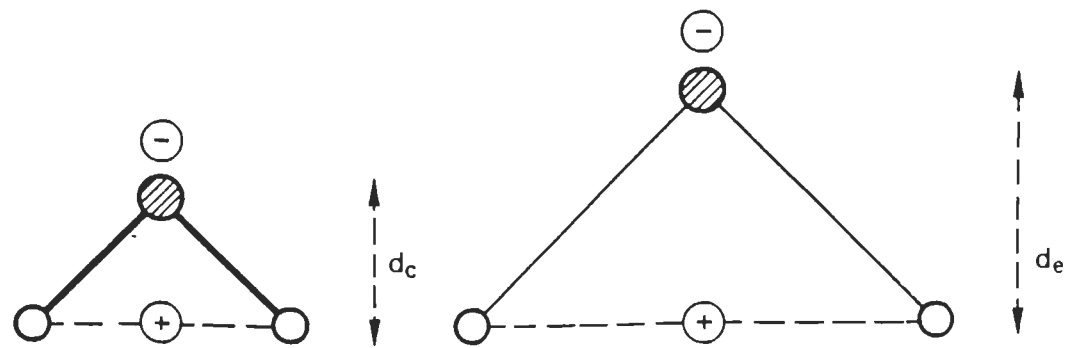


Figure 4.5. Différence des distances entre pôles diélectriques  $d_c$  et  $d_e$  dans le cas des molécules ne présentant pas de centre de symétrie. (Hamon et al., 1990).

Dans toute vibration symétrique des *molécules présentant un centre de symétrie*, si à l'équilibre les deux pôles sont confondus il n'en est plus de même dans les autres cas. Les mouvements correspondant aux mouvements de vibrations normales d'une molécule triatomique entraînent les positions indiquées à la figure 4.6, où les pôles électriques sont distincts et se trouvent dans des situations diamétralement opposées selon les temps considérés (a et b). Un moment dipolaire existe donc dans la molécule; même s'il est susceptible de s'annuler temporairement, il peut s'inverser. Il subit donc des variations susceptibles de rendre compte de l'absorption.

#### 4.3. Le diagramme énergétique

Lorsqu'une molécule absorbe un photon, l'énergie qu'il transportait **W** ou **E** = **hν** peut être simplement utilisée pour modifier la distance entre les atomes et accélérer leurs mouvements de rotation et d'oscillation (figure 4.7a). Ce cas est sans intérêt du point de vue photochimique, car l'énergie ainsi stockée ne peut être rendue que sous forme thermique.

Mais il se peut aussi qu'il y ait élévation du niveau d'énergie d'un ou plusieurs électrons qui sautent d'une couche à une autre plus éloignée du noyau (transition). En un temps extrêmement rapide ( $10^{-15}$  s), la molécule passe d'un état fondamental, où le niveau énergétique est plus bas, aux états excités, de niveaux plus élevés.

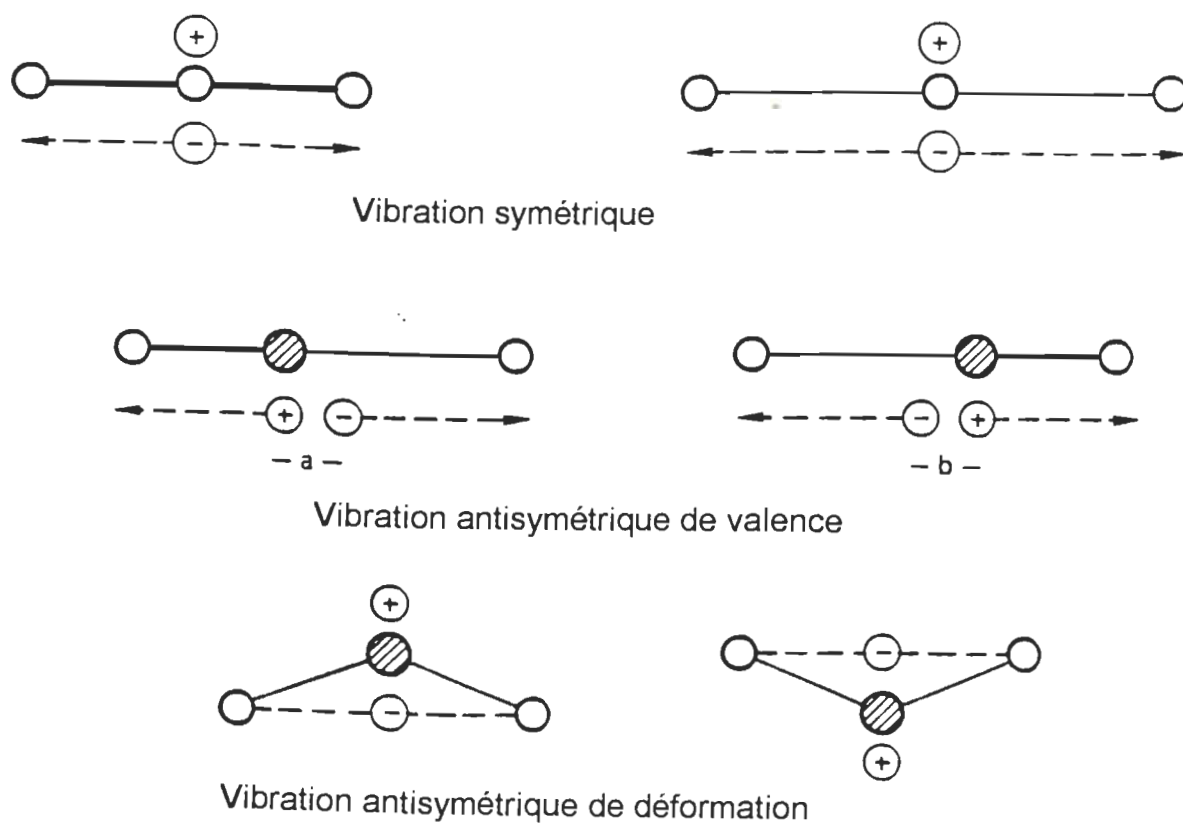


Figure 4.6. (A) Vibrations symétriques, (B) vibrations antisymétriques dans le cas des molécules présentant de centre de symétrie. (Hamon et al., 1990).

Les états excités sont instables et dans un temps très court (moins de  $10^{-8}$  en moyenne) il y a retour à l'état fondamental avec restitution de l'énergie emmagasinée. Cependant comme dans le cas de la chlorophylle-a, il peut y avoir des états excités métastables qui peuvent se maintenir pour une période d'environ  $10^{-3}$  s.

L'absorption d'un quantum de lumière par les pigments photosynthétiques se traduit par une transition électronique partant du niveau fondamental à un niveau excité. Les transitions électroniques correspondent pour chacune d'elles au passage d'un électron d'une orbitale liante à une orbitale antiliante et donne lieu à une absorption d'énergie sous forme de radiation lumineuse d'une longueur d'onde déterminée. Les différents états énergétiques d'une molécule sont représentés par le diagramme de la figure 4.7b. L'état fondamental se caractérise par une distribution particulière, la plus stable pour la molécule, associée aux configurations électronique et nucléaire de l'état fondamental. Il existe plusieurs niveaux vibrationnels, chacun étant légèrement différent en énergie.

À la température de la pièce, la très grande majorité des molécules est dans le plus bas niveau vibrationnel de l'état électronique fondamental. L'état fondamental de la chlorophylle est généralement l'état singulet. L'absorption d'un photon d'énergie approprié par une molécule de pigment, élève la molécule à un état excité. Ceci se fait en quelques  $10^{-15}$  secondes (Pearlstein, 1982). De façon générale, les molécules de chlorophylles excitées après l'absorption de l'énergie lumineuse peuvent retourner à l'état fondamental soit:

- par dissipation radiative: émission de fluorescence (Lavorel et Lutz, 1986)

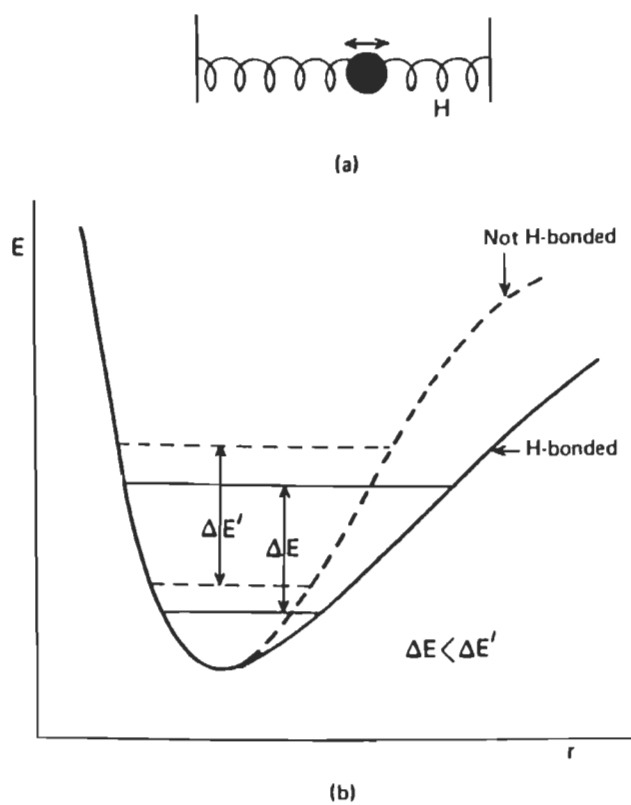


Figure 4.7. Courbe traduisant le mouvement des molécules assimilées à un oscillateur harmonique (l'énergie de dissociation en fonction de la distance qui sépare deux atomes). (a) Mouvement de rotation et d'oscillation d'un atome. (b) Différents états énergétiques d'une molécule. (Sybesma, 1989).

- par dissipation non radiative: conversion interne (Popovic et Leblanc, 1987)
- par transfert d'énergie aux molécules environnantes, pour se dissiper en phosphorescence ou en conversion interne (Krause et Weis, 1984).

L'énergie du pigment excité est généralement transférée par migration excitonique ou par transfert d'énergie de résonance (type Förster) à travers le système de chlorophylle antenne vers les centres réactionnels des photosystèmes (PSI et PSII). Le taux du transfert d'énergie dépend plus étroitement de la distance entre les molécules et de l'orientation relative des dipôles de transition du donneur et de l'accepteur (Förster, 1965).

#### **4.4. Spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (FTIR)**

L'envoi d'une lumière infrarouge polychromatique (spectre continu) sur la substance à étudier, entraîne une absorption simultanée aux différents nombres d'ondes. La séparation des différentes radiations et la mesure de l'énergie absorbée pour chacune d'elles est réalisée en utilisant un système de franges d'interférences à deux ondes, comprenant un système d'enregistrement sophistiqué, rapide et relié à un ordinateur. Ce sont les perturbations survenues dans la molécule par diverses variations qui sont à l'origine de l'interaction se produisant entre cette molécule et le champ électromagnétique oscillant de la radiation infrarouge.

#### 4.4.1. Principe de fonctionnement de l'appareil à infrarouge FTIR

Dans ce type d'appareil, l'échantillon est irradié avec toutes les longueurs d'ondes de façon simultanée. Selon le principe, un faisceau polychromatique est amené sur un séparateur de faisceau (beam splitter). Ce dernier va transmettre une première moitié de la radiation et réfléchir la deuxième moitié, sur miroirs,  $M_1$  et  $M_2$  placés l'un par rapport à l'autre en formant un angle droit (figure 4.8, Pachlorophylleer et al., 1988).  $M_1$  est fixe tandis que  $M_2$  mobile se déplace perpendiculairement à son axe. Quand le faisceau parcourt une distance  $L$ , le faisceau réfléchi tombe sur le miroir  $M_1$ . Sa radiation est une fois encore réfléchi pour revenir sur le séparateur de faisceau, après avoir parcouru une distance totale de  $2L$ . Le faisceau transmis suit un parcours similaire, mais grâce au mouvement de va-et-vient du miroir  $M_2$  sur une distance  $X$ , la longueur du parcours de ce faisceau transmis devient alors  $2(L + X)$ . Ainsi, au cours de la recombinaison au niveau du séparateur, les deux faisceaux possèdent une différence de longueur de parcours égale à  $2X$ , ce qui crée une interférence. Le faisceau recombinaison est modulé au niveau du "beam splitter", et passe à travers l'échantillon pour être défini par l'expression  $F = V \times W$  où  $V$  est la vitesse de déplacement du miroir ( $0.5 \text{ cm}^{-1}$ ) et  $W$  le nombre d'ondes ( $5000 \text{ à } 500 \text{ cm}^{-1}$ ) dans nos conditions expérimentales. Le jeu des miroirs provoque à la sortie du détecteur, un interférogramme qui est la somme trigonométrique des ondes pour toutes les fréquences utilisées. La transformée de Fourier de l'interférogramme donne le spectre infrarouge. Ce spectre est la source de renseignements sur les vibrations des liaisons interatomiques des molécules biologiques étudiées.



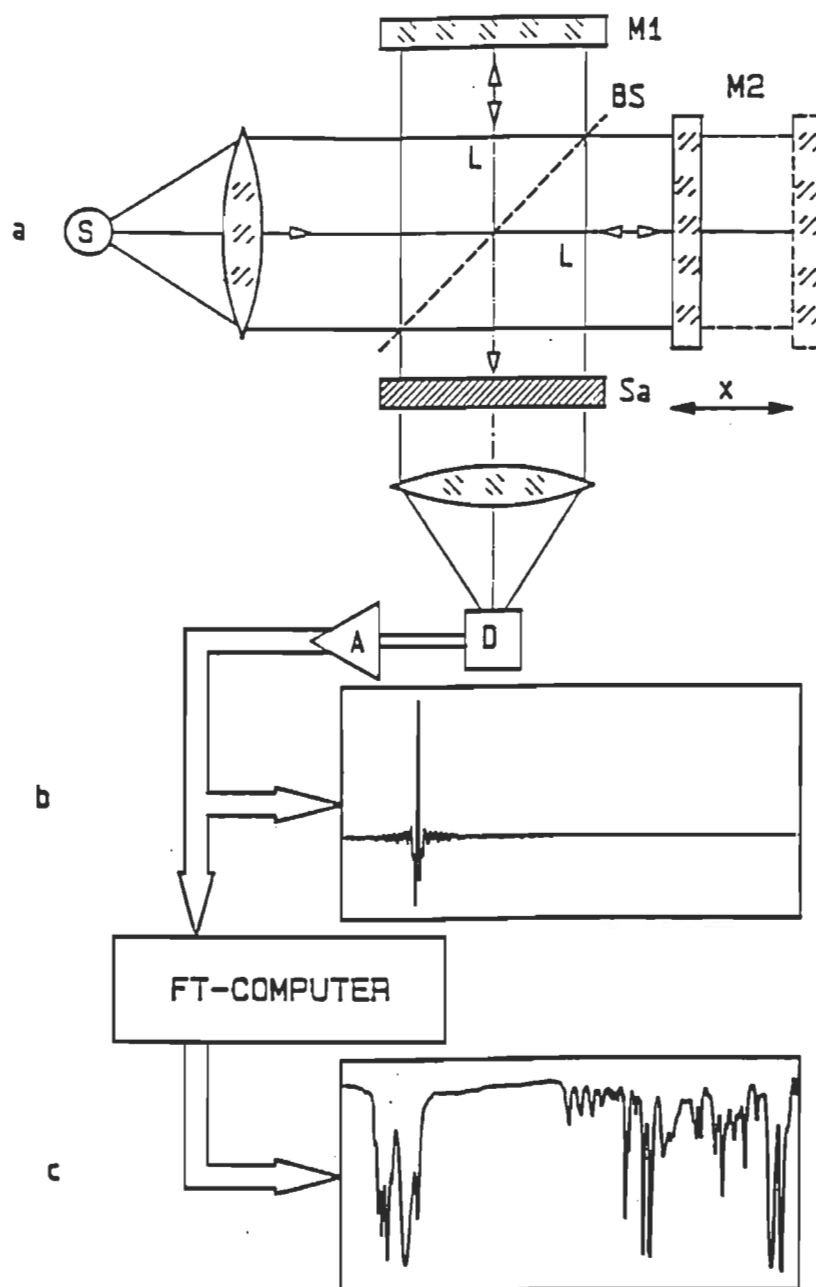


Figure 4.8. Système optique FTIR (Pachler et al., 1988). a) Schéma d'un interféromètre de Michelson: (S) source de radiation; (Sa) échantillon; (D) détecteur; (A) amplificateur; (M1) miroir fixe; (M2) miroir mobile; (BS) séparateur de faisceau ou beam splitter; (X) déplacement du miroir; (L) distance parcourue par le faisceau réfléchi. b) Interférogramme ou signal enregistré par le détecteur. c) Spectre obtenu par transformée de Fourier de l'interférogramme. (Pacher et al., 1988).

Si le faisceau incident est à large bande de fréquence, le déphasage sera en fonction de la longueur d'onde et l'intensité du faisceau subira un amortissement exponentiel. L'opération mathématique appelée transformée de Fourier permet donc de transformer une fonction exponentielle décroissante en une fonction Lorentzienne ou Voigt. Elle-même étant une fonction caractéristique d'un pic d'absorption de l'énergie. L'analyse mathématique par ordinateur, des multiples exponentielles caractérisant l'atténuation après traversée d'une espèce absorbante, permet de reconstituer le spectre en fonction de la fréquence.

#### 4.4.2. Principe de la transformée de Fourier

Une fonction, relative par exemple au temps,  $f(t)$  peut être transformée mathématiquement en une fonction de la fréquence  $F(v)$ , c'est-à-dire en un spectre. Cette fonction  $F(v)$  est appelé transformée de Fourier de  $f(t)$ . Cette transformée de Fourier permet d'accéder au spectre  $F(v)$  et comme les acquisitions sont très brèves, il est possible de faire la somme d'un grand nombre d'enregistrements. Ceci conduit à une amélioration importante de la sensibilité.

La possibilité d'obtenir des transformées de Fourier n'est pas exclusive d'une fonction du temps. Elle est également applicable à d'autres variables. Dans le domaine de l'infrarouge, l'enregistrement d'un interférogramme (à deux ondes) dépend de la différence de marche  $\Delta$  entre les deux ondes. Cette différence de marche  $\Delta$  est variable pour chaque longueur d'onde (ou fréquence). On peut donc obtenir  $F(\Delta)$  en fonction de  $f(\Delta)$ . C'est également par cette méthode que l'on obtient le «lissage» des courbes.

Étant donné que les modifications qui interviennent au niveau des modes de vibration des amides A, I, et II reflètent des changements au niveau des structures secondaires des protéines. Notre attention se portera plus particulièrement sur les variations de fréquence de ces bandes afin d'observer et de traduire les modifications structurales qui pourront intervenir au niveau des protéines du PSII en présence d'anions inorganiques, de PAs ou de cholestérol. Les protéines devront s'orienter à l'intérieur de la membrane de PSII selon les interactions et les changements qui peuvent avoir lieu avec les différents complexes.

## CHAPITRE V

### RÉSULTATS ET DISCUSSION DE L'ÉTUDE DES STRUCTURES SECONDAIRES DU PSII

#### 5.1. Étude des polypeptides du PSII avec la spectroscopie (FTIR)

##### 5.1.1. Modes de vibration des liaisons peptidiques

Les liaisons peptidiques (C-N) relient entre eux différents acides aminés pour former des polypeptides (structure primaire d'une protéine). Ils possèdent les caractéristiques d'une double liaison et ne peuvent donc subir des mouvements libres de rotation. Les atomes impliqués dans cette liaison ainsi que les deux carbones asymétriques ( $C_{\alpha}$ ) restent alors dans un même plan. L'hydrogène de la liaison **N-H** et l'oxygène du carbonyle se situent en position trans l'un par rapport à l'autre (voir figure 5.1.A).

En raison de la délocalisation électronique de la liaison peptidique les atomes du groupement **CONH** se trouvent presque dans le même plan. L'orientation tridimensionnelle de cette liaison sera alors déterminée uniquement par les angles de rotation  $\psi$  et  $\phi$  au niveau du groupement méthylène **CHR**. Ces liaisons peptidiques donnent naissance à différents modes de vibration, tels l'amide I, l'amide II et l'amide III. Il existe aussi deux modes de vibration (amide

A



79

B

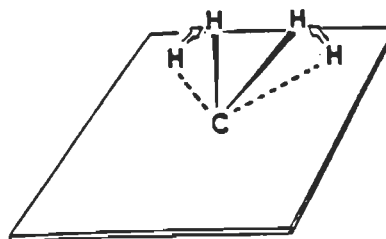
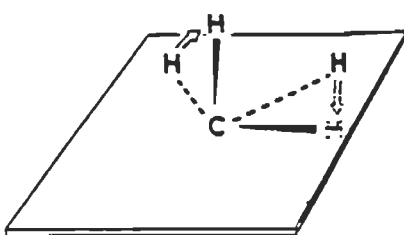
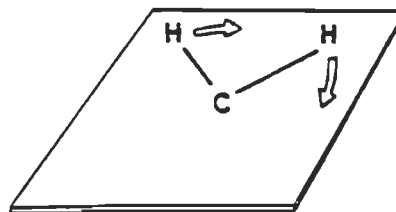
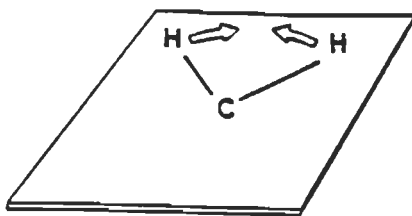
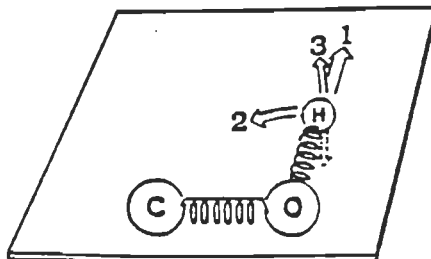


Figure 5.1. A) Vibration de deux atomes A et B représenté sous forme de vibration de deux balles reliées par un ressort. B) Représentation des différents mouvements (étirement, repliement, torsion, etc.) dans la structure chimique d'une molécule (Tu, 1982).

A et amide B) provenant de la résonance de Fermi entre le mode d'étirement du groupement **N-H** et la deuxième harmonique de l'amide II (Tu, 1982). Spécifiquement la bande principale de l'amide I, située approximativement entre 1600 et 1700  $\text{cm}^{-1}$  (Alvarez et al., 1987), provient de la vibration d'élongation **C=O** (**C=O** élongation) avec une faible contribution du mode de déformation dans le plan **N-H** (**N-H** de déformation dans le plan). L'amide A fait partie du doublet de la résonance de Fermi. C'est exclusivement un mode d'étirement du groupement **N-H** et il vibre autour de 3400 et 3200  $\text{cm}^{-1}$ . En absence de groupement **N-H**, il n'existerait ni amide A, ni amide B, ni aucun autre mode de vibration comparable à l'amide II. La composition des modes vibrationnels des autres amides serait différente (Doyle et al., 1975). L'autre composante de la résonance de Fermi, l'amide B, se trouve généralement dans la région entre 3100-3050  $\text{cm}^{-1}$  (Krimm et Bandekar, 1986).

L'échange des atomes d'hydrogène avec le deutérium n'affecte pas de façon significative la fréquence d'absorption de la bande de l'amide I. La bande amide II qui est située entre 1567-1545  $\text{cm}^{-1}$  (Krimm et Bandekar, 1986) provient essentiellement du mode de déformation de **N-H** (déformation dans le plan) et couplé à un étirement **N-C** (de déformation). Ce mode est accompagné d'une faible participation de la déformation **C-O** (déformation dans le plan) et d'étirement de **C-C** (élongation). En raison de la grande contribution du groupement **N-H**, l'échange des atomes d'hydrogène avec le deutérium modifie la fréquence de vibration de l'amide II (Chapados et al., 1991). Il déplace la fréquence de la bande d'absorption de **N-H** (déformation dans le plan) entre 1040 et 940  $\text{cm}^{-1}$  et celle de **C-N** (élongation) entre 1490 et 1460  $\text{cm}^{-1}$  (Krimm et Bandekar, 1986). La bande d'absorption de l'Amide III est située dans la région de 1305-1200  $\text{cm}^{-1}$ . Cette

bande est généralement affectée par la nature des chaînes latérales des acides aminés (Bandekar, 1992). Son mode de vibration provient de déformations dans le plan de liaison **N-H** et d'une faible contribution de vibration d'élongation C-N (élongation). Il est important de mentionner que cette bande est difficile à identifier par la spectroscopie FTIR à cause d'une part, de sa faible intensité et d'autre part de la présence de plusieurs bandes d'absorption dans cette région (Bellamy, 1975; Chapados et al., 1991).

Au niveau des différents modes d'enroulement qui définissent la structure secondaire des protéines, la disposition hélicoïdale (formation de l'hélice- $\alpha$ ) est souvent favorisée car elle permet l'établissement de liaison hydrogène entre les atomes d'hydrogène de l'azote et l'oxygène du carbone du quatrième acide aminé (Richardson et Richardson, 1989). Il existe également le **feuillet- $\beta$**  qui est une forme étirée de la protéine. La structure " **$\beta$ -turn**" ou coude forme une liaison hydrogène entre le premier et le troisième acide aminé (Lehninger 1981; Krimm et Bandekar, 1986). Ces bandes de vibration des amides qui demeurent dans le même plan que les liaisons peptidiques (figure 5.1 vu aux pages précédentes), sont caractéristiques des propriétés structurales de la protéine.

### 5.1.2. Caractéristiques spectroscopiques du complexe de PSII utilisé

La figure 5.2 montre un spectre d'absorption FTIR de particules de PSII pur (non traité) que nous avons utilisé dans nos travaux. Il est similaire à celui rapporté antérieurement par Nénonéné, 1992; Allakhverdiev et al., 1994; Menikh, 1994. Le spectre observé révèle des contributions significatives des protéines

photosynthétiques majeures : l'amide A à  $3298\text{ cm}^{-1}$  (N-H élongation) (Krimm et Bandekar, 1986); l'amide I à  $1657\text{ cm}^{-1}$  (polypeptide C=O élongation); l'amide II (C-N élongation et mode de liaison N-H) à  $1545\text{ cm}^{-1}$ , l'amide III à  $1288\text{ cm}^{-1}$ , et un épaulement situé à  $1515\text{ cm}^{-1}$  attribué à la tyrosine (Berhomieu et al., 1992; Jackson et Mantsch, 1993; Bograh et al., 1997). La bande carbonyle ester de la chlorophylle est située autour de  $1736.6\text{ cm}^{-1}$ .

L'amide A est une bande très importante. Elle est de forme symétrique. Elle vibre à une fréquence autour de  $3300\text{ cm}^{-1}$  dans les thylacoïdes entiers. Ce mode de vibration reflète une structure hélicoïdale (Doyle et al., 1975, Tu, 1982; Parker, 1983). Il apparaît à une fréquence légèrement plus basse, c'est à dire à  $3296\text{ cm}^{-1}$  dans les polypeptides du PSII (Nénonéné, 1992). La bande amide A comporte une élongation de N-H et qui dépend étroitement de la liaison hydrogène **N-H...O=C**. Bien que ce mode de vibration soit très localisé, c'est-à-dire peu sensible aux changements conformationnels des polypeptides, son déplacement peut être le résultat de changements structuraux (tableau I) et plus la liaison hydrogène est forte, plus la fréquence de vibration de cette bande amide est faible (Doyle et al., 1975). L'élongation d'un groupement **N-H** libre se situe dans l'intervalle de  $3400$  à  $3440\text{ cm}^{-1}$ . Mais lorsque ce groupement se trouve impliqué dans une liaison hydrogène, sa bande se déplace vers des fréquences plus faibles généralement autour de  $3300\text{ cm}^{-1}$  (Bellamy, 1975). Néanmoins, il faut noter que les vibrations de la bande d'amide A observée dans les polypeptides et les protéines n'est pas seulement due à une simple fréquence d'élongation de **N-H** et à la première harmonique de la bande de l'amide II (Doyle et al., 1975). Dans la région de la bande amide A, on peut noter également d'autres bandes de vibration



des groupements O-H, CH<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub> des lipides et de la chlorophylle (Chapados, 1985).

Dans la région 1800-1500 cm<sup>-1</sup> (figure 5.2), le carbonyle de la chlorophylle (deux esters et une cétone par molécule) vibre approximativement à la même fréquence que celle des protéines (peptides et chaînes terminales des acides aminés) et des lipides, autour de 1736 cm<sup>-1</sup> (Naberdryk et al., 1992, 1993; Morita et al., 1993; Chapados et al., 1986). La bande vibrationnelle du lipide à 1736 cm<sup>-1</sup> est plus importante en intensité et présente une bande beaucoup plus large. Cette bande englobe les bandes de la chlorophylle et des protéines (Tavitian et al., 1986). Dans la région de 1700-1600 cm<sup>-1</sup> (figure 5.3), on note la bande à forte intensité de l'amide I située près de 1656 cm<sup>-1</sup> (He et al., 1991) et quelques bandes cétones libres autour de 1700 cm<sup>-1</sup> et 1687 cm<sup>-1</sup> dues à la chlorophylle (Fujiwara et Tasumi, 1986; Tavitian et al., 1986; Leonhard et al., 1990). La fréquence de la bande amide I indique que le PSII est riche en structures secondaires en hélice- $\alpha$  (Byler et Susi, 1986; Ahmed et Tajmir, 1993; Bograh et al., 1997). Dans la région de 1567-1545 cm<sup>-1</sup>, on trouve la bande amide II dont l'intensité est importante en spectroscopie infrarouge et faible en spectroscopie Raman. En présence de D<sub>2</sub>O, cette bande se sépare en deux: l'une se situe vers 1547 cm<sup>-1</sup> et l'autre vers 1453 cm<sup>-1</sup> (Chapados et al., 1991). Près de cette région on aperçoit également les bandes d'absorption des groupements **C=C** et **C=N** de la chlorophylle, des galactolipides et du carotène (autour de 1600 cm<sup>-1</sup>) Nabedryk et al., 1990; Lutz, 1984; Chapados et al., 1990). Le mode d'élongation **C-O** de la tyrosine est situé à 1517 cm<sup>-1</sup> (Chirgadze et al., 1975; MacDonald et Barry, 1992; Kennedy et al., 1990).

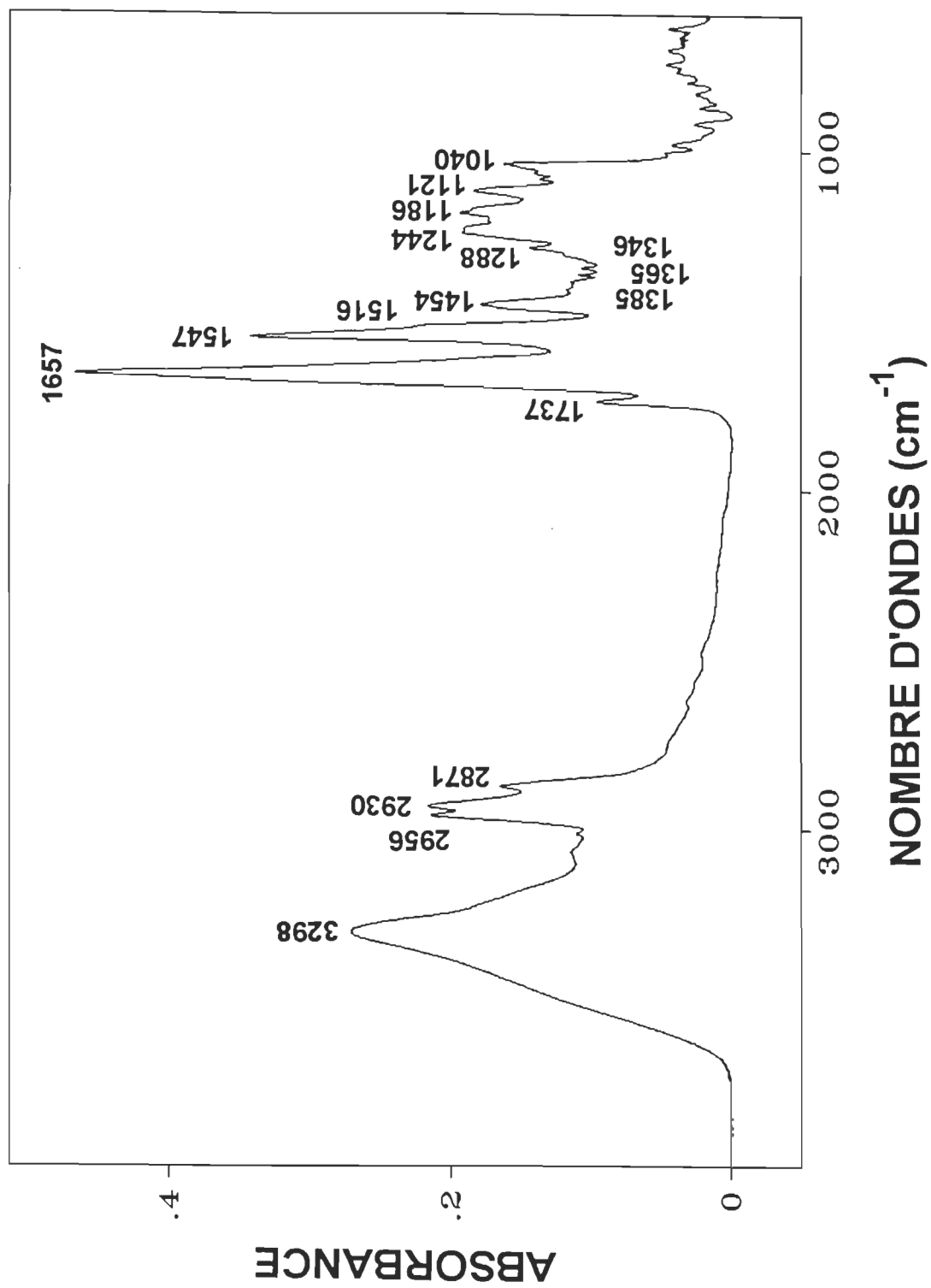


Figure 5.2. Spectre d'absorption FTIR des membranes de PSII natif (pur).

## **5.2 Résultats expérimentaux**

### **5.2.1. Les spectres infrarouge par transformée de Fourier (FTIR)**

#### **5.2.1.1. Mode de vibration des complexes**

Les résultats de nos travaux montrent que les anions inorganiques tels  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Br}^-$  n'ont pas d'effet sur l'ensemble des bandes pour des concentrations comprises entre 0.01 et 20 mM. Par contre, dans cette intervalle de concentration les autres anions tels que  $\text{I}^-$  et  $\text{NO}_3^-$ , les polyamines (Spm et Spd) et le cholestérol ont un effet sur la bande de l'amide A, sur les bandes situées à  $2956\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$  asymétrique), à  $2930\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$  symétrique) et à  $2871\text{ cm}^{-1}$ . Ces dernières subissent une augmentation en intensité. Les bandes amides I et II subissent des déplacements en présence de certaines concentrations. On pourrait donc penser que les substances utilisées agiraient sur les structures secondaires du PSII. Les résultats des fréquences de vibrations pour l'intervalle de concentration utilisé sont présentés dans des tableaux que nous allons voir dans les pages suivantes.

#### **5.2.1.2. Méthodes de dérivée seconde, de différence de spectres et simulation spectrale**

La méthode de différence des spectres a montré que les anions inorganiques, les polyamines et le cholestérol se lient avec les protéines du dégagement d'oxygène du PSII à travers des interactions moléculaires. Ceci suggère la possibilité des changements de conformation au niveau des protéines

du PSII lorsque celles-ci sont en présence d'anions inorganiques à des concentrations autour de 5 mM et plus. Ces changements interviennent à des concentrations plus faibles dans le cas des PAs et du cholestérol (autour de 0.1 mM). Les changements de conformation intervenus sur les spectres de différence sont présentés dans des figures que nous allons voir dans les pages qui suivent.

Le résultat des simulations (effectuées après la technique de la dérivée seconde) de spectres du PSII pur et du PSII traité sont présentés dans ce travail dans les figures des pages qui suivent. Un résumé des valeurs des fréquences des sous bandes (structures secondaires) et de leurs surfaces est présenté dans des tableaux.

Ainsi, nous avons assigné la bande à  $1657\text{ cm}^{-1}$  à l'hélice- $\alpha$ , celle à  $1628\text{ cm}^{-1}$  au feuillet- $\beta$ , celle à  $1678\text{ cm}^{-1}$  à la structure coude. Les bandes à  $1640\text{ cm}^{-1}$  et à  $1691\text{ cm}^{-1}$  ont été attribuées respectivement à la structure non ordonnée (ou random) et à la structure  $\beta$ -antiparallèle (Bograh et al., 1997).

Nous avons calculé les erreurs sur les bandes simulées du PSII non traité et ceux du PSII traité. La précision résultante au niveau de la position des bandes est comprise entre  $\pm 0.2$  et  $\pm 1\%$  pour l'ensemble des spectres. Les erreurs ont été estimées en faisant la différence entre les valeurs et la moyenne calculée.

Pour le PSII pur, nous avons estimé que la structure en hélice- $\alpha$  à  $1657\text{ cm}^{-1}$  occupe 47% de la surface totale de l'enveloppe; les structures feuillet- $\beta$  à  $1628$

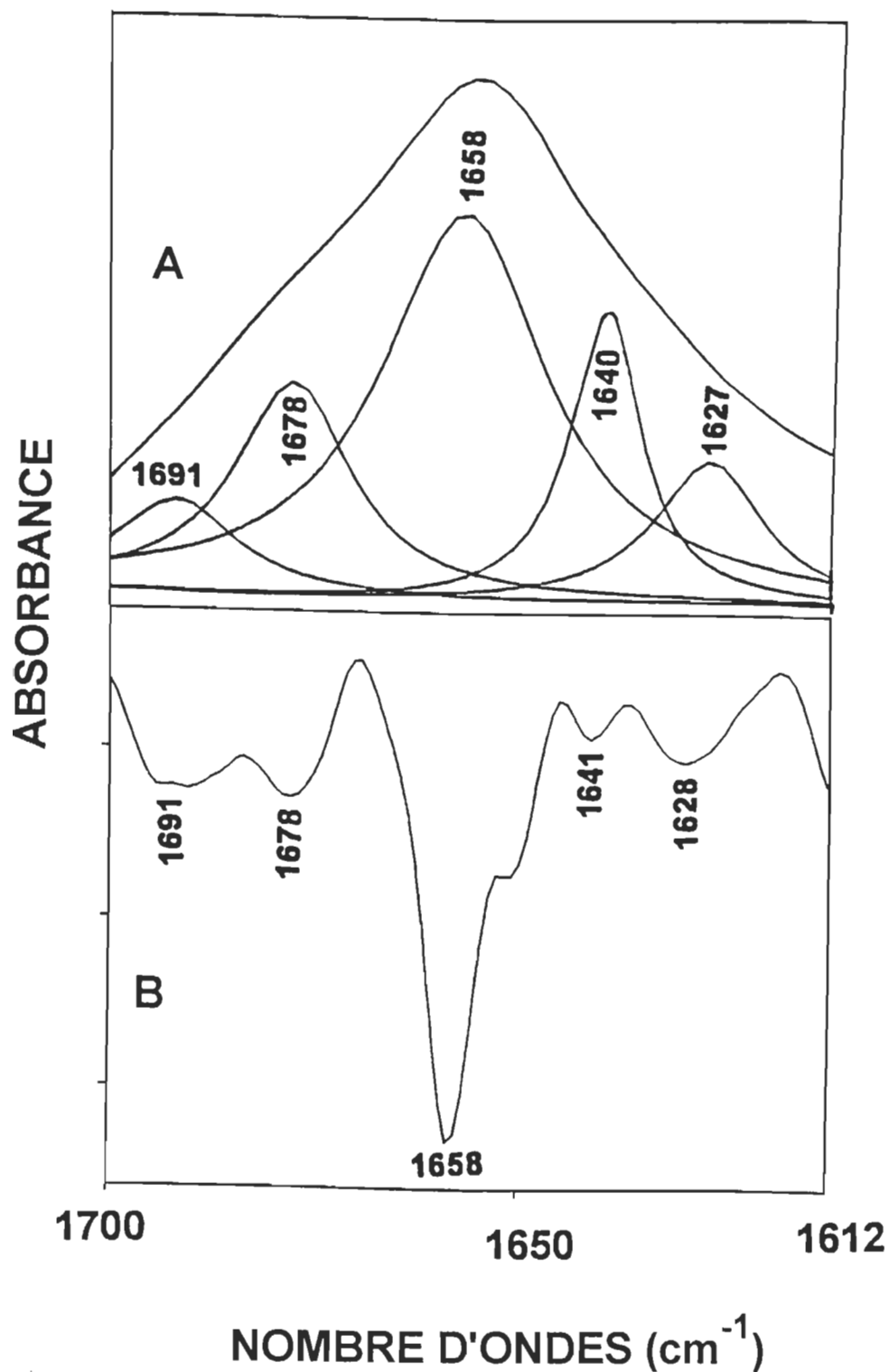


Figure 5.3. Dérivée seconde et simulation de la bande amide I des polypeptides du PSII natif (pur). (A) Simulation spectrale, (B) dérivée seconde. Pourcentage des structures secondaires: hélice- $\alpha$  47%, feuillet- $\beta$  11%, coude 19%, structure non ordonnée (random) 16%, structure  $\beta$ -antiparallèle 7%.

$\text{cm}^{-1}$ , turn à  $1678 \text{ cm}^{-1}$ , structure non ordonnée (random) à  $1640 \text{ cm}^{-1}$ , et  $\beta$ -antiparallèle à  $1691 \text{ cm}^{-1}$  occupent respectivement 11%, 19%, 16%, et 7% de cette même enveloppe (Bograh et al., 1996; Bograh et al., 1997). Les précisions sur ces bandes varient entre  $\pm 0.2$  et  $\pm 1\%$  et sont présentées au tableau 5.6. La dérivée seconde et la simulation spectrale du PSII natif sont présentées à la figure 5.3.

La simulation spectrale des PSII traités a permis de constater dans le cas du PSII traité avec NaCl et de NaBr, les pourcentages n'ont pas changé. Par contre, dans les autres cas il y a eu une perte en pourcentage de la sous structure hélice- $\alpha$  au profit des autres sous structures. Il y a eu des changements structuraux des protéines du PSII pour certaines concentrations. On pourrait donc penser que ces changements entraînent une désorganisation de l'architecture des protéines du PSII. Cette désorganisation pourrait provoquer l'inhibition de la fonction de dégagement d'oxygène des protéines du PSII lorsque celles-ci sont en présence de certaines concentrations en NaI et en  $\text{NaNO}_3$  et de plus ou moins faibles concentrations de PAs et du cholestérol (par rapport à celles de NaI et de  $\text{NaNO}_3$ ). Toutefois, rien n'a été observé avec le NaCl et le NaBr.

### 5.3. Le dégagement d'oxygène

En l'absence des substances que nous avons utilisé, le taux de dégagement d'oxygène du PSII pur utilisé est de **100%**. L'oxygène dégagé que

nous avons mesuré lors de la photolyse de l'eau est comprise entre **350 et 400  $\mu\text{M}$  d' $\text{O}_2 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{Chl.h}$** .

Lorsqu'on traite le PSII avec les anions inorganiques tels que  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Br}^-$ , le taux d'oxygène et l'oxygène mesuré sont les mêmes que ceux du PSII non traité. Dans le cas du PSII traité avec les autres anions, les polyamines et le cholestérol, le taux d'oxygène et l'oxygène mesuré diminuent (Tableaux 5.7, 5.11, et 5.14) (Bograh et al., 1996; Bograh et al., 1997).

Comme observé avec la spectroscopie (FTIR), l'activité du dégagement d'oxygène du PSII n'est pas affecté par anions  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ , tandis qu'il l'est pour les autres anions, les PAs (Spm et Spd) et le cholestérol. Nous avons constaté que les effets sur l'activité photosynthétique dépend de la concentration des substances en complexation avec le PSII. Une augmentation de la concentration en  $\text{I}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ , Spm, Spd et en cholestérol entraîne une augmentation du pourcentage d'inhibition du dégagement d'oxygène au niveau du PSII. Comparées aux autres substances, les PAs inhibent de façon très importante l'activité du dégagement d'oxygène au niveau du PSII. Cette activité est totalement inhibée pour une concentration autour de 0.1 mM.

## 5.4. Effets des anions inorganiques sur les protéines du PSII en FTIR

### 5.4.1. Effets sur les modes de vibration du PSII

Le PSII traité avec du NaCl et du NaBr n'a pratiquement pas entraîné de changement de la bande carbonyle ester du PSII. La bande de l'amide I à  $1657\text{ cm}^{-1}$  et celle de la tyrosine  $1516\text{ cm}^{-1}$  n'ont pas subi elles aussi de changement. Par contre, la bande de l'amide II en a subi. Elle a subi un déplacement vers les hautes fréquences de  $2.9\text{ cm}^{-1}$  lorsqu'elle a été traitée avec 20 mM de NaCl. Traitée avec cette même concentration en NaBr, la bande de l'amide II a subi un déplacement de  $1.9\text{ cm}^{-1}$  vers les hautes fréquences. Ce qui veut probablement signifier que les structures secondaires des protéines ont subi une modification. Aux figures 5.4 et 5.6 on remarque que les bandes situées à  $2956\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$  asymétrique), à  $2930\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$  symétrique) et à  $2871\text{ cm}^{-1}$ , n'ont pratiquement pas augmenté d'intensité lorsqu'on augmente la concentration de NaCl et de NaBr.

En présence de  $\text{NaNO}_3$  et  $\text{NaI}$  la bande de l'amide I n'a pas subi de déplacement (voir figure 5.8 et 5.11, tableaux 5.3 et 5.4). La bande du carbonyle ester dans la région de  $1736.6\text{ cm}^{-1}$  a subi une légère baisse de fréquences avec l'augmentation de la concentration de  $\text{NaNO}_3$ . Par contre, aucun changement n'est survenu en présence de  $\text{NaI}$ . On note que le déplacement de bande du groupement carbonyle ester vers les basses fréquences de  $1.9\text{ cm}^{-1}$  en présence de 20 mM de  $\text{NaNO}_3$ . Ceci supposerait qu'une interaction  $\text{NO}_3^-$ -chlorophylle ou  $\text{I}^-$ -chlorophylle pourrait avoir lieu (Bograh et al., 1996). Dans les deux cas ( $\text{NaI}$  et  $\text{NaNO}_3$ ) la bande de la tyrosine a subi un déplacement vers les hautes



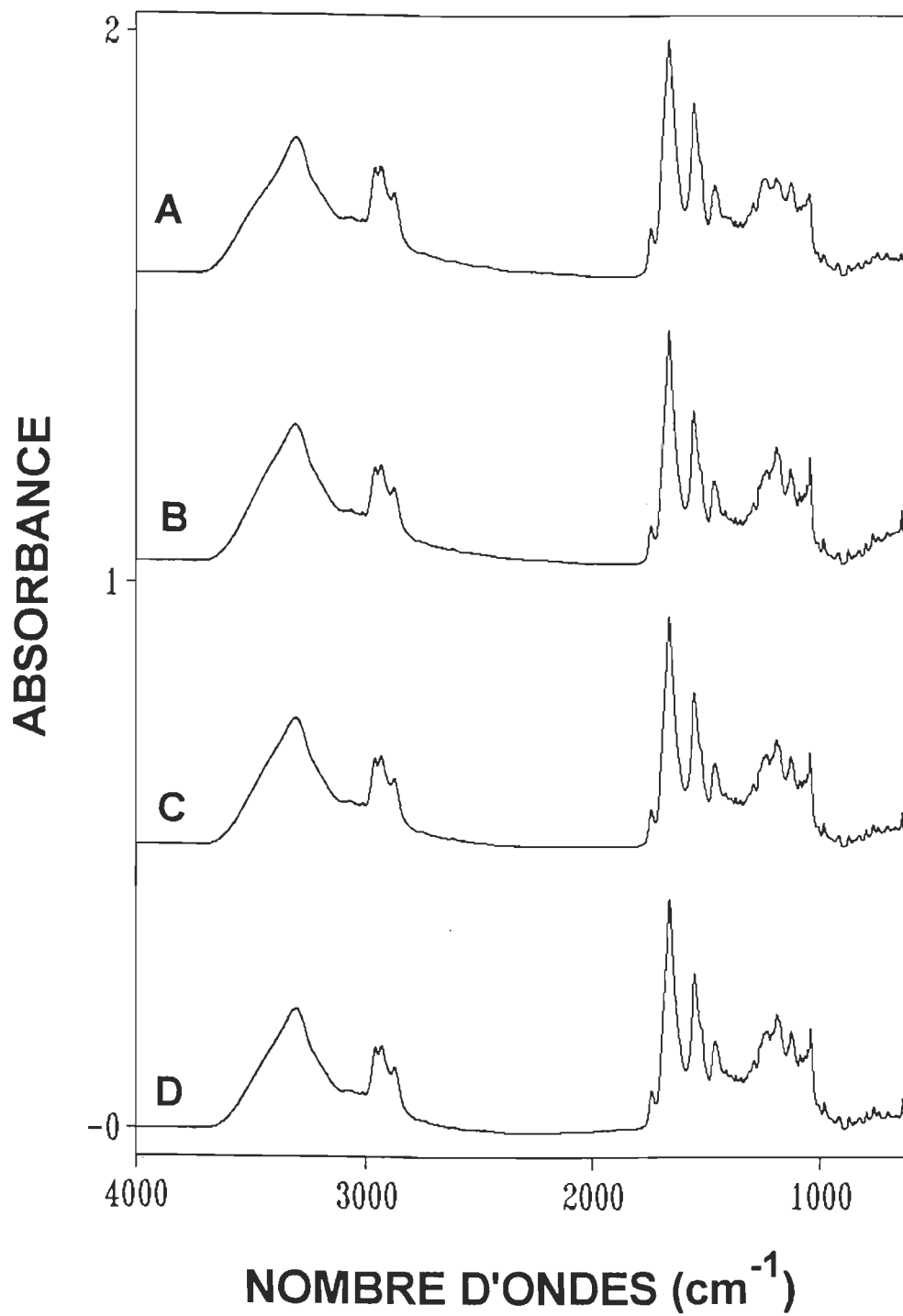


Figure 5.4. Spectres d'absorption FTIR dans la région 4000-600 cm<sup>-1</sup> des polypeptides du PSII pur et du complexe PSII-NaCl. (A) PSII pur; (B) PSII+NaCl, 5 mM; (C) PSII+NaCl, 10 mM; (D) PSII+NaCl, 20 mM.

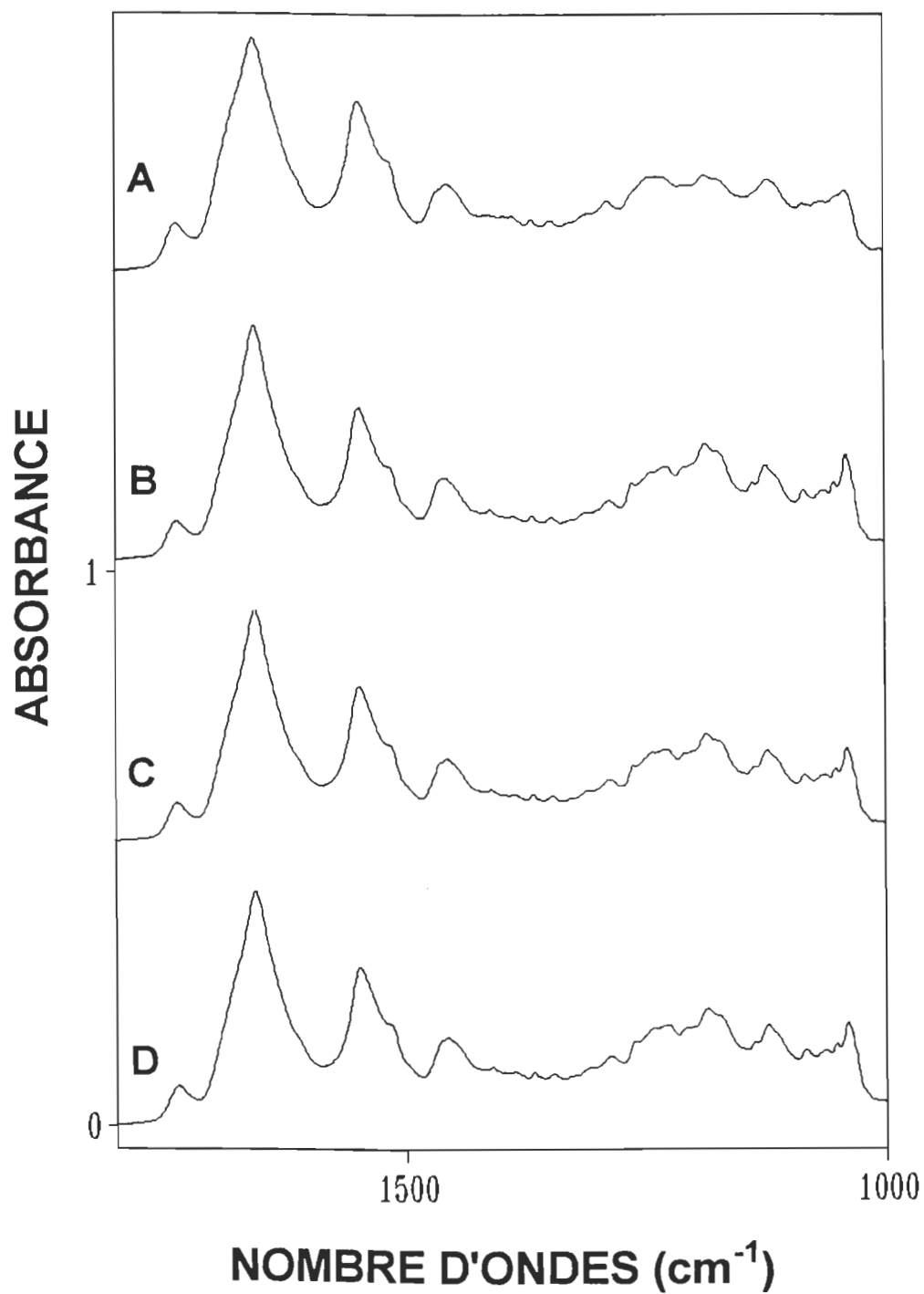


Figure 5.5. Spectres d'absorption FTIR dans la région 1800-1000 cm<sup>-1</sup> des polypeptides du PSII pur et du complexe PSII-NaCl. (A) PSII pur; (B) PSII+NaCl, 5 mM; (C) PSII+NaCl, 10 mM; (D) PSII+NaCl, 20 mM.

**Tableau 5.1.** Effets des différentes concentrations de NaCl sur les polypeptides du PSII étudiés par la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).

Attribution des bandes	PSII pur	Concentrations (mM)					
		0.01	0.1	1	5	10	20
Carbonyle	1736.6	1736.6	1736.6	1736.6	1736.6	1736.6	1736.6
Amide I	1656.6	1657.6	1657.6	1657.6	1657.6	1657.6	1656.6
Amide II	1546.7	1548.6	1548.6	1548.6	1548.6	1548.6	1549.6
Tyrosine	1515.7	1515.8	1516.8	1516.8	1516.8	1516.8	1516.8
Déformation CH	1454.1	1457.0	1457.0	1457.0	1457.0	1457.0	1457.0
Déformation CH <sub>3</sub>	1346.0	1345.1	1345.1	1345.1	1345.1	1345.1	1345.1
Amide III	1288.0	1286.3	1286.3	1286.3	1286.3	1287.3	1286.3

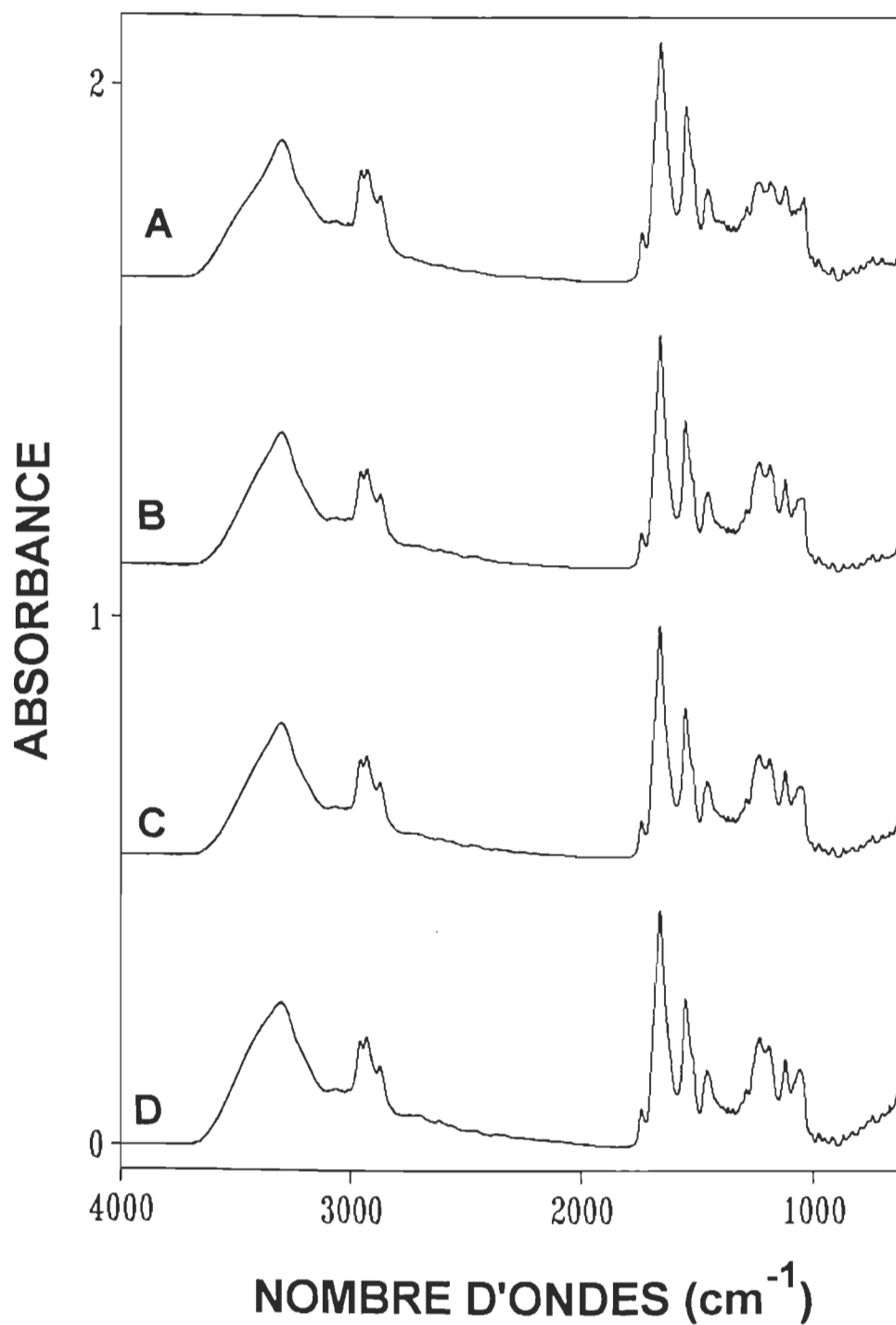


Figure 5.6. Spectres d'absorption FTIR dans la région 4000-600 cm<sup>-1</sup> des polypeptides du PSII pur et du complexe PSII-NaBr. (A) PSII pur; (B) PSII+NaBr, 5 mM; (C) PSII+NaBr, 10 mM; (D) PSII+NaBr, 20 mM.

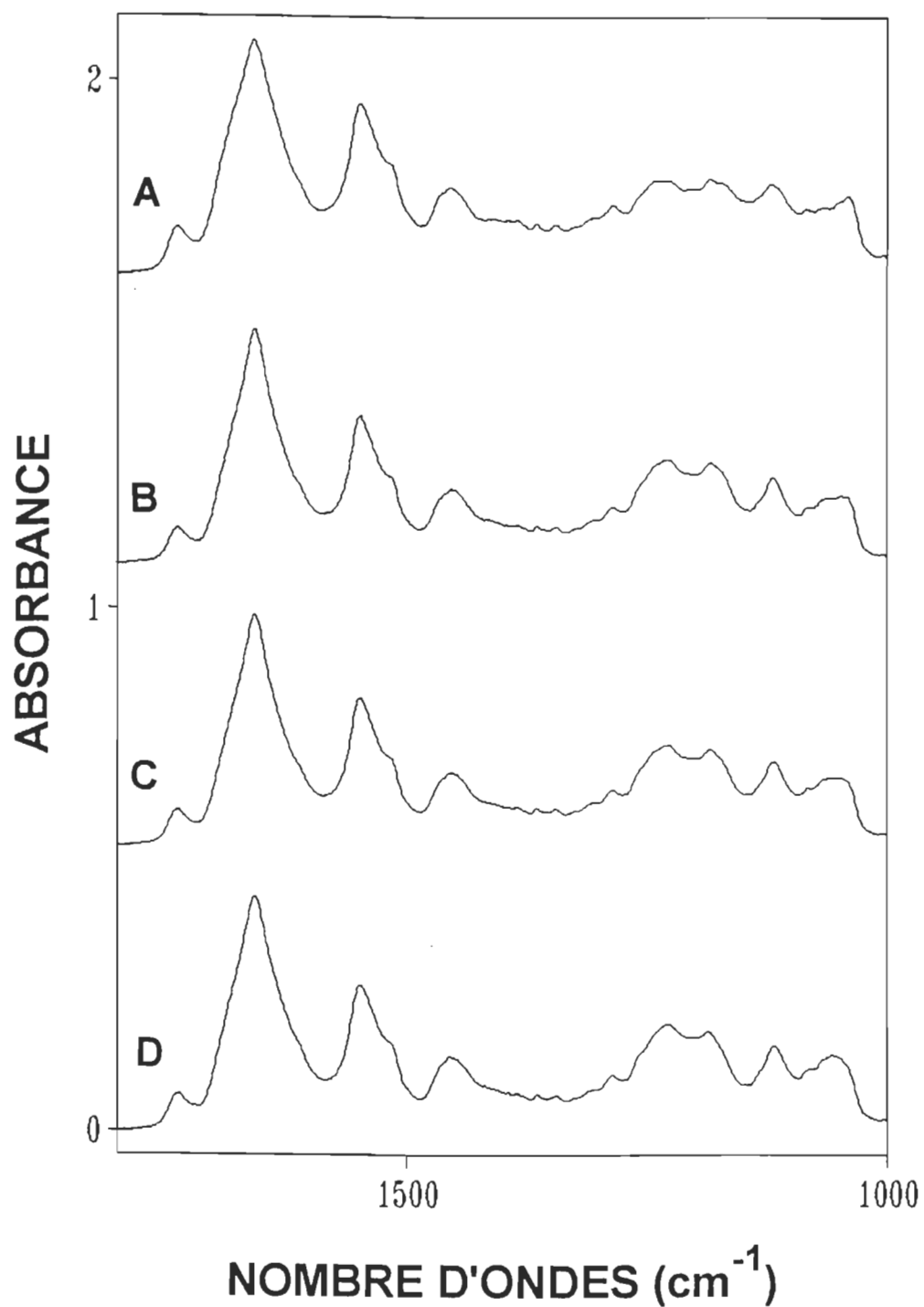


Figure 5.7. Spectres d'absorption FTIR dans la région 1800-1000 cm<sup>-1</sup> des polypeptides du PSII pur et du complexe PSII-NaBr. (A) PSII pur; (B) PSII+NaBr, 5 mM; (C) PSII+NaBr, 10 mM; (D) PSII+NaBr, 20 mM.

fréquences. Ce qui supposerait que les groupements de la tyrosine subissent une modification qui pourrait agir sur la fonction de dégagement d'oxygène du PSII à concentration élevée car la tyrosine intervient pendant le transfert des électrons entre PSII et PSI. On note aussi un déplacement de la bande amide II de  $1.9\text{ cm}^{-1}$  vers les basses fréquences sous l'effet de cette même concentration en  $\text{NaNO}_3$ . Ceci signifie qu'il y a eu l'affaiblissement des liaisons hydrogène. Les déformations  $\text{CH}_3$  et  $\text{CH}$  subissent eux aussi des déplacements. On observe un déplacement de  $2.1\text{ cm}^{-1}$  vers les hautes fréquences de  $\text{CH}_3$  et déplacement de  $1.9\text{ cm}^{-1}$  vers les basses fréquences de  $\text{CH}$ .

Avec une concentration de 20 mM en  $\text{NaI}$ , on observe un déplacement de  $\text{CH}_3$  d'environ  $1.8\text{ cm}^{-1}$  vers les hautes fréquences et un déplacement de  $\text{CH}$  d'environ  $3.9\text{ cm}^{-1}$  vers les basses fréquences. L'identification de ces bandes est difficile à cause de l'absorption de plusieurs atomes de PSII dans cette région. Leur présence pourrait seulement confirmer une modification des structures secondaires du PSII. Quant à la bande amide II, elle reste pratiquement stable lorsqu'elle est traitée avec du  $\text{NaI}$ . Par contre elle augmente vers les hautes fréquences en présence de  $\text{NaNO}_3$ .

**Tableau 5.2.** Effets des différentes concentrations de NaBr sur les polypeptides du PSII étudiés par la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).

Attribution des bandes	PSII pur	Concentrations (mM)					
		0.01	0.1	1	5	10	20
Carbonyle	1736.6	1736.6	1736.6	1736.6	1736.6	1737.6	1736.6
Amide I	1656.6	1656.6	1657.6	1657.6	1657.6	1656.6	1657.6
Amide II	1546.7	1549.6	1547.6	1547.6	1548.6	1548.6	1548.6
Tyrosine	1515.7	1517.7	1517.6	1517.7	1516.8	1516.8	1518.7
Déformation CH	1454.1	1456.0	1455.1	1455.0	1455.0	1455.0	1456.0
Déformation CH <sub>3</sub>	1346.0	1344.0	1345.1	1345.1	1345.1	1344.2	1345.1
Amide III	1288.0	1287.3	1286.3	1286.3	1287.3	1286.3	1286.3

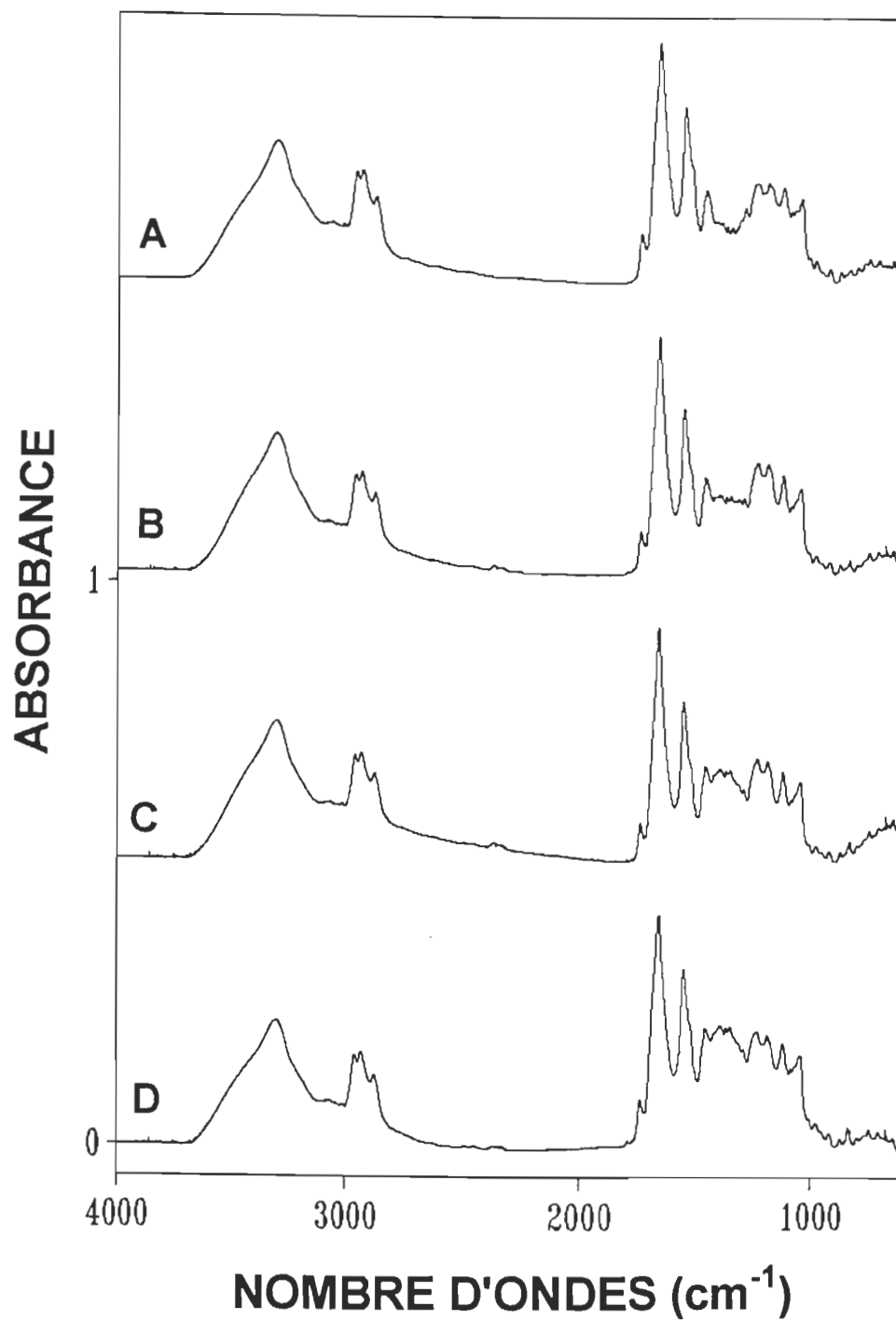


Figure 5.8. Spectres d'absorption FTIR dans la région 4000-600  $\text{cm}^{-1}$  des polypeptides du PSII pur et du complexe PSII- $\text{NaNO}_3$ . (A) PSII pur; (B) PSII+ $\text{NaNO}_3$ , 5 mM; (C) PSII+ $\text{NaNO}_3$ , 10 mM; (D) PSII+ $\text{NaNO}_3$ , 20 mM.



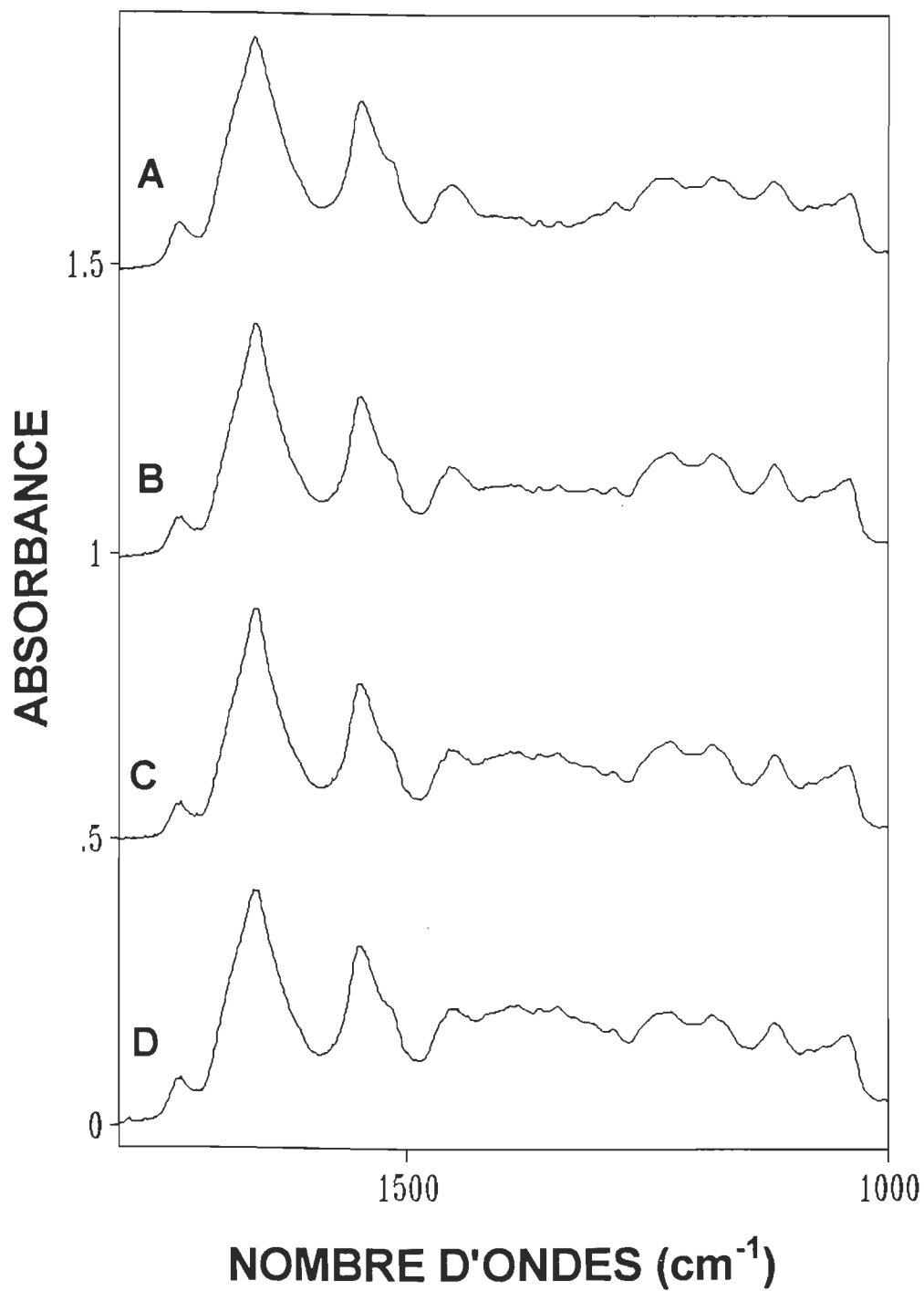


Figure 5.9. Spectres d'absorption FTIR dans la région 1800-1000 cm<sup>-1</sup> des polypeptides du PSII pur et du complexe PSII-NaNO<sub>3</sub>. (A) PSII pur; (B) PSII+NaNO<sub>3</sub>, 5 mM; (C) PSII+NaNO<sub>3</sub>, 10 mM; (D) PSII+NaNO<sub>3</sub>, 20 mM.

**Tableau 5.3.** Effets des différentes concentrations de  $\text{NaNO}_3$  sur les polypeptides du PSII étudiés par la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).

Attribution des bandes	PSII pur	Concentrations (mM)					
		0.01	0.1	1	5	10	20
Carbonyle	1736.6	1736.6	1736.6	1735.7	1735.7	1735.7	1734.7
Amide I	1656.6	1656.6	1656.6	1656.6	1656.6	1656.6	1656.6
Amide II	1546.7	1548.6	1548.6	1548.6	1548.6	1548.6	1548.6
Tyrosine	1515.7	1517.7	1517.7	1519.7	1519.7	1519.7	1519.7
Déformation CH	1454.1	1456.0	1456.0	1456.0	1455.0	1454.1	1452.2
Déformation $\text{CH}_3$	1346.0	1344.2	1344.2	1345.1	1346.1	1348	1348.1
Amide III	1288.0	1286.3	1286.3	1287.0	1288.3	1288.2	1288.2

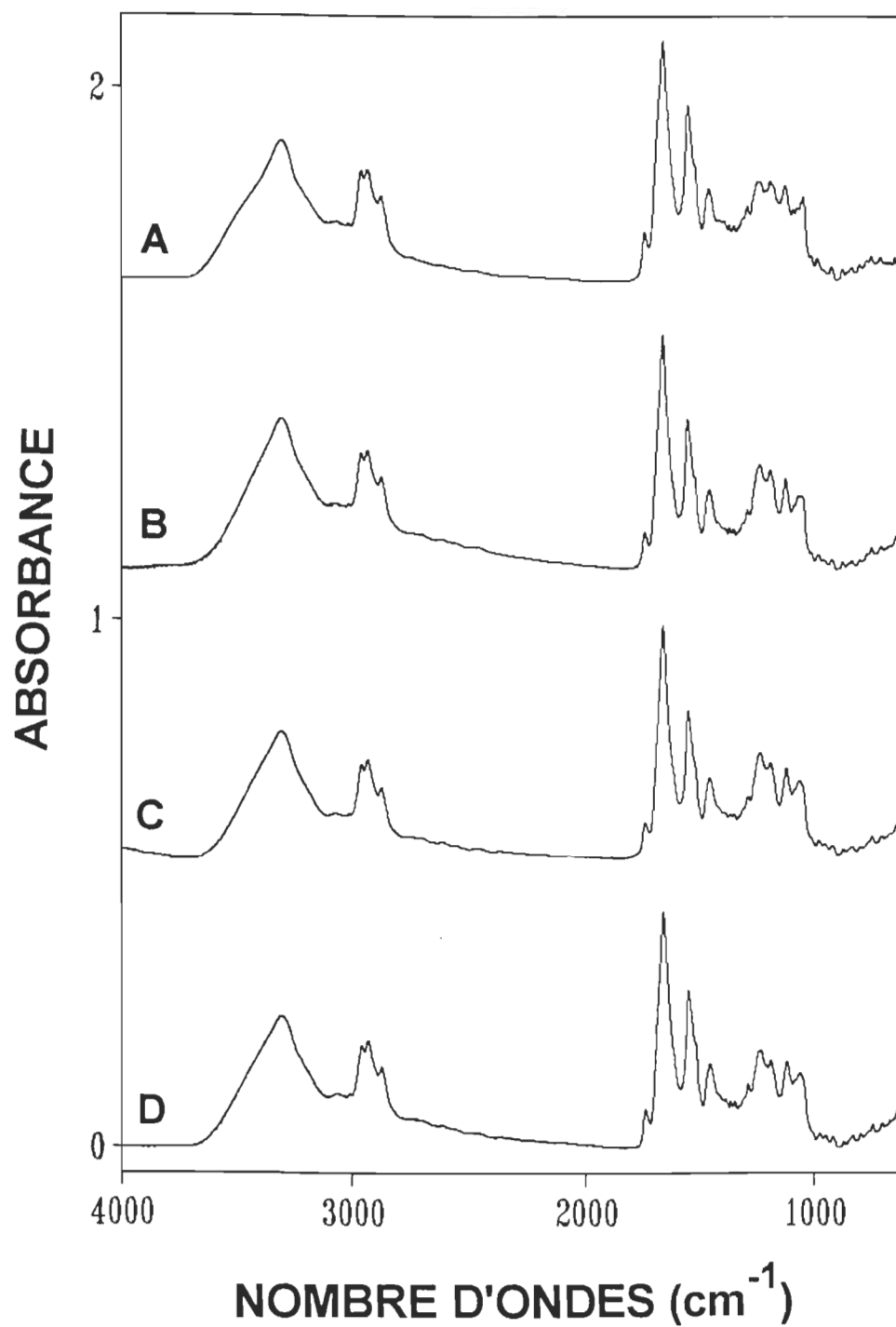


Figure 5.10. Spectres d'absorption FTIR dans la région 4000-600 cm<sup>-1</sup> des polypeptides du PSII pur et du complexe PSII-NaI. (A) PSII pur; (B) PSII+NaI, 5 mM; (C) PSII+NaI, 10 mM; (D) PSII+NaI, 20 mM.

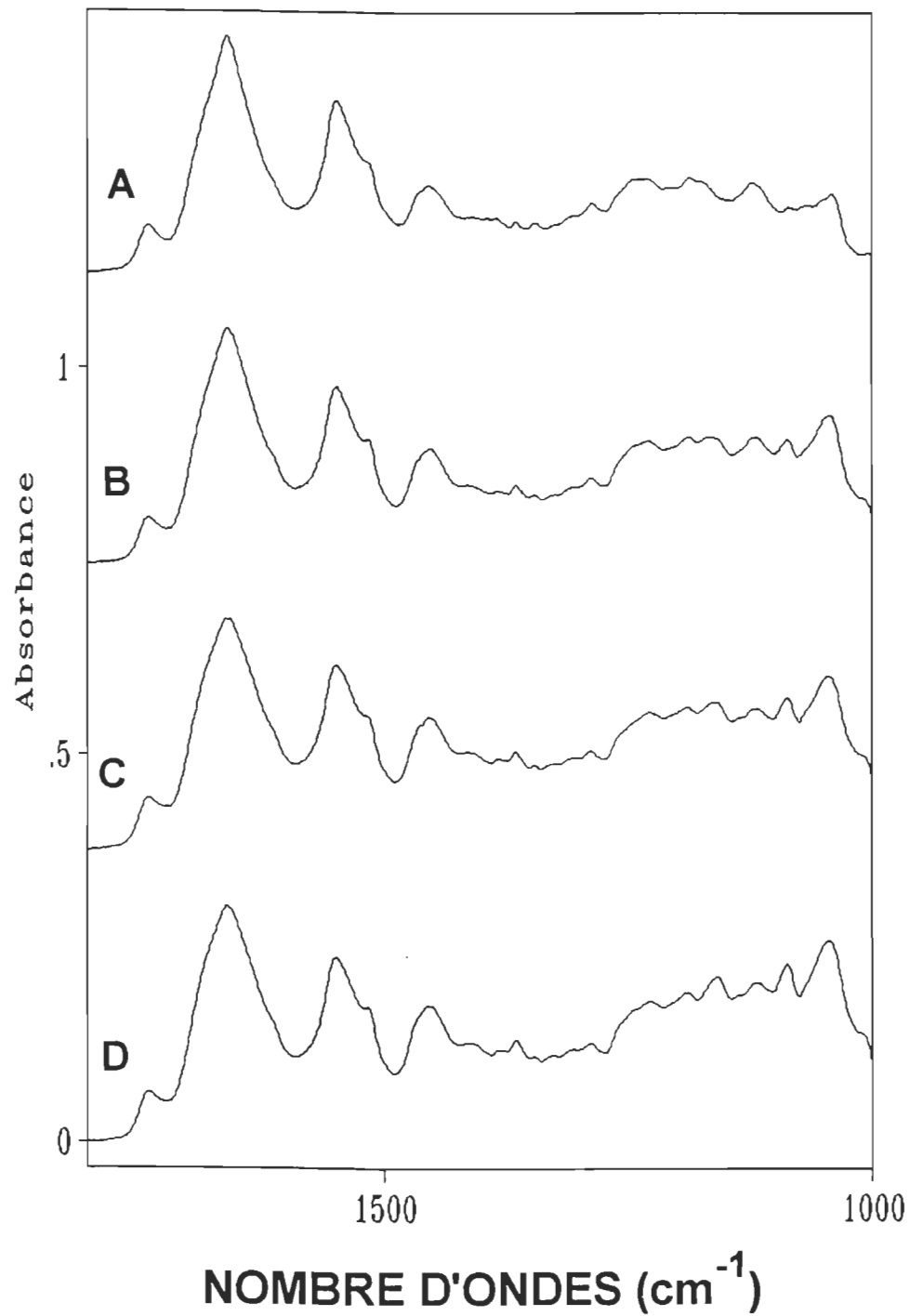


Figure 5.11. Spectres d'absorption FTIR dans la région 1800-1000 cm<sup>-1</sup> des polypeptides du PSII pur et du complexe PSII-NaI. (A) PSII pur; (B) PSII+NaI, 5 mM; (C) PSII+NaI, 10 mM; (D) PSII+NaI, 20 mM.

**Tableau 5.4.** Effets des différentes concentrations de NaI sur les polypeptides du PSII étudiés par la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).

Attribution des bandes	PSII pur	Concentrations (mM)					
		0.01	0.1	1	5	10	20
Carbonyle	1736.6	1736.6	1736.6	1736.6	1736.6	1736.6	1736.6
Amide I	1656.6	1656.6	1656.6	1656.6	1656.6	1656.6	1656.6
Amide II	1546.7	1547.6	1547.6	1547.6	1547.6	1547.6	1547.6
Tyrosine	1515.7	1517.7	1517.7	1517.7	1517.7	1518.7	1518.8
Déformation CH	1454.1	1453.1	1453.1	1452.2	1452.2	1453.1	1450.2
Déformation CH <sub>3</sub>	1346.0	1345.1	1344.2	1344.2	1344.2	1344.2	1344.2
Amide III	1288.0	1286.3	1286.3	1286.3	1286.3	1286.3	1286.3

#### 5.4.2. Effets sur la structure du PSII à travers la différence et la simulation spectrale

À la figure 5.12 de différence spectrale, nous remarquons qu'il y a des interactions au niveau des bandes amide I et amide II respectivement à  $1657\text{ cm}^{-1}$  et  $1545\text{ cm}^{-1}$  en présence d'anions  $\text{I}^-$  et  $\text{NO}_3^-$  à 20 mM dans le PSII. Ces interactions avec les bandes amide I et amide II sont beaucoup plus marquées par rapport aux autres anions. On observe également des changements de

conformation qui se traduisent par la présence d'une absorption caractéristique à  $1660\text{ cm}^{-1}$  (pour l'amide I) et  $1545\text{ cm}^{-1}$  (pour l'amide II) en présence de 20 mM de  $\text{NO}_3^-$ . La présence d'un pic positif caractéristique à  $1517\text{ cm}^{-1}$  dans la différence de spectre de la protéine en présence de 20 mM de NaI, est due à l'interaction de l'anion  $\text{I}^-$  avec les résidus de la tyrosine (Papageorgiou et Lagoyanni, 1991; Bograh et al., 1996). Les changements de conformation sont dus aux fortes interactions qui s'établissent avec les groupements C=O et C-N des polypeptides. Il pourrait aussi avoir une possibilité de liaison hydrogène via la molécule d'eau.

Les études de la simulation spectrale ont montré qu'il n'y a pas de changements de conformation significatifs au niveau des protéines en présence d'excès d'anions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Br}^-$ ; la structure en hélice- $\alpha$  reste pratiquement stable de même que les autres structures (tableau 5.5). Tandis qu'en présence de 20 mM de NaI la structure hélice- $\alpha$  perd 4% de sa surface, et qu'en présence de cette même concentration en  $\text{NaNO}_3$ , elle perd 3% de cette même surface pour voir augmenter les surfaces des structures feuillet- $\beta$ , coude et turn (tableau 5.6). D'autre part, les variations des pourcentages des structures secondaires sont dues aux changements de conformations et de structure intervenues au sein des protéines du PSII.

Sur les figures 5.13 et 5.14, on remarque que les changements de conformations s'observent pour les concentrations supérieures à 10 mM. Le changement de conformation apparaît à des concentrations plus faibles avec l'ion  $\text{I}^-$  par rapport au  $\text{NO}_3^-$ .

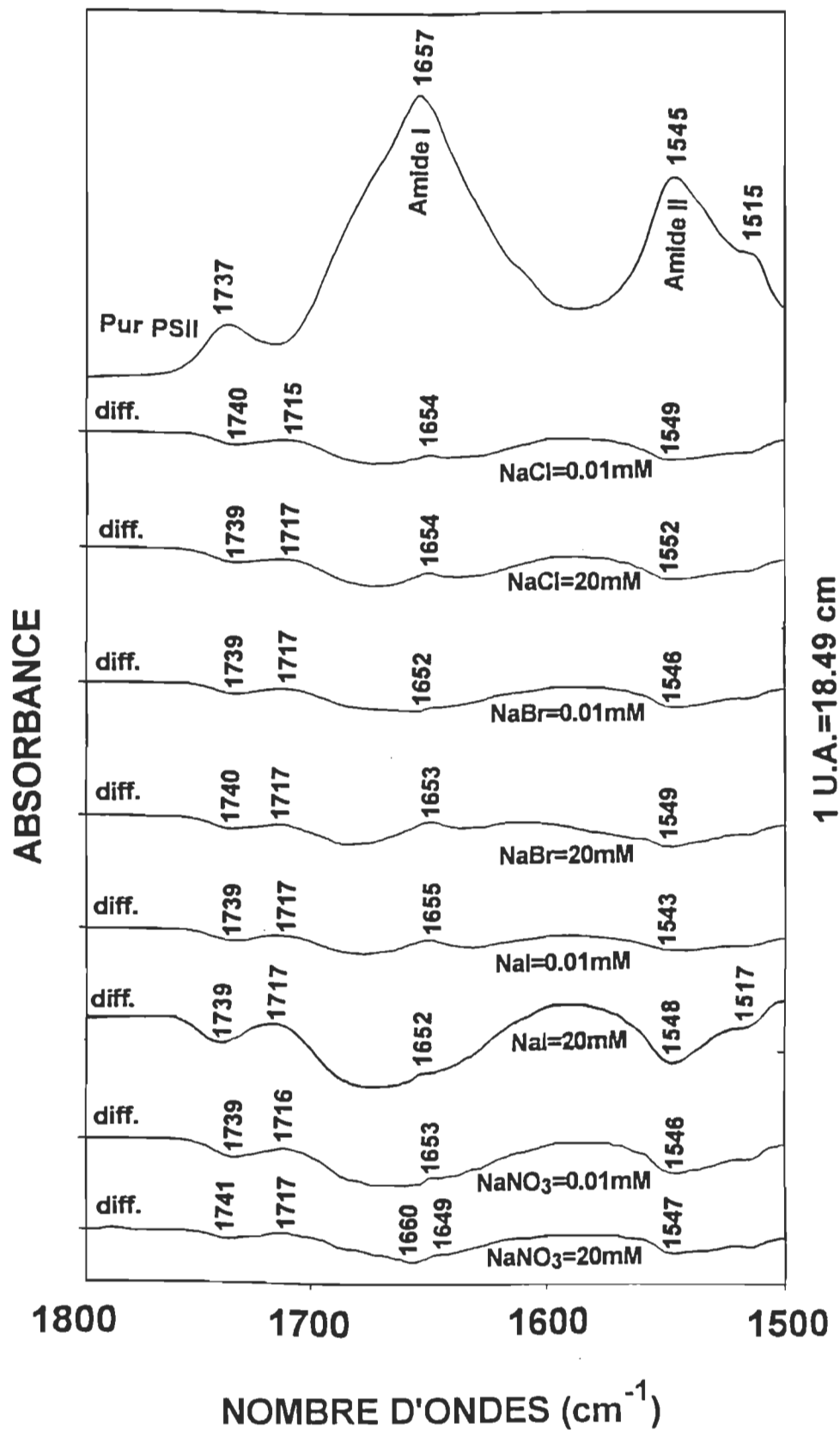


Figure 5.12. Spectre d'absorption FTIR du PSII pur et spectre de différence [(PSII+Anions)-(PSII)] en solution aqueuse dans la région de 1800-1500  $\text{cm}^{-1}$ .

**Tableau 5.5.** Effets des anions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Br}^-$  sur les structures secondaires des protéines du PSII à travers la simulation spectrale entre 1700 et  $1612\text{ cm}^{-1}$  à 0.01, 0.1, 1, 10, et 20 mM de concentration.

Composants de l'Amide I ( $\text{cm}^{-1}$ )	Conformat.	(%) de conformat. PSII (pur)	(%) de conformation NaCl (mM)						(%) de conformation NaBr (mM)					
			0.01	0.1	1	5	10	20	0.01	0.1	1	5	10	20
1657	hélice- $\alpha$	( $47 \pm 1$ )	47	46	46	46	46	46	47	47	46	46	46	46
1626-1640	feuillet- $\beta$	( $11 \pm 0.4$ )	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
1641-1648	random	( $16 \pm 0.5$ )	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
1670-1678	coude	( $19 \pm 0.5$ )	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
1685-1691	$\beta$ -antiparal.	( $7 \pm 0.2$ )	6	7	7	7	7	7	6	6	7	7	7	7



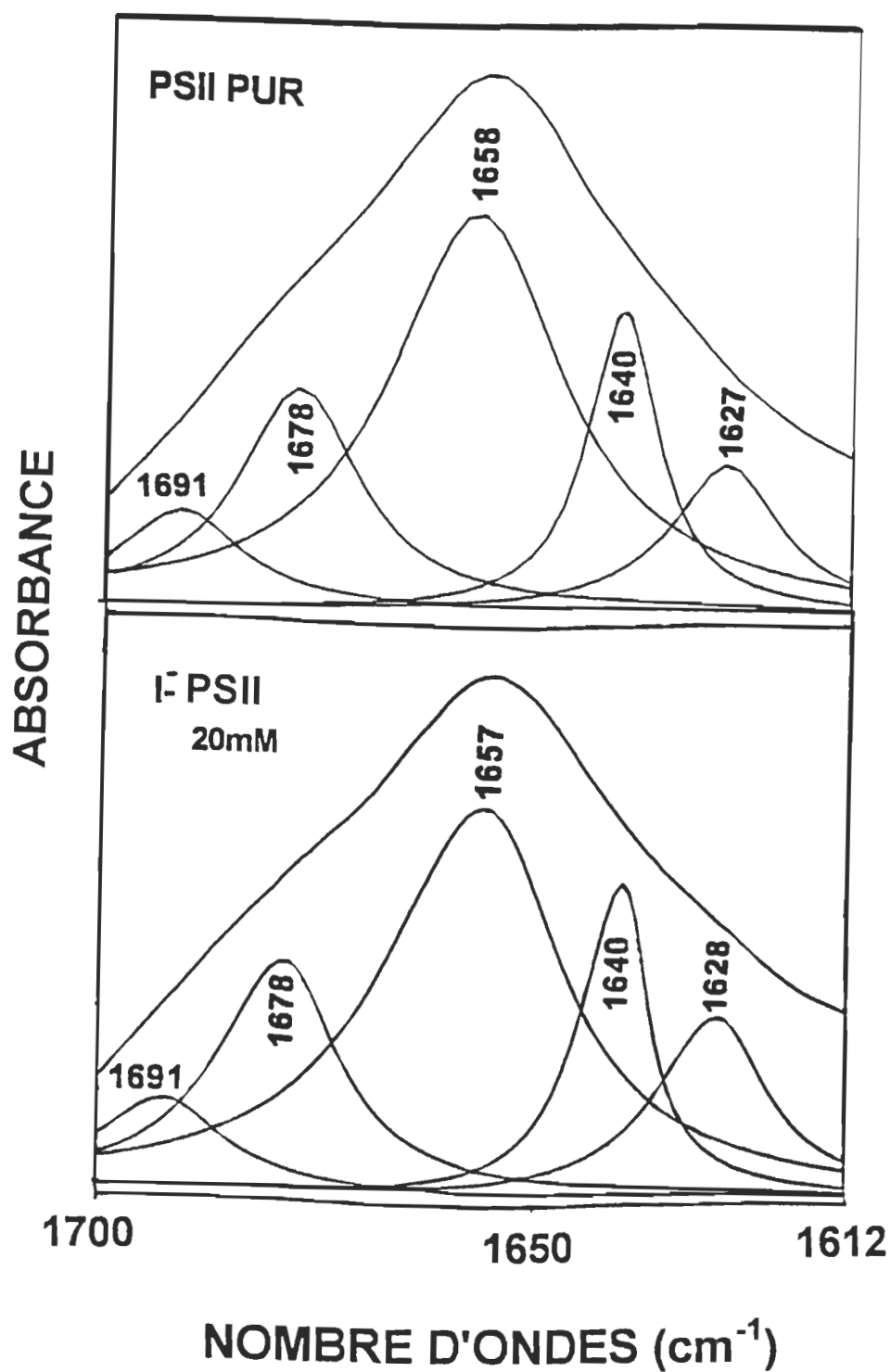


Figure 5.13. Simulation spectrale du PSII pur et du spectre PSII+I<sup>-</sup>, 20 mM dans la région de 1700-1612 cm<sup>-1</sup>. Pourcentage des structures secondaires: hélice- $\alpha$  43%, feuillet- $\beta$  14%, coude 20%, structure non ordonnée (random) 15%, structure  $\beta$ -antiparallèle 8%.

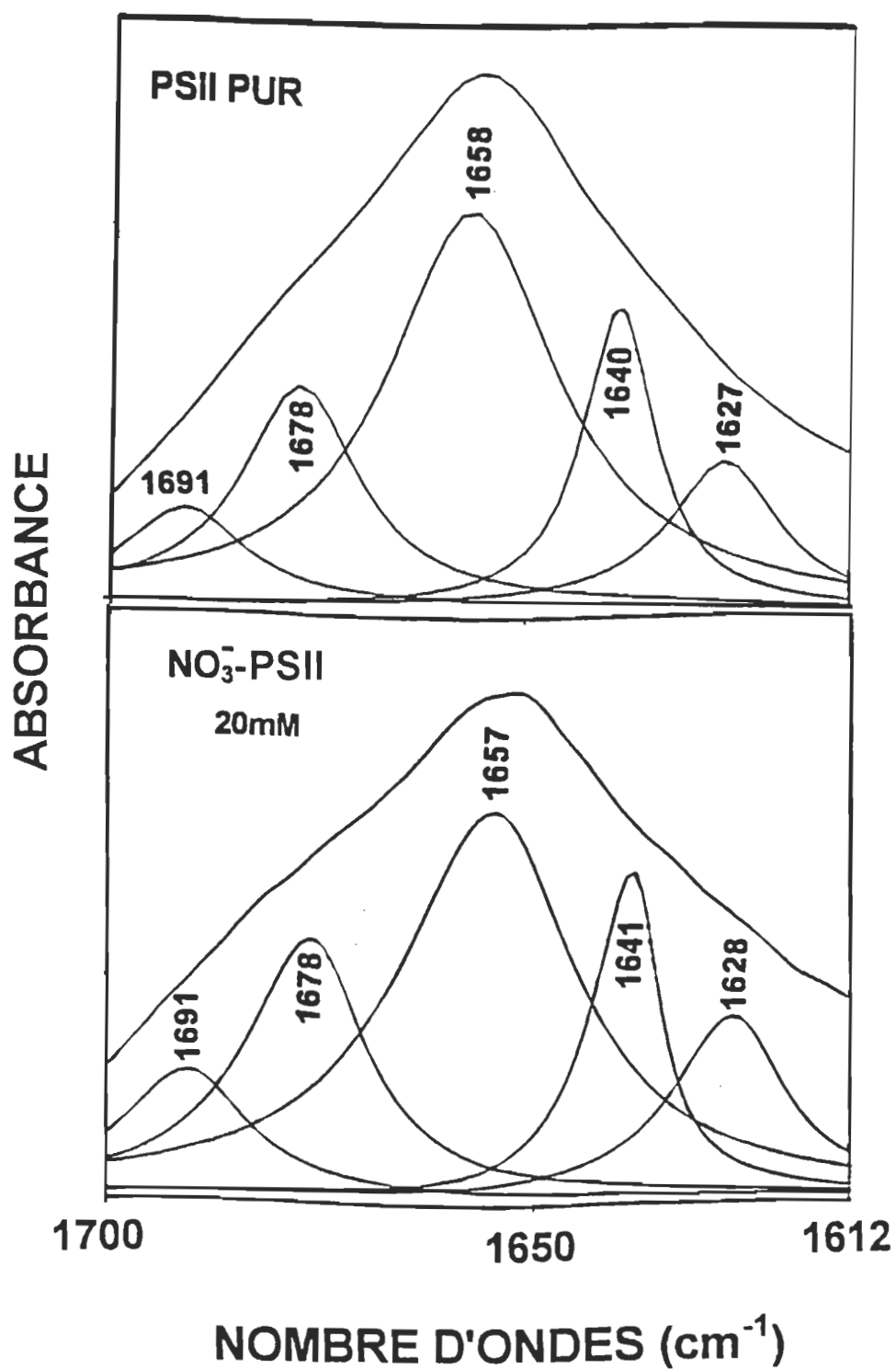


Figure 5.14. Simulation spectrale du PSII pur et du spectre PSII+NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 20 mM dans la région de 1700-1612 cm<sup>-1</sup>. Pourcentage des structures secondaires: hélice- $\alpha$  44%, feuillet- $\beta$  13%, coude 20%, structure non ordonnée (random) 15%, structure  $\beta$ -antiparallèle 8%.

**Tableau 5.6.** Effets des anions  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{I}^-$  sur les structures secondaires des protéines du PSII à travers la simulation spectrale entre 1700 et 1612  $\text{cm}^{-1}$  à 0.01, 0.1, 1, 10, et 20 mM de concentration.

Composants de l'Amide I ( $\text{cm}^{-1}$ )	Conformat.	(%) de conformation PSII (pur)	(%) de conformation NaI (mM)						(%) de conformation $\text{NaNO}_3$ (mM)					
			0.01	0.1	1	5	10	20	0.01	0.1	1	5	10	20
1657	hélice- $\alpha$	(47 $\pm$ 1)	46	46	46	45	44	43	46	46	45	45	45	44
1626-1640	feuillet- $\beta$	(11 $\pm$ 0.4)	12	12	13	14	13	14	13	12	12	12	12	13
1641-1648	random	(16 $\pm$ 0.5)	16	16	16	16	16	15	16	16	16	16	15	15
1670-1678	coude	(19 $\pm$ 0.5)	19	19	19	19	19	20	19	19	19	19	20	20
1685-1691	$\beta$ -antipara.	(7 $\pm$ 0.2)	7	7	6	6	8	8	6	7	8	8	8	8

#### 5.4.3. Effets sur le dégagement d'oxygène

Au tableau 5.7, on remarque que les anions tels que  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ , n'affectent pas le dégagement d'oxygène entre 0.01 et 20 mM, ce qui n'est pas le cas avec les anions  $\text{I}^-$  et  $\text{NO}_3^-$ . Avec les autres anions  $\text{I}^-$  et  $\text{NO}_3^-$  nous remarquons une augmentation de l'inhibition du dégagement d'oxygène en fonction de la concentration. Cette inhibition va de 22 à 38% pour des concentrations allant de 0.01 mM à 20 mM dans le cas de  $\text{NO}_3^-$ . Tandis que dans le cas de l'anion  $\text{I}^-$ , l'inhibition va de 0 à 77% pour les mêmes concentrations. Ceci pourrait signifier que ces deux anions perturbent le processus de dégagement d'oxygène,

**Tableau 5.7.** Pourcentage de l'inhibition du dégagement d'oxygène du centre réactionnel du PSII en présence des anions inorganiques ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{I}^-$ ) à 0.01, 0.1, 1, 10 et 20 mM de concentration.

Concentrations (mM)	0.01	0.1	1.0	5.0	10.0	20.0
% d'inhibition causée par NaCl	0	0	0	0	0	0
% d'inhibition causée par NaBr	0	0	0	0	0	0
% d'inhibition causée par $\text{NaNO}_3$	22	25	27	31	31	38
% d'inhibition causée par NaI	0	13	62	65	69	77

certainement au niveau du complexe de dégagement d'oxygène (Bograh et al., 1996).

## 5.5. Effets des polyamines sur le PSII

### 5.5.1. Effets sur les modes de vibration du PSII en spectroscopie FTIR

Aux figures 5.15 et 5.17, nous remarquons qu'il y a des changements au niveau des bandes amide I et amide II respectivement à  $1657\text{ cm}^{-1}$  et  $1547\text{ cm}^{-1}$  ainsi que les bandes situées à  $2956\text{ cm}^{-1}$ , à  $2930\text{ cm}^{-1}$  et à  $2871\text{ cm}^{-1}$  lorsque le PSII est traité avec les PAs. Ces bandes augmentent d'intensité lorsque la concentration des PAs augmente. L'augmentation des intensités des bandes

laisse croire qu'il pourrait y avoir une désorganisation des structures des protéines du PSII. Les tableaux 5.8 et 5.9 montrent l'effet des PAs (Spm et Spd) sur les bandes de vibration des amides situées dans la région de 1800 à 1000  $\text{cm}^{-1}$ . Les figures 5.16 et 5.18 montrent les spectres des complexes PSII-PAs pour cette même région. Dans cette région on note un déplacement du groupement carbonyle ester vers les basses fréquences de 1.1  $\text{cm}^{-1}$  en présence de 10 et 20 mM de Spm. En présence de 5 à 10 mM de Spd, on a un déplacement vers les hautes fréquences de 2.0  $\text{cm}^{-1}$ . Ce groupement ne peut être identifié avec précision à un type donné de molécules (Menikh, 1994). Cependant, on pourrait croire qu'une interaction PAs-chlorophylle ou PAs-protéines s'établisse. Les structures secondaires des protéines du PSII auraient probablement subi des modifications. Ces modifications affaibliraient les interactions dans le cas de la Spd. Pour les concentrations entre 0.01 et 0.1 mM de polyamines, on note un déplacement de l'amide I vers les hautes fréquences de 1.9  $\text{cm}^{-1}$ . Pour les autres concentrations le déplacement est de 1  $\text{cm}^{-1}$ .

La fréquence de la bande amide II subit elle aussi un déplacement vers les hautes fréquences d'environ 0.9  $\text{cm}^{-1}$  avec la Spm, et de 1.3  $\text{cm}^{-1}$  avec la Spd pour les concentrations de 0.01 à 10 mM. Avec une concentration de 20 mM, on observe un déplacement de 2.3  $\text{cm}^{-1}$ .

Pour des concentrations entre 5 et 20 mM de PAs, nous observons des modifications importantes au niveau de la conformation des protéines. Ceci indique qu'il pourrait y avoir des changements de conformation des structures du PSII.

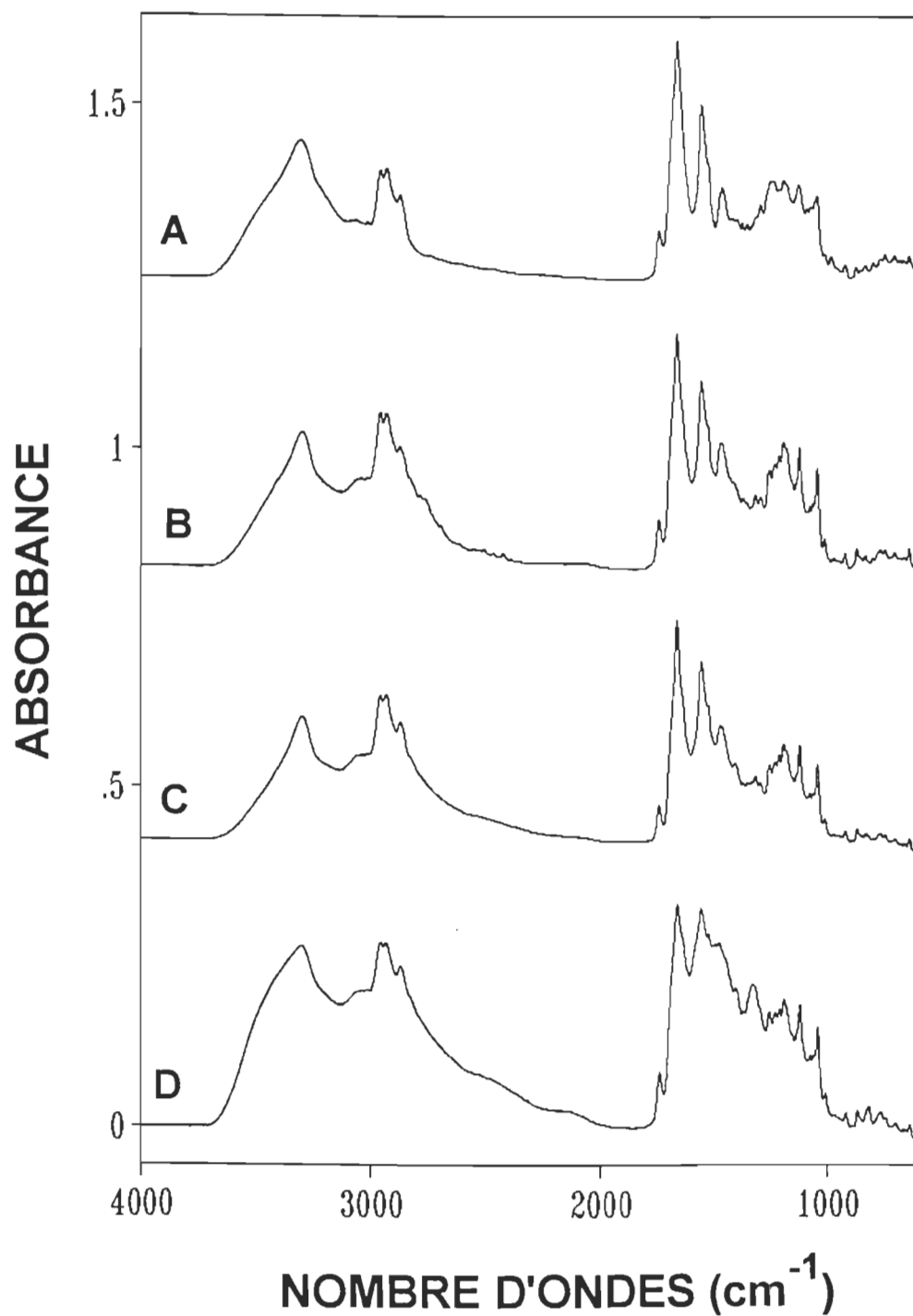


Figure 5.15. Spectres d'absorption FTIR dans la région 4000-600 cm<sup>-1</sup> des polypeptides du PSII pur et du complexe PSII-Spm. (A) PSII pur; (B) PSII+Spm, 5 mM; (C) PSII+Spm, 10 mM; (D) PSII+Spm, 20 mM.

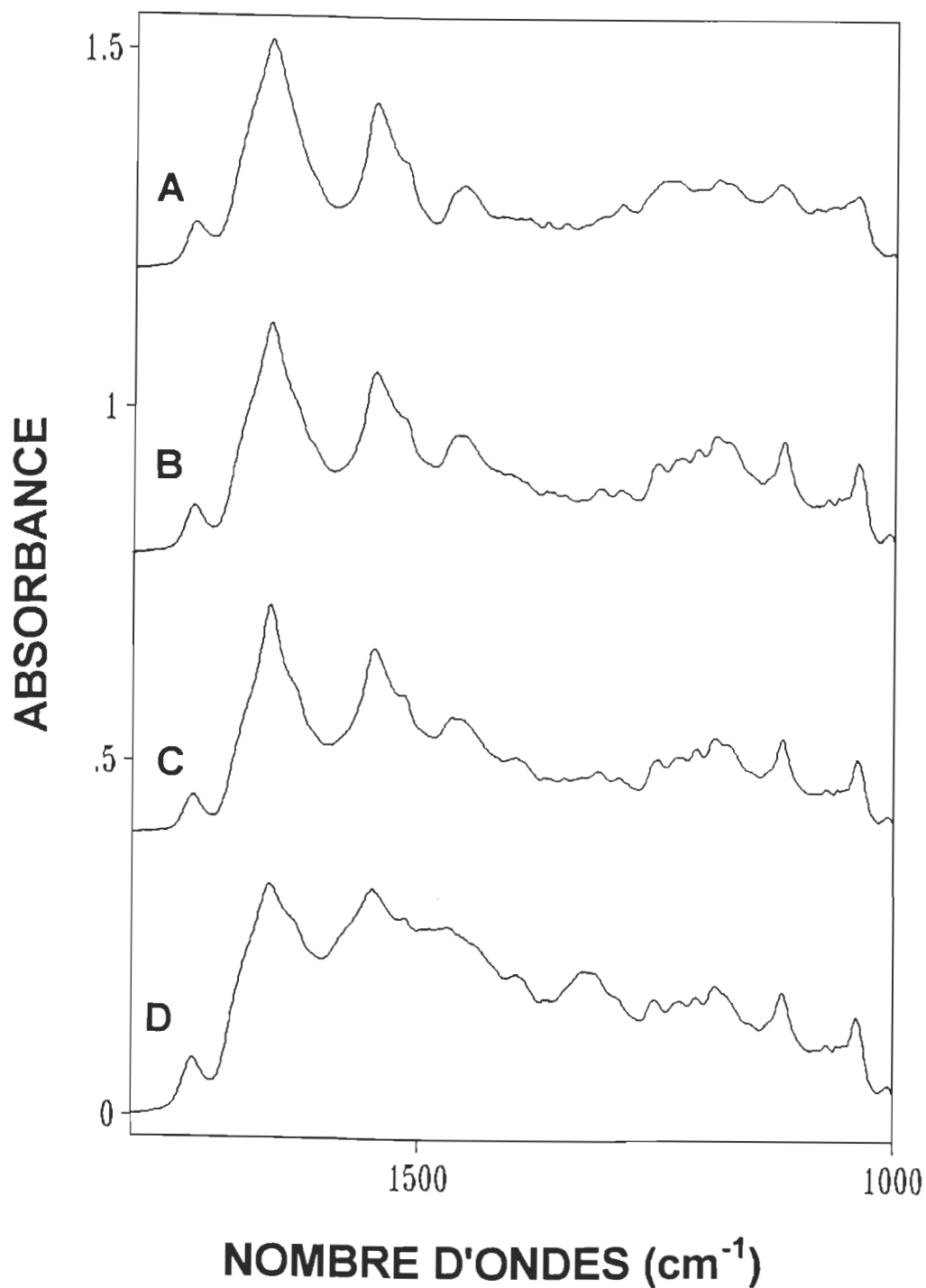


Figure 5.16. Spectres d'absorption FTIR dans la région 1800-1000 cm<sup>-1</sup> des polypeptides du PSII pur et du complexe PSII-Spm. (A) PSII pur; (B) PSII+Spm, 5 mM; (C) PSII+Spm, 10 mM; (D) PSII+Spm, 20 mM.

**Tableau 5.8.** Effets des différentes concentrations de spermine sur les polypeptides du PSII étudiés par la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).

Attribution des bandes	PSII pur	Concentrations (mM)					
		0.01	0.1	1	5	10	20
Carbonyle	1736.6	1736.6	1736.6	1736.6	1736.6	1735.7	1735.7
Amide I	1656.6	1658.5	1658.5	1657.6	1657.6	1657.6	1657.6
Amide II	1546.7	1547.6	1547.6	1547.6	1547.6	1547.6	1547.6
Tyrosine	1515.7	1516.8	1516.8	1517.7	1517.7	1516.7	1514.9
Déformation CH	1454.1	1454.0	1454.0	1455.0	1458.9	1458.0	1467.6
Déformation CH <sub>3</sub>	1346.0	1345.1	1345.1	1345.1	1345.1	1346.1	1320.0
Amide III	1288.0	1287.3	1286.3	1286.3	1286.3	1286.3	1290.2



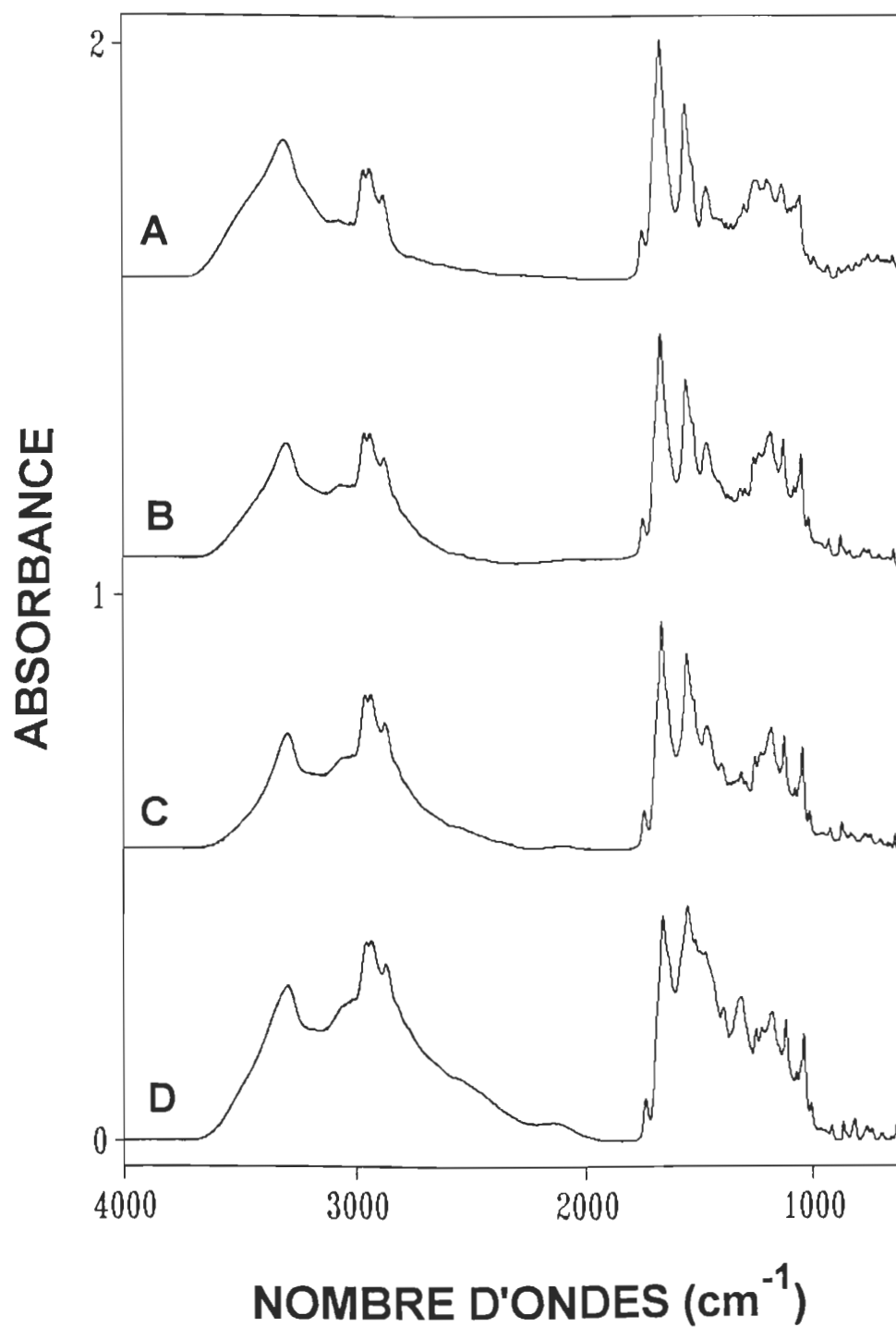


Figure 5.17. Spectres d'absorption FTIR dans la région de 4000-600 cm<sup>-1</sup> des polypeptides du PSII pur et du complexe PSII-Spd. (A) PSII pur; (B) PSII+Spd, 5 mM; (C) PSII+Spd, 10 mM; (D) PSII+Spd, 20 mM.

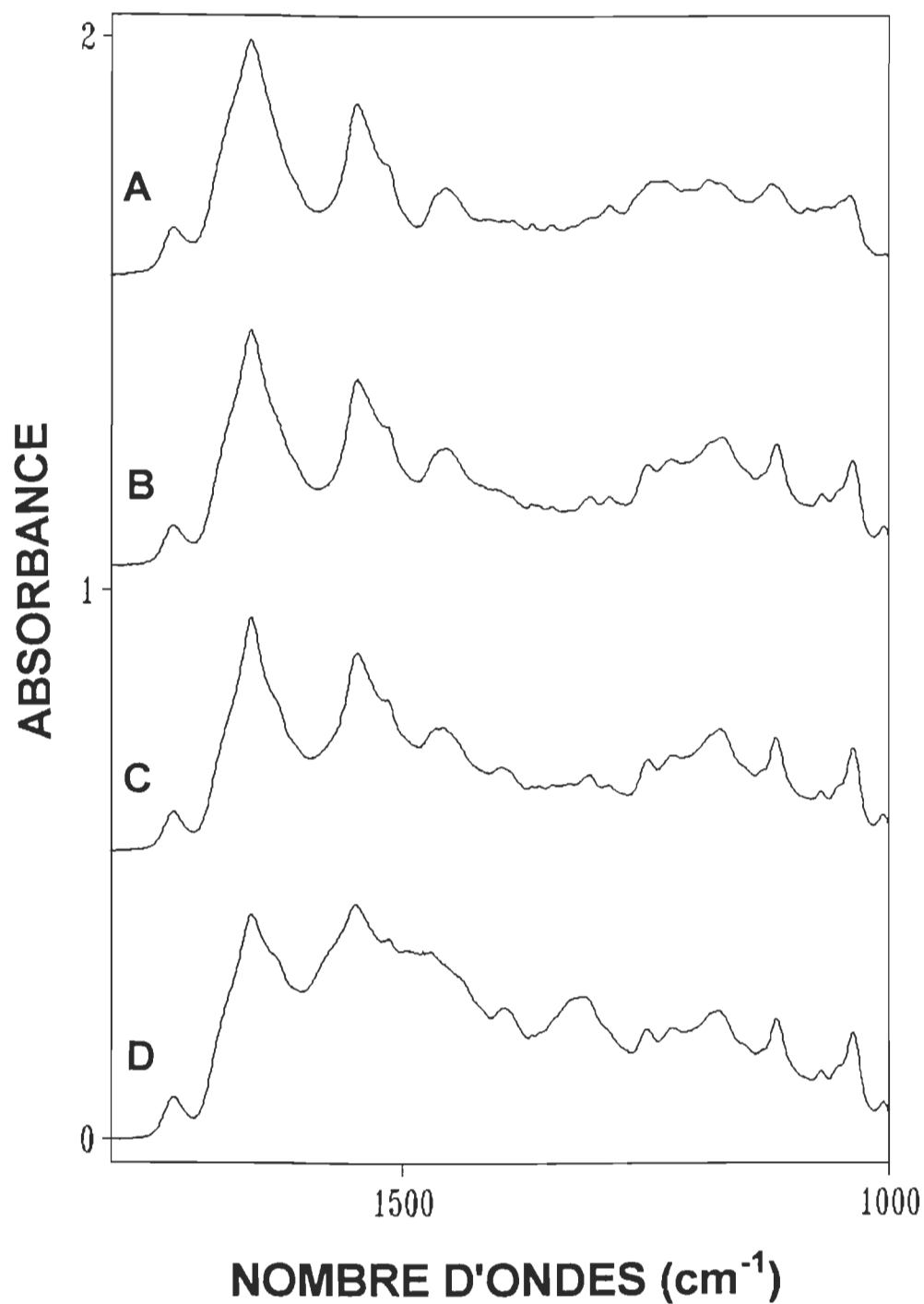


Figure 5.18. Spectres d'absorption FTIR dans la région 1800-1000 cm<sup>-1</sup> des polypeptides du PSII pur et du complexe PSII-Spd. (A) PSII pur; (B) PSII+Spd, 5 mM; (C) PSII+Spd, 10 mM; (D) PSII+Spd, 20 mM.

**Tableau 5.9.** Effets des différentes concentrations de spermidine sur les polypeptides du PSII étudiés par la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).

Attribution des bandes	PSII pur	Concentrations (mM)					
		0.01	0.1	1	5	10	20
Carbonyle	1736.6	1736.6	1736.7	1736.6	1738.6	1738.6	1738.6
Amide I	1656.6	1658.5	1658.5	1658.5	1657.6	1657.6	1656.6
Amide II	1546.7	1548,6	1548.6	1548.6	1548.6	1548.6	1549.6
Tyrosine	1515.7	1517.7	1517.7	1516.8	1516.8	1516.8	1513.9
Déformation CH	1454.1	1451.0	1451.0	1453.0	1453.0	1458.9	1470.5
Déformation CH <sub>3</sub>	1346	1345.1	1345.1	1345.1	1344.2	1344.2	-
Amide III	1288.0	1287.3	1287.3	1287.3	1287.3	1287.3	-

Aussi, les fréquences des bandes de CH et de CH<sub>3</sub> se déplacent vers les basses fréquences quand on augmente la concentration de Spm et de Spd augmente. Dans le cas de la Spm, les fréquences de CH chutent vers les basses fréquences tandis que celles de CH<sub>3</sub> augmentent vers les hautes fréquences avec la concentration augmente. Lorsque la concentration de Spd est de 20 mM, la bande de CH<sub>3</sub> disparaît en même temps que la bande amide III qui, auparavant, avait subi une légère baisse vers les basses fréquences de 0.7 cm<sup>-1</sup>. Dans le cas

de la Spm, les fréquences des bandes de CH et de CH<sub>3</sub> se déplacent vers les basses fréquences pour les concentrations inférieures à 20 mM. Les fréquences de ces bandes augmentent après de 2.2 cm<sup>-1</sup> avec une concentration de 20 mM.

### 5.5.2. Effets sur la structure du PSII en spectroscopie FTIR à travers la différence de spectres

Aux figures 5.19 et 5.20 on remarque que les polyamines se lient avec les particules du PSII à travers des interactions moléculaires.

À la figure 5.19 de la différence spectrale de la Spm on observe de faibles interactions entre Spm et PSII à 1738 cm<sup>-1</sup> et à 1740 cm<sup>-1</sup> pour toutes les concentrations. Une forte interaction entre l'amide I et la Spm est observée à 1655 cm<sup>-1</sup> pour une concentration de 0.01 mM. Cette dernière interaction devient faible pour les autres concentrations avec lesquelles on observe de fortes variations négatives qui traduisent d'importants changements de conformations au niveau des structures secondaires de l'amide I. D'autres interactions s'observent entre 1550 cm<sup>-1</sup> et 1515 cm<sup>-1</sup> pour les concentrations supérieures à 0.01 mM. Ces interactions traduisent un changement de conformation important au niveau de l'amide II. Ces changements observés sur des spectres indiquent la présence des absorptions négatives à 1670, 1659, et 1655 cm<sup>-1</sup> (pour l'amide I). Pour l'amide II, les changements sont observés à 1548, à 1547, et à 1550 cm<sup>-1</sup> dans le spectre de différence (figure 5.19).

À la figure 5.20, on remarque de faibles interactions à  $1738\text{ cm}^{-1}$  pour les concentrations entre 0.01 mM et 5 mM. On remarque la même chose à  $1739\text{ cm}^{-1}$  pour une concentration de 10 mM. D'autres faibles interactions s'observent à  $1547\text{ cm}^{-1}$  avec une concentration de 0.1 mM à  $1553\text{ cm}^{-1}$ . Pour une concentration de 5 mM, on l'observe à  $1670\text{ cm}^{-1}$ ,  $1653\text{ cm}^{-1}$  et  $1546\text{ cm}^{-1}$ . Pour une concentration de 10 mM, on les observe à  $1674\text{ cm}^{-1}$ ,  $1654\text{ cm}^{-1}$ , et  $1625\text{ cm}^{-1}$ . De fortes interactions s'observent à  $1655\text{ cm}^{-1}$  pour 0.01 mM, à  $1656\text{ cm}^{-1}$  et  $1547\text{ cm}^{-1}$  pour 0.1 mM; à  $1655\text{ cm}^{-1}$ ,  $1625\text{ cm}^{-1}$  et  $1527\text{ cm}^{-1}$  pour 1 mM; enfin à  $1575\text{ cm}^{-1}$ ,  $1540\text{ cm}^{-1}$ , et  $1527\text{ cm}^{-1}$  pour 10 mM.

Les pics positifs à  $1655\text{ cm}^{-1}$  et  $1656\text{ cm}^{-1}$  indiquent la présence d'une faible interaction entre le groupement carbonyle ester du PSII et la Spd. Le pic à  $1527\text{ cm}^{-1}$  indique une forte interaction entre la tyrosine et la Spd.

À une concentration de 0.01 mM en Spm et Spd, on observe un pic positif à  $1655\text{ cm}^{-1}$  dans les spectres de différence de complexes PSII-polyamines. Ce pic est attribué à une augmentation de l'intensité de la bande amide I. Il est aussi dû à une interaction (liaison hydrogène) avec les groupements  $\text{C=O}$  des protéines (figure 5.19). Quand la concentration en polyamine est de 0.1 mM, le pic à  $1656\text{ cm}^{-1}$  baisse en intensité sur les spectres de différence tandis que deux pics négatifs apparaissent à  $1659\text{ cm}^{-1}$  et  $1548\text{ cm}^{-1}$  sur les spectres de différence (figure 5.20).

L'augmentation de l'intensité de la bande amide I observé sur le spectre de la spermidine est due à une importante interaction entre polyamines et les groupements  $\text{C=O}$  des polypeptides. Tandis que la baisse l'intensité des bandes

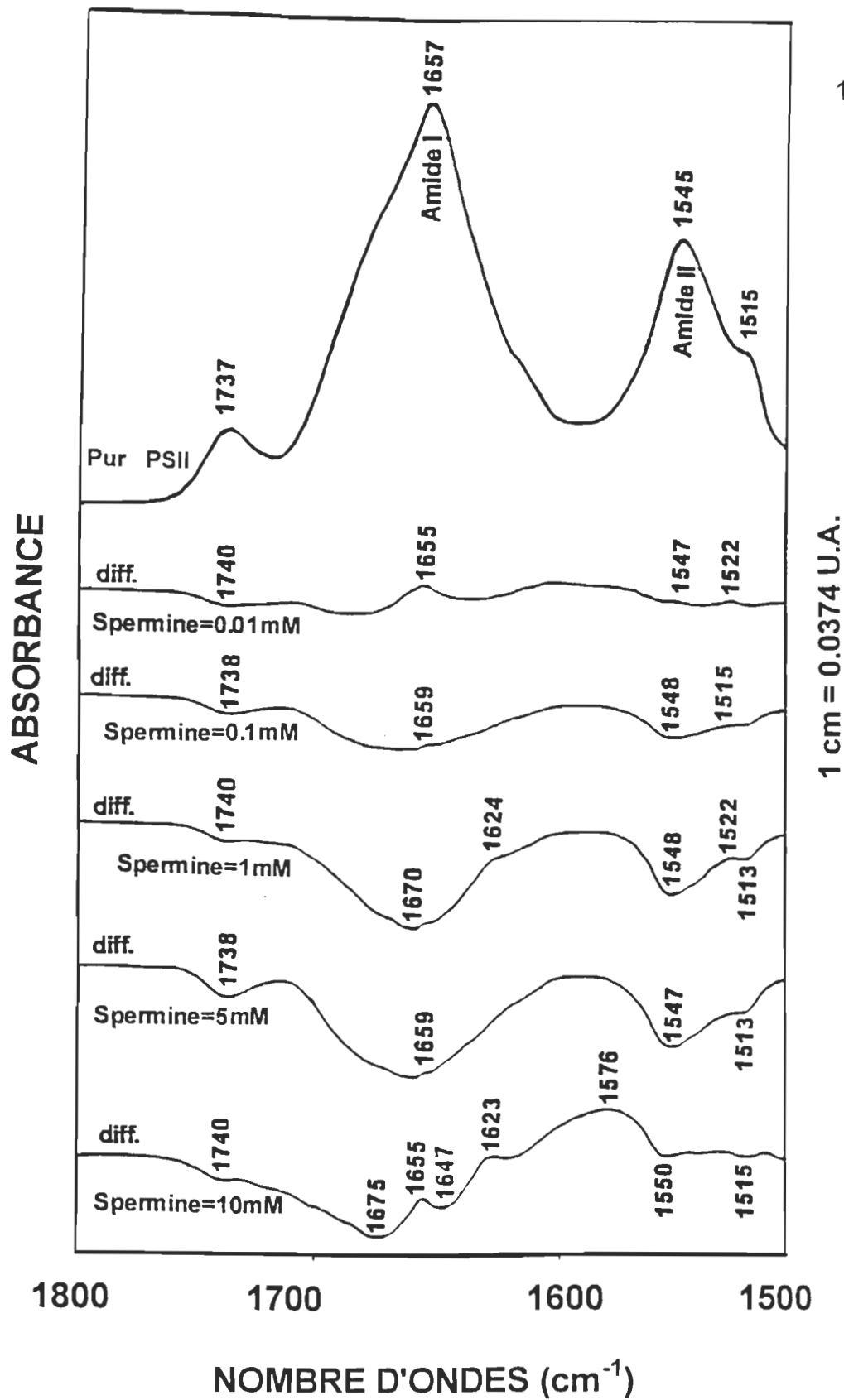


Figure 5.19. Spectre d'absorption FTIR du PSII pur et spectre de différence [(PSII+Spm)-(PSII)] en solution aqueuse dans la région de 1800-1500  $\text{cm}^{-1}$ .

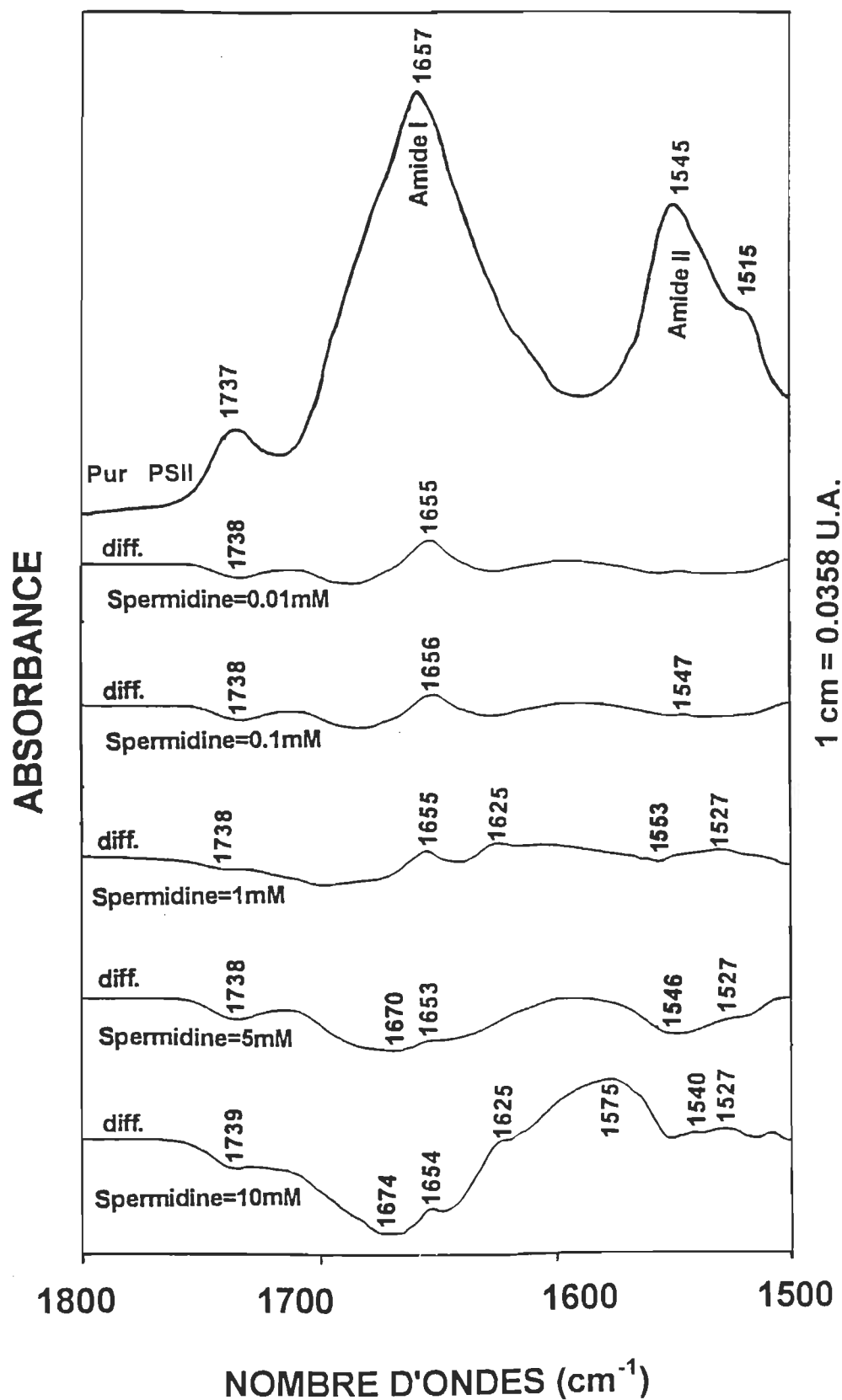


Figure 5.20. Spectre d'absorption FTIR du PSII pur et spectre de différence [(PSII+Spd)-(PSII)] en solution aqueuse dans la région de 1800-1500  $\text{cm}^{-1}$ .

amides I et amide II sur les spectres des complexes de spermine sont dus aux changements des structures des protéines secondaires du PSII sous la présence excessive de spermine. Ce qui laisse croire que les polyamines affaiblissent les liaisons hydrogènes existantes avec les groupements C=O et N-H. Par conséquent ils agiraient sur la structures des polypeptides du PSII qui subissent probablement des modifications.

Le changement spectral est relié au changement de conformation. Ce changement de conformation traduit une interaction importante des polyamines avec les groupements C=O et C-N des polypeptides (possibilité d'une liaison hydrogène via la molécule d'eau). On peut donc dire que le changement structural induit le changement de conformation et de structure qu'on peut observer sur les figures 5.19 et 5.20. Les changements structuraux observés sont importants pour les concentrations supérieures ou égales à 0.1 mM en Spm et à 1 mM en Spd. À partir de la méthode de la différence de spectre, on remarque que les PAs interagissent avec les protéines du PSII en renforçant les liaisons hydrogènes et en affaiblissant d'autres liaisons existantes. Ce qui entraînerait la modification des structures des polypeptides du PSII.

Les simulations spectrales de la bande amide I du PSII en présence de concentrations de PAs sont présentées aux figures 5.21 et 5.22. Cette simulation spectrale nous a permis d'observer que la structure en hélice- $\alpha$  diminue en pourcentage par rapport aux autres sous structures sous l'effet des concentrations des anions inorganiques ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{I}^-$ ), des PAs (Spm et Spd), et du cholestérol. Ces résultats sont en accord avec ceux déjà mentionnés par les chercheurs (Glaeser et al., 1991).



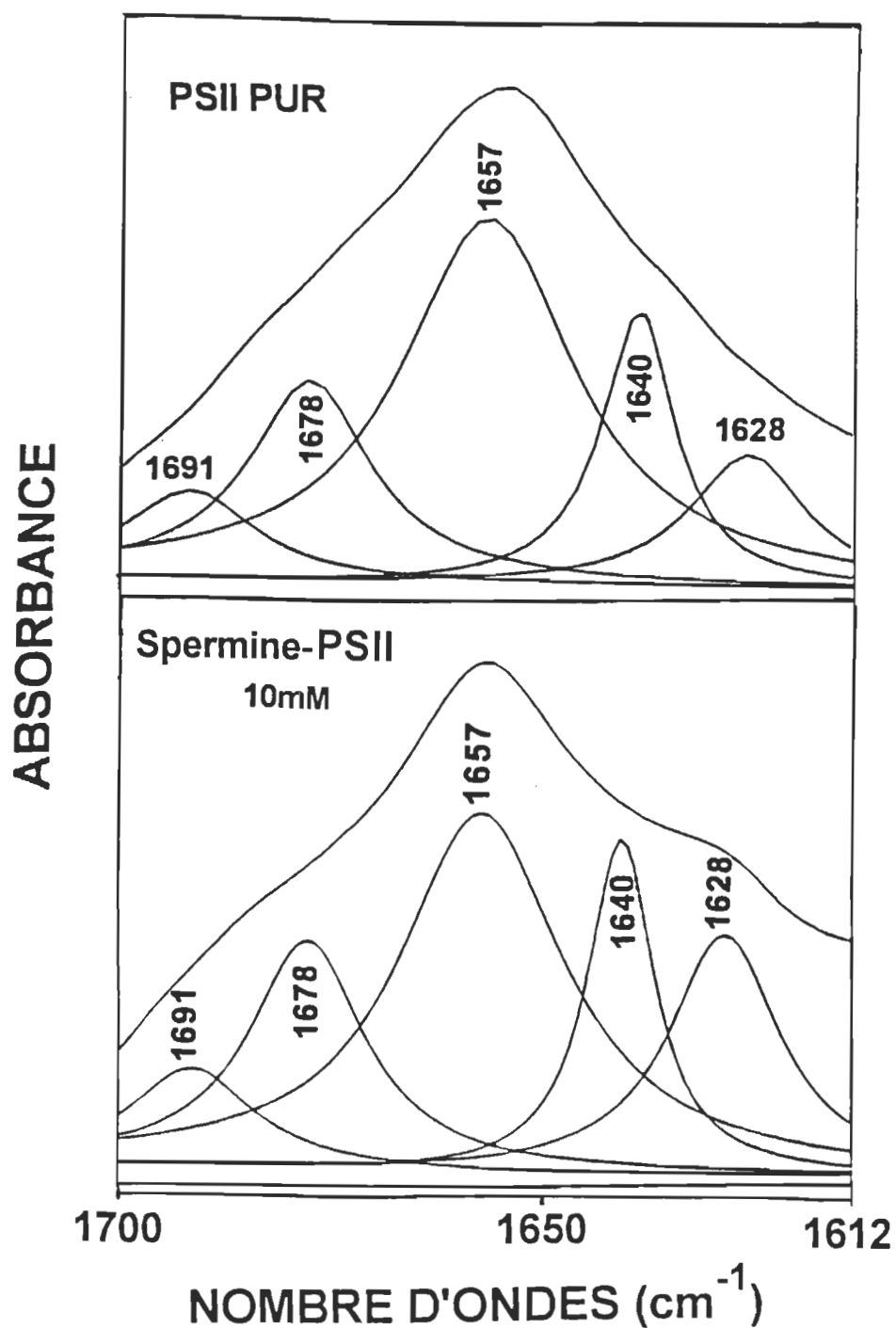


Figure 5.21. Simulation spectrale du PSII pur et des spectres PSII+Spm, 10 et 20 mM dans la région de 1700-1612  $\text{cm}^{-1}$ . Pourcentage des structures secondaires: hélice- $\alpha$  37%, feuillet- $\beta$  18%, coude 19%, structure non ordonnée (random) 17%, structure  $\beta$ -antiparallèle 9%.

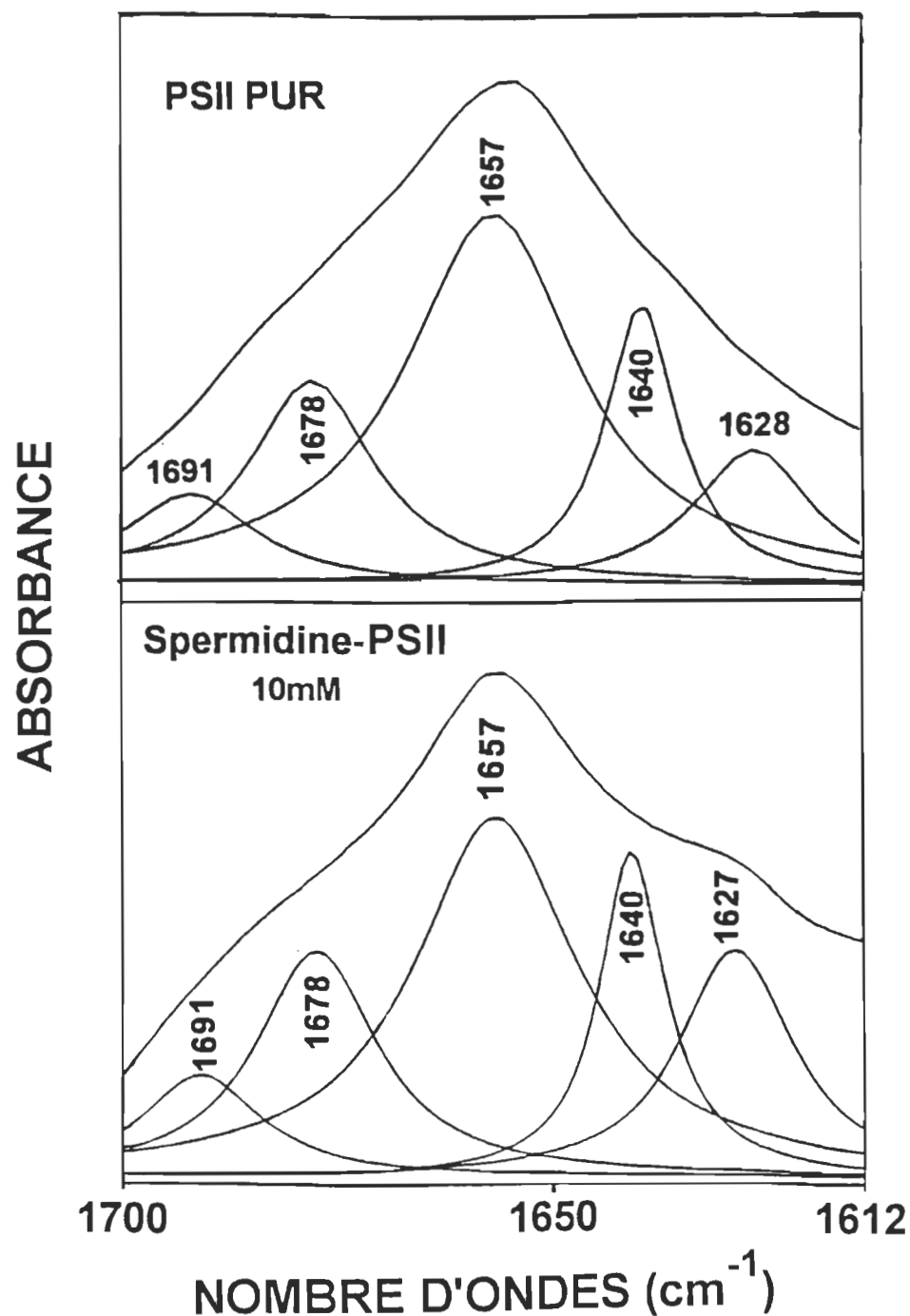


Figure 5.22. Simulation spectrale du PSII pur et des spectres PSII+Spd, 10 et 20 mM dans la région de 1700-1612  $\text{cm}^{-1}$ . Pourcentage des structures secondaires: hélice- $\alpha$  40%, feuillet- $\beta$  17%, coude 18%, structure non ordonnée (random) 17%, structure  $\beta$ -antiparallèle 8%.

Le tableau 5.10 montre que la structure en hélice- $\alpha$  constituée de 47% de protéine pure perd 12% de sa surface initiale (c'est-à-dire 21% de la surface de la bande amide I) en présence de 20 mM de Spm. Au même moment la structure en feuillet- $\beta$  constituée de 11% de protéine pure subie une augmentation de 9% de sa surface (figure 5.21). En présence de cette même concentration en Spd (20 mM), la structure en hélice- $\alpha$  constituée de 47% de protéine pure perd 10% de

**Tableau 5.10.** Effets des polyamines sur les structures secondaires des protéines du PSII à travers la simulation spectrale entre 1700 et 1612  $\text{cm}^{-1}$  à 0.01, 0.1, 1, 10, et 20 mM de concentration.

Composants de l'Amide I ( $\text{cm}^{-1}$ )	Conformation	(%) de conformation PSII (pur)	(%) de conformation Spermine (mM)						(%) de conformation Spermidine (mM)					
			0.01	0.1	1	5	10	20	0.01	0.1	1	5	10	20
1657	hélice- $\alpha$	(47 $\pm$ 1)	43	42	41	40	37	35	45	43	42	41	40	37
1626-1640	feuillet- $\beta$	(11 $\pm$ 0.4)	14	15	16	18	18	20	12	14	14	16	17	21
1641-1648	random	(16 $\pm$ 0.5)	15	15	15	15	17	17	15	15	16	17	17	17
1670-1678	coude	(19 $\pm$ 0.5)	20	20	20	19	19	19	20	20	20	18	18	18
1685-1691	$\beta$ -antipara.	(7 $\pm$ 0.2)	8	8	8	8	9	9	8	8	8	8	8	7

cette même surface (c'est-à-dire 21% de la surface de la bande amide I) (figure 5.22).

### 5.5.3. Effets sur le dégagement d'oxygène du PSII

Le changement conformation des protéines sous l'effet des complexes de spermine (à basse concentration) agit de façon très importante sur l'inhibition de l'oxygène. De la même façon qu'en (FTIR), la fonction de dégagement d'oxygène du PSII est affectée par la Spm et la Spd. Cette fonction est affectée dans les pourcentages allant respectivement de 6.3% à 100% dans le cas de la Spm, et de 0% à 100% dans le cas de la Spd pour des concentrations entre 0.01 et 20 mM. Au tableau 5.11, nous remarquons une forte inhibition du dégagement d'oxygène du PSII en présence d'un excès en concentration de PAs. Cette inhibition débute avec une concentration de 0.01 mM dans le cas de la Spm, et de 0.1 mM dans le cas de la Spd. La perte de l'activité photosynthétique est totalement inhibée à partir de 0.1 mM de Spm et de 1 mM de Spd.

**Tableau 5.11.** Pourcentage de l'inhibition du dégagement d'oxygène du centre réactionnel du PSII en présence de polyamines (spermine et spermidine) à 0.01, 0.1, 1, 10 et 20 mM de concentration.

Concentrations (mM)	0.01	0.1	1	5	10	20
% d'inhibition causé par la Spm	18.2	74.0	100.0	100.0	100.0	100.0
% d'inhibition causé par la Spd	0.0	6.3	100.0	100.0	100.0	100.0

## 5.6. Effets du Cholestérol sur le PSII

### 5.6.1. Effets sur les modes de vibration du PSII en spectroscopie FTIR

À la figure 5.24, on observe qu'il y a des changements au niveau des bandes amide A, amide I et amide II respectivement à  $1657\text{ cm}^{-1}$  et  $1547\text{ cm}^{-1}$  ainsi que les bandes situées à  $2956\text{ cm}^{-1}$ ,  $2930\text{ cm}^{-1}$  et à  $2871\text{ cm}^{-1}$  à la figure 5.23 en présence de cholestérol. Ces bandes augmentent d'intensité lorsqu'on augmente la concentration de cholestérol dans le PSII. Ceci indique qu'il pourrait y avoir une désorganisation des structures des protéines du PSII.

Le tableau 5.12 montre l'effet de cholestérol sur les fréquences des bandes amides situées dans la région de  $1800$  à  $1000\text{ cm}^{-1}$  des différents modes de vibration du complexe PSII-cholestérol. Dans cette région, on a une stabilité du groupement carbonyle ester en présence de cholestérol. À concentration comprise entre  $0.01$  et  $0.1\text{ mM}$  de cholestérol, on note un déplacement de l'amide I vers les hautes fréquences de  $1.9\text{ cm}^{-1}$  et de  $1\text{ cm}^{-1}$  pour les autres concentrations (tableau 5.12). On pense donc que le cholestérol affaiblit les liaisons hydrogènes existantes avec les groupements  $\text{C=O}$  et  $\text{N-H}$ , et par conséquent agirait sur la structure des polypeptides qui subissent inévitablement des modifications.

La fréquence de la bande amide II subit un déplacement vers les hautes fréquences d'environ  $0.9\text{ cm}^{-1}$  pour des concentrations en cholestérol de  $10$  et  $20\text{ mM}$  (tableau 5.12). Cette observation renforce l'hypothèse qu'il pourrait y avoir un changement au niveau des structures secondaires du PSII. Des chercheurs tels

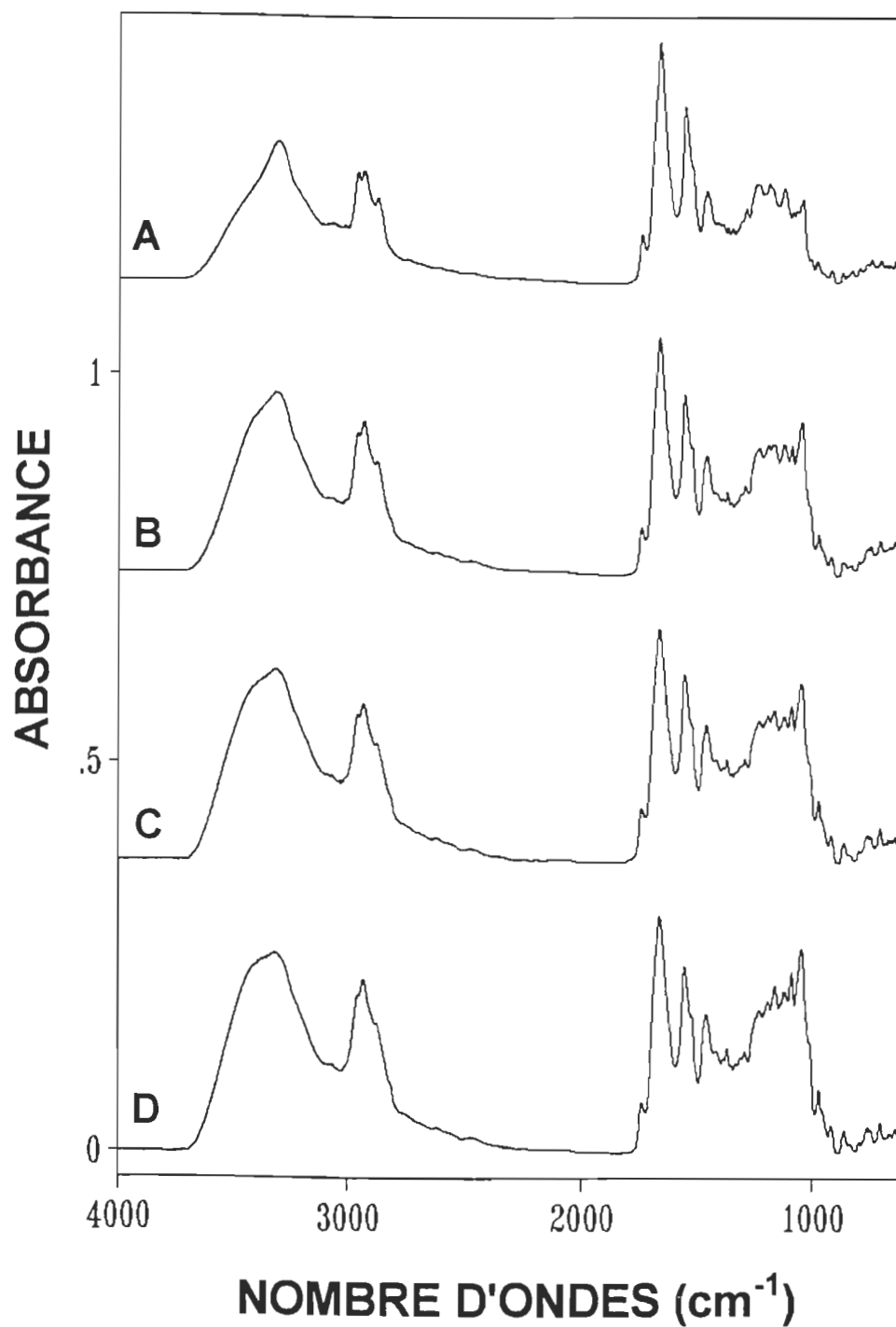


Figure 5.23. Spectres d'absorption FTIR dans la région de 4000-600 cm<sup>-1</sup> des polypeptides du PSII pur et du complexe PSII-cholestérol. (A) PSII pur; (B) PSII+cholestérol, 5 mM; (C) PSII+cholestérol, 10 mM; (D) PSII+cholestérol, 20 mM.

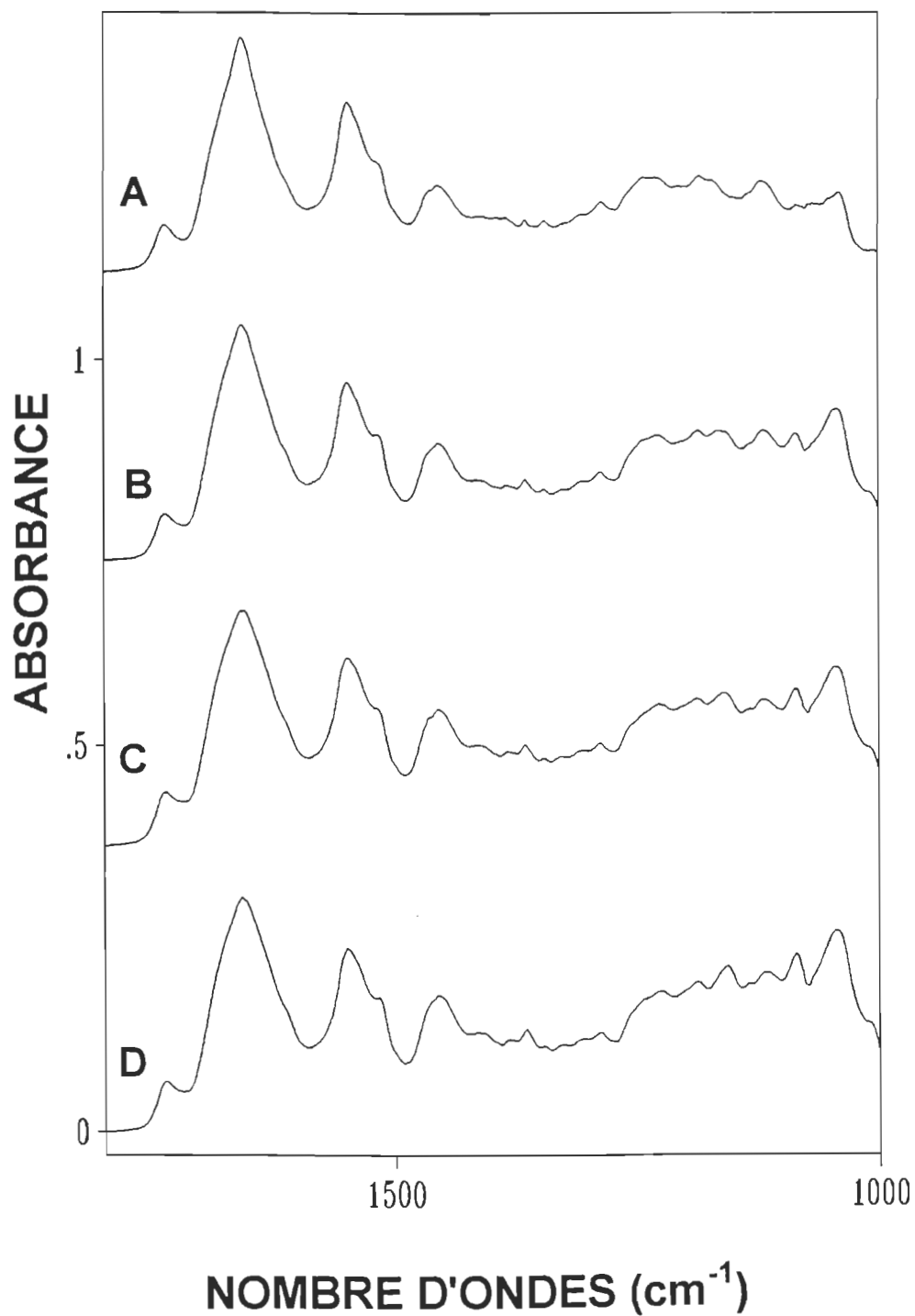


Figure 5.24. Spectres d'absorption FTIR dans la région 1800-1000 cm<sup>-1</sup> des polypeptides du PSII pur et du complexe PSII-cholestérol. (A) PSII pur; (B) PSII+cholestérol, 5 mM; (C) PSII+cholestérol, 10 mM; (D) PSII+cholestérol, 20 mM.

**Tableau 5.12.** Effets des différentes concentrations de cholestérol sur les polypeptides du PSII étudiés par la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).

Attribution des bandes	PSII pur	Concentrations (mM)					
		0.01	0.1	1	5	10	20
Carbonyle	1736.6	1736.6	1736.6	1736.6	1736.6	1736.6	1736.6
Amide I	1656.6	1658.5	1658.5	1657.6	1657.6	1657.6	1657.6
Amide II	1546.7	1547.6	1547.6	1548.6	1548.6	1548.6	1548.6
Tyrosine	1515.7	1517.7	1517.7	1516.8	1516.8	1516.8	1516.8
Déformation CH	1454.1	1454.0	1453.1	1454.0	1454.0	1454.1	1454.1
Déformation CH <sub>3</sub>	1346.0	1346.1	1346.1	1346.1	1346.1	1346.1	1346.1
Amide III	1288.0	1286.3	1287.3	1287.0	1287.0	1288.0	1288.2

que Surewicz et al., 1987; Parker, 1983; Glaeser et al., 1991; Menikh, 1994 ont observé un tel phénomène au cours de leurs travaux. Quant aux fréquences des bandes de déformation CH, de CH<sub>3</sub> et de la bande amide III, celles-ci restent stables quand on augmente la concentration de Cholestérol entre 0.01 à 20 mM.



### 5.6.2. Effets sur la structure du PSII

À la figure 5.25 de la différence de spectrale, on remarque que le cholestérol se lie avec les particules du PSII à travers des interactions. On remarque des interactions faibles à  $1738\text{ cm}^{-1}$  pour les concentrations entre 0.01 mM et 10 mM, et à  $1739\text{ cm}^{-1}$  pour la concentration de 20 mM. D'autres interactions faibles s'observent à  $1547\text{ cm}^{-1}$ , et  $1548\text{ cm}^{-1}$  pour ces mêmes concentrations. L'interaction à  $1512\text{ cm}^{-1}$  s'observe seulement pour une concentration de 0.01 mM. La même interaction s'observe à  $1514\text{ cm}^{-1}$  pour les autres concentrations, de même que celle à  $1658\text{ cm}^{-1}$ .

Les absorbances négatives à  $1658\text{ cm}^{-1}$  (amide I) indiquent la présence d'une faible interaction entre le groupement C=O de la bande amide I du PSII. Les pics à  $1547$  et  $1548\text{ cm}^{-1}$  indiquent une interaction du cholestérol avec l'amide II comme dans le cas des PAs. Celui à  $1514\text{ cm}^{-1}$  indique une interaction entre les molécules de tyrosine du PSII et le cholestérol comme observé dans le cas des anions et des PAs.

La simulation spectrale de la bande amide I du PSII en présence de concentrations de cholestérol est présentée aux figures 5.26 et 5.27. Cette dernière nous a permis d'observer que la structure en hélice- $\alpha$  diminue en pourcentage avec l'augmentation de la concentration. La diminution en hélice- $\alpha$  confirme une baisse de l'intensité de 50% au niveau de l'amide I, de l'amide II et du groupement carbonyle du lipide qui est due à l'interaction du cholestérol avec le polypeptide et le groupement polaire du lipide à des concentrations entre 5 et

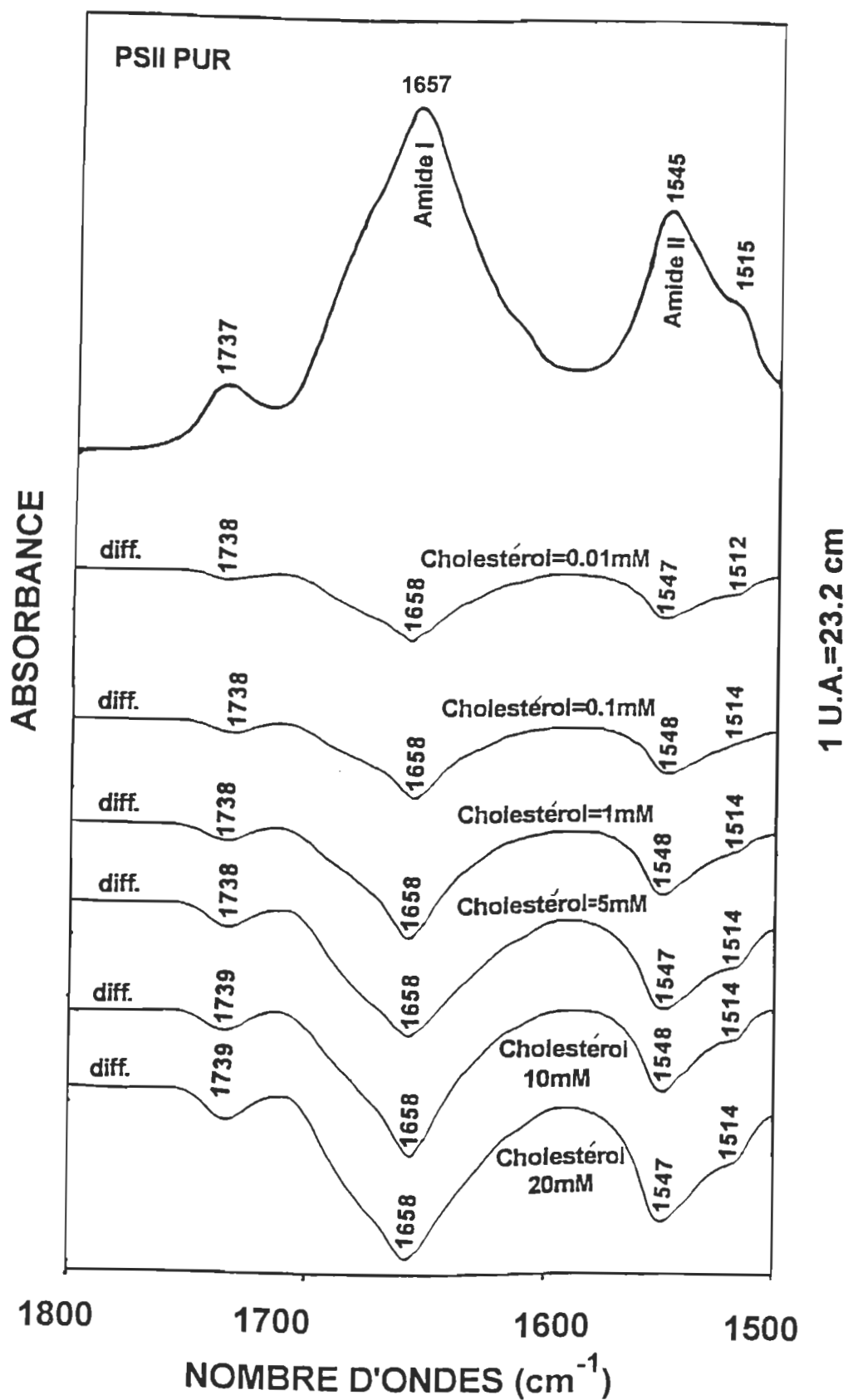


Figure 5.25. Spectre d'absorption FTIR du PSII pur et spectre de différence [(PSII+cholestérol)-(PSII)] en solution aqueuse dans la région de 1800-1500  $\text{cm}^{-1}$ .

**Tableau 5.13.** Effets du cholestérol sur les structures secondaires des protéines du PSII à travers la simulation spectrale entre 1700 et 1612  $\text{cm}^{-1}$  à 0.01, 0.1, 1, 10, et 20 mM de concentration.

Composants de l'amide I ( $\text{cm}^{-1}$ )	Conformation	(%) de conformation PSII (pur)	(%) de conformation cholestérol (mM)					
			0.01	0.1	1	5	10	20
1657	hélice- $\alpha$	(47 $\pm$ 1)	43	42	41	40	39	39
1626-1640	feuillet- $\beta$	(11 $\pm$ 0.4)	14	15	15	15	16	17
1641-1648	random	(16 $\pm$ 0.5)	15	15	15	16	16	17
1670-1678	coude	(19 $\pm$ 0.5)	20	20	20	20	20	20
1685-1691	$\beta$ -antiparallèle	(7 $\pm$ 0.2)	8	8	9	9	9	9

20 mM. Le tableau 5.13 montre que la structure en hélice- $\alpha$  qui représente 47% de la bande amide I, perd 8% de sa surface (c'est-à-dire 17% de la surface de la bande amide I) pour les concentrations de 10 et 20 mM de cholestérol. La structure feuillet- $\beta$  qui représente 11% de la protéine pure a subi une augmentation de 5 et 6% de sa surface pour respectivement 10 et 20 mM de cholestérol (figure 5.26 et 5.27).

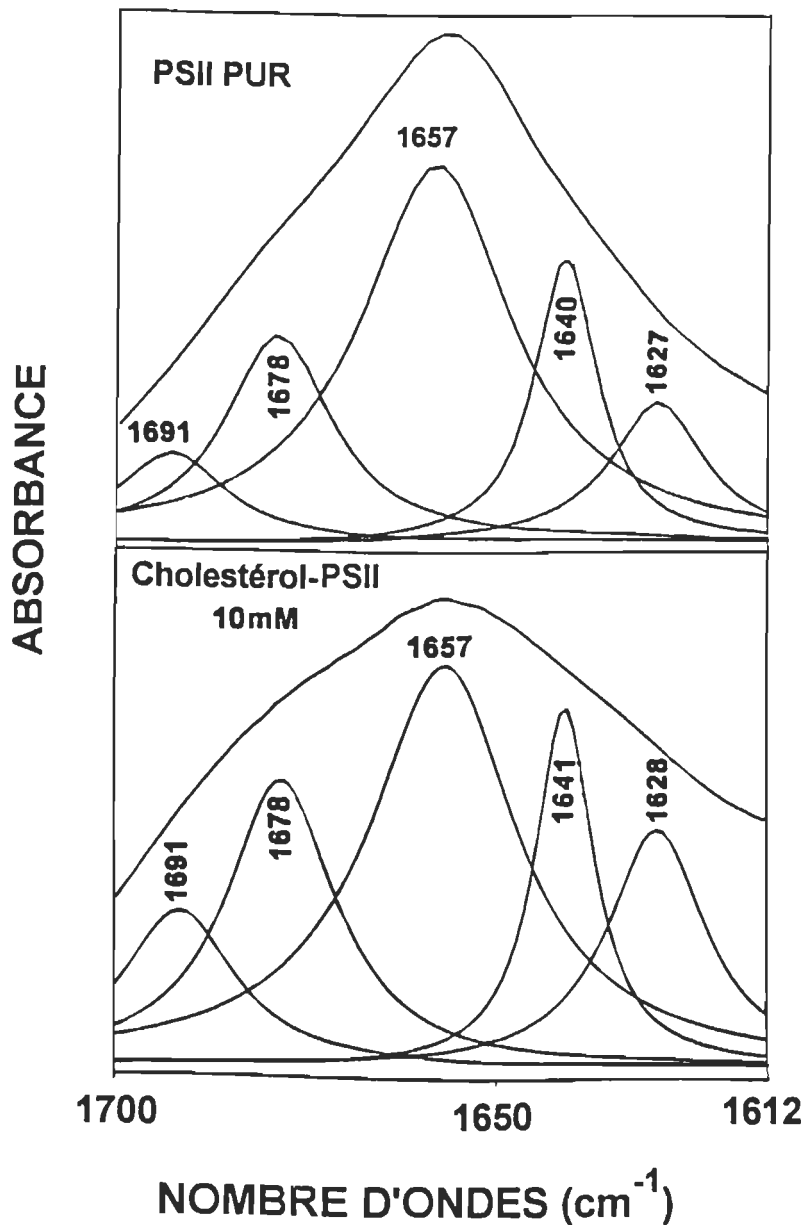


Figure 5.26. Simulation spectrale du PSII pur et des spectres FTIR PSII+cholestérol, 10 mM dans la région de 1700-1612  $\text{cm}^{-1}$ . Pourcentage des structures secondaires (10 mM): hélice- $\alpha$  39%, feuillet- $\beta$  16%, coude 20%, structure non ordonnée (random) 16%, structure  $\beta$ -antiparallèle 9%.

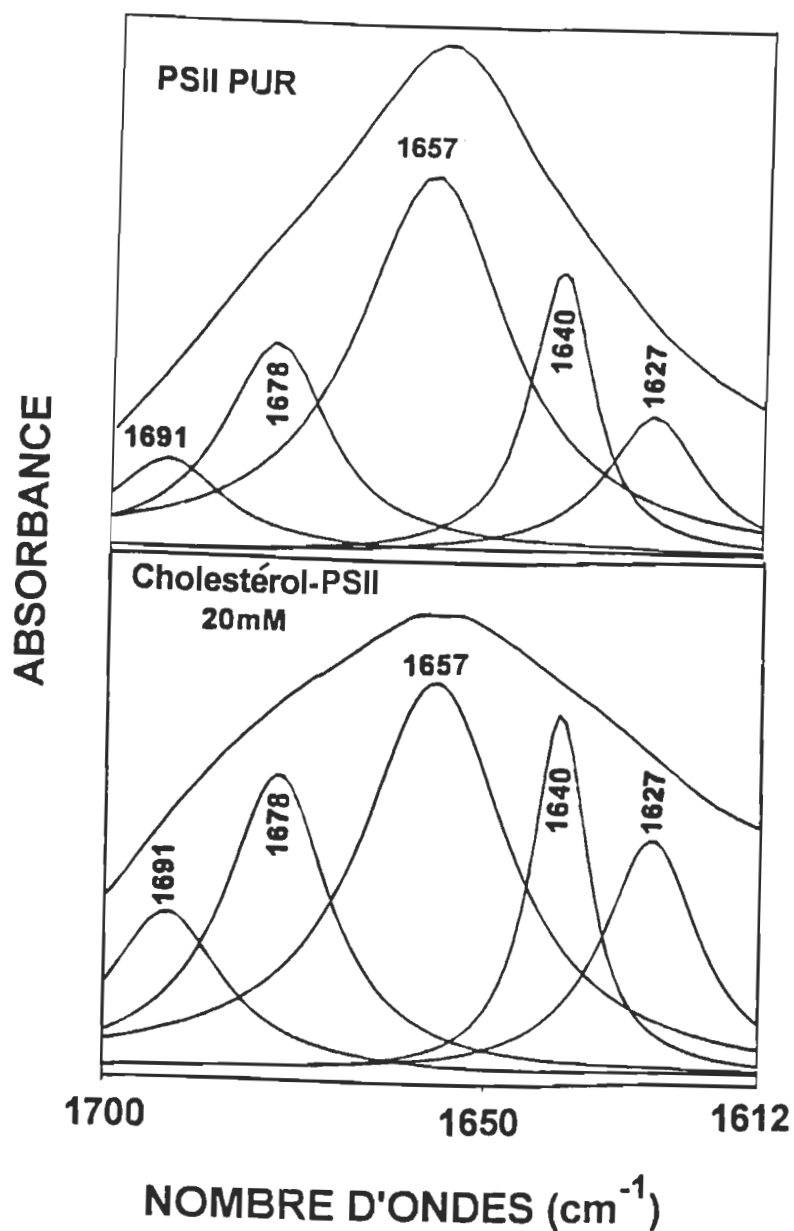


Figure 5.27. Simulation spectrale du PSII pur et des spectres FTIR PSII+cholestérol, 20 mM dans la région de 1700-1612  $\text{cm}^{-1}$ . Pourcentage des structures secondaires (20 mM): hélice- $\alpha$  37%, feuillet- $\beta$  17%, coude 20%, structure non ordonnée (random) 17%, structure  $\beta$ -antiparallèle 9%.

### 5.6.3. Effets sur le dégagement d'oxygène du PSII

De la même façon qu'en (FTIR), l'inhibition du dégagement d'oxygène du PSII par le cholestérol dans les pourcentages varie entre 8% et 33% pour des concentrations entre 0.01 et 20 mM. Au tableau 5.14, nous remarquons que l'inhibition augmente avec la concentration pour se situer autour de 38% pour les concentrations situées entre 10 et 20 mM. Nous remarquons que le cholestérol peut aussi provoquer une inhibition du dégagement d'oxygène au niveau du PSII des végétaux supérieurs.

**Tableau 5.14.** Pourcentage de l'inhibition du dégagement d'oxygène du centre réactionnel du PSII en présence de cholestérol à 0.01, 0.1, 1, 10, et 20 mM de concentration.

Concentrations (mM)	0.01	0.1	1.0	5.0	10.0	20.0
% d'inhibition causé par cholestérol	8.0	13.0	14.0	23.0	31.0	33.0

### 5.7. Discussion des résultats obtenus

En observant les spectres des complexes, on remarque des déplacements de bandes. Ces déplacements de bandes deviennent importants lorsque le PSII est traité avec une concentration importante des substances. On a pu observer

que les anions telles que le  $\text{Cl}^-$ , le  $\text{Br}^-$  n'affectent pas la structure des particules du PSII, tandis que les anions  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{I}^-$ ; la Spm, la Spd, et le cholestérol, affectent les structures secondaires du PSII à partir de certaines concentrations.

Les résultats obtenus avec la méthode de dégagement d'oxygène nous font remarquer comme en spectroscopie FTIR, que les anions tels que  $\text{Cl}^-$ , le  $\text{Br}^-$  n'affectent pas le dégagement d'oxygène du PSII entre 0.01 et 20 mM. Tandis que les autres anions  $\text{I}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ , les PAs, et le cholestérol affectent le dégagement d'oxygène entre 0.01 et 20 mM. Parmi ces substances, ce sont les PAs qui affectent plus la structure et la fonction du PSII suivis du cholestérol. Parmi les PAs utilisés, c'est la Spm qui affecte le plus la fonction de dégagement d'oxygène.

Lors des changements de conformation des protéines du PSII, nous remarquons de façon générale, que le pourcentage de la sous-structure hélice- $\alpha$  diminue au profit des autres sous-structures telles que les feuillet- $\beta$ , les  $\beta$ -antiparallèle, les structures en coude et les random. Ce sont les changements des sous-structures qui provoquent les changements des structures du PSII elles-mêmes et par conséquent provoquent l'inhibition du PSII. En présence de 20 mM de NaI la structure hélice- $\alpha$  perd 4% de la surface totale. En présence de cette même concentration en  $\text{NaNO}_3$ , elle perd 3% de cette même surface (voir tableaux 5.6, 5.10, 5.13). Avec les PAs cette surface diminue de 12% avec la Spm, de 10% avec la Spd et de 8% avec le cholestérol. Les erreurs déterminées sur ces valeurs pourraient être dues aux conditions expérimentales.

### 5.7.1. Méthode spectroscopie infrarouge FTIR

Comme nous venons de l'observer, les anions  $I^-$ ,  $NO_3^-$ , les PAs et cholestérol ont donc un effet important sur le PSII. Les tableaux, 5.3, 5.4, 5.8, 5.9, et 5.12 résument les effets respectifs des anions inorganiques, PAs, et du cholestérol sur les fréquences des différents modes de vibration du complexe PSII-PAs. Quand on observe la région de  $1800-1500\text{ cm}^{-1}$  des figures 5.5, 5.7, 5.9, 5.11, 5.16, 5.18, et 5.17, on remarque un déplacement des fréquences des bandes en présence de ces substances.

Les déplacements des fréquences des bandes amide I et amide II sous l'effet des concentrations des anions inorganiques, des PAs et de cholestérol, nous permettent d'affirmer que des perturbations ont lieu au niveau des protéines du PSII. Ces perturbations se traduisent en terme de changements de conformation observés sur les spectres de différence à des concentrations. Ces concentrations sont autour de 0.1 mM pour les PAs, de 5 mM pour le cholestérol, et de 20 mM pour les anions inorganiques  $NO_3^-$  et le NaI.

À travers la méthode de différence des spectres, on remarque aussi que les anions inorganiques, les PAs, et le cholestérol interagissent avec les protéines du PSII. Ces interactions renforcent certaines liaisons hydrogènes et affaiblissent d'autres liaisons hydrogènes existantes. Cela entraîne la modification structurale des polypeptides du PSII. Dans le cas du cholestérol, le changement de conformation peut être dû à un encombrement stérique que provoque le cholestérol au niveau des protéines du PSII.



Avec la simulation spectrale, nous avons observé la diminution en pourcentage de la structure en hélice- $\alpha$  et l'augmentation des autres sous-structures (feuillet- $\beta$ , coude et  $\beta$ -antiparallèle) pour les grandes concentrations. Ce résultat est semblable à celui observé par Glaeser et al., 1991 dans une étude similaire des protéines avec la lumière blanche. Selon Glaeser et al., la structure secondaire des protéines du centre réactionnel du PSII est affectée par la lumière blanche.

Nos résultats à peu près les mêmes que ceux déjà obtenus au cours des études antérieures sur l'interaction lipide-protéine dans les biocouches et liposomes. Il a été montré qu'à la suite de leurs complexation avec les lipides, plusieurs peptides biologiquement actifs subissent des changements de conformation importants allant de structures désordonnées à des structures ordonnées (principalement en hélice- $\alpha$ ); (Kaiser et al., 1987; Demel et al., 1990). Il y a eu d'autres études sur la dénaturation des protéines en milieu acide à température élevées qui ont montré que ces protéines manifestent dans de telles conditions, des changements conformationnels marqués de structure en hélice- $\alpha$  à des structures de type  $\beta$  (Parker, 1983).

### **5.7.2. Méthode de dégagement d'oxygène**

L'utilisation de la méthode du dégagement d'oxygène dans ce travail nous a permis de constater que les anions inorganiques tels que  $\text{Cl}^-$ , et  $\text{Br}^-$  n'ont pas d'effets sur le PSII. Ceux-ci stimulent probablement l'activité photosynthétique du dégagement d'oxygène du PSII. Ceci confirme les travaux de Bernier et al., 1993

selon lesquels le  $\text{Cl}^-$  est primordial à l'activité optimal du CDO. Les ions  $\text{Cl}^-$  pourraient organiser les protéines du PSII en un système stable (Govindjee et Coleman, 1990). Dans le cas des deux autres anions, des PAs et du cholestérol, inhibition de l'activité photosynthétique augmente avec la concentration.

On peut donc penser que les anions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Br}^-$  favorisent l'activité photosynthétique du PSII. Avec les autres substances, nous avons remarqué que lors des changements de conformation des structures du PSII, l'inhibition du dégagement d'oxygène augmente considérablement. Dans le cas des anions ( $\text{NO}_3^-$  et  $\text{I}^-$ ) l'inhibition est de 38% pour  $\text{NO}_3^-$  et de 77% pour  $\text{I}^-$ , pour 20 mM de concentration. Dans le cas des polyamines, elle est de 100% dans les deux cas pour 20 mM de concentration; de 74% dans le cas de la Spm et de 6.3% dans le cas de la Spd, pour 0.1 mM de concentration. Dans le cas du cholestérol, le pourcentage d'inhibition est de 33% pour une concentration de 20 mM. A partir de notre investigation, nous constatons que pour certaines concentrations, les anions tels ( $\text{NO}_3^-$  et  $\text{I}^-$ ), le cholestérol et les PAs induisent des changements de conformations qui inhibent à leur tour la fonction de dégagement d'oxygène (lorsque leurs concentrations deviennent importantes dans le PSII) c'est le cas particulier de la Spm. Donc ces substances tels les PAs peuvent être nuisibles à concentrations élevées (0.1 mM pour la Spm, et 5 mM pour la Spd) pour les protéines secondaires du PSII.

Les effets importants des PAs sur les structures secondaires du PSII sont causés soit par leurs charges positives (trois pour la Spd et quatre pour la Spm) ou soit par leur effet ionique. Effet ionique qui leur confère la liberté d'interagir avec ces protéines (de façon plus importante que les anions inorganiques  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{I}^-$ , ou le

cholestérol). Il se pourrait que les PAs réagissent aussi avec les protéines responsables du dégagement d'oxygène au sein du PSII. C'est-à-dire les protéines de 16 kDa, 23 kDa, et 33 kDa. Dans ces conditions cela serait en accord avec les études déjà effectuées et, selon lesquelles la perte d'activité du dégagement d'oxygène est la conséquence d'une diminution de la concentration des protéines de 16, 23, et 33 kDa responsables de l'activité photosynthétique (Fragata et Menikh, 1994).

Les PAs pourraient aussi réagir avec tout autre composant du PSII. À savoir le complexe de manganèse, les protéines D-1 et D-2, les ions calcium, et/ou les transporteurs d'électrons qui sont le P680, la Phéo, la Q<sub>A</sub>, ou la Q<sub>B</sub>, tout en provoquant des perturbations au sein du PSII.

Au terme de notre investigation on peut donc établir une corrélation entre la structure des protéines et la fonction de dégagement d'oxygène du PSII. On a remarqué que lorsqu'il y a un changement de conformation de la structure du PSII, le pourcentage du dégagement d'oxygène diminue. C'est-à-dire que le changement de conformation entraîne l'inhibition du dégagement d'oxygène. L'effet contraire n'est pas vérifié. C'est-à-dire qu'une inhibition ne se traduit pas forcément en terme de changement de conformation. Dans le cas de la Spm par exemple où on a observé avons une inhibition de 74% alors que les structures secondaires du PSII n'ont pas subies de modifications. Ceci pourrait donc s'expliquer par le fait que la présence en excès de la Spm dans le centre réactionnel du PSII contribue à augmenter l'inhibition du PSII. Nous pouvons donc dire que l'inhibition du PSII due aux substances utilisées est liée au changement de conformation. C'est donc le changement de conformation qui induit une

désorganisation de l'architecture des protéines du PSII. Dans le cas des PAs (précisément avec la Spm), on a remarqué qu'une concentration d'environ 0.01 mM empêche dans un premier temps le dégagement d'oxygène. Par la suite, quand cette concentration augmente, on observe une désorganisation des protéines du PSII. Il peut avoir inhibition sans changement de conformation ni de structure.

Les spectres des anions inorganiques, des PAs et du cholestérol utilisés dans ce travail n'ont pas été inclus dans le texte pour deux raisons. Primo, ils n'ont pas de bandes dans la zone étudiée. Ils n'influencent pas donc cette zone. Secundo, ils n'ont pas été inclus parce qu'ils surchargeraient le texte.

## CHAPITRE VI

### CONCLUSION

Dans cette étude, nous avons pu établir une corrélation entre la structure et la fonction de dégagement d'oxygène du centre réactionnel du PSII. Pour y arriver faire, nous avons utilisé la spectroscopie (FTIR) et la méthode de dégagement d'oxygène. Ces deux méthodes d'analyse nous ont fourni de très bons résultats. Avec la spectroscopie FTIR, nous avons utilisé trois techniques. Ces techniques sont: la différence de spectres, la dérivée seconde et la simulation spectrale. La différence de spectres nous a permis d'observer les interactions entre le PSII et les complexes, déplacements des bandes sous l'effet des substances utilisées, et les changements de conformations intervenus dans le PSII. La dérivée seconde nous a permis de localiser les maxima des bandes secondaires (structures secondaires) de la bande amide I, bande très sensible pour l'analyse des protéines. Enfin, la simulation spectrale nous a permis de quantifier en pourcentage les structures secondaires de la bande amide I du PSII natif sous forme de surfaces (Byler et Susi, 1986). Nous avons fait la même chose pour la bande amide I du PSII traité de chaque échantillon. Après analyse quantitative, nous avons constaté les variations des surfaces.

Nous avons constaté que les anions inorganiques ( $\text{NO}_3^-$  et  $\text{I}^-$ ), les polyamines (Spm et Spd), et le cholestérol établissent des interactions beaucoup plus importantes que les anions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Br}^-$ . Ces mêmes substances ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{I}^-$ , Spm,

Spd, et le cholestérol) provoquent des changements de conformation aux protéines du PSII à des concentrations (entre 0.01 et 20 mM). Dans le cas des anions tels  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{I}^-$ , le changement de conformation commence à partir de 20 mM. Dans le cas de la Spm; elle commence autour de 1 mM. Dans le cas de la Spd, elle commence à partir de 1 mM. Finalement dans le cas du cholestérol, elle commence autour de 0.01 mM, tandis que les anions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Br}^-$  ont tendance à ne pas affecter ni les structures ni la fonction de dégagement d'oxygène.

La simulation spectrale nous a permis de constater lors des changements de conformations des protéines du PSII, qu'il y a un changement de structure qui se produit. Ce changement affecte la structure en hélice- $\alpha$ . La surface de cette structure subit une baisse considérable en terme de pourcentage tandis que sous-structures qui sont le coude- $\beta$ ,  $\beta$ -antiparallèle, le feuillet- $\beta$  et la structure non ordonnée (random) ont leurs surfaces qui augmentent. Cette baisse de la structure en hélice- $\alpha$  varie en fonction des substances et des concentrations utilisées.

La structure en hélice- $\alpha$  a perdu environ 3% de sa surface en présence de 20 mM de  $\text{NO}_3^-$  et 4% en présence de cette même concentration en  $\text{I}^-$ . On a constaté que quand cette perte se fait, les autres structures en feuillet- $\beta$  et  $\beta$ -antiparallèle ont leurs surfaces qui augmentent. La même structure en hélice- $\alpha$  a perdu environ 12% et 10% de sa surface en présence respectives de 20 mM de Spm et de Spd au profit des structures feuillet- $\beta$  et  $\beta$ -antiparallèle. Dans le cas du cholestérol, la structure en hélice- $\alpha$  a perdue environ 8% tandis que celles des sa surfaces au profit des structures en feuillet- $\beta$  ( $\beta$ -sheet) et en  $\beta$ -antiparallèle.

Nous avons constaté qu'une augmentation de la concentration d'anions inorganiques ( $I^-$  et  $NO_3^-$ ), de polyamines (Spm et Spd), et de cholestérol entraîne une augmentation du pourcentage d'inhibition du dégagement d'oxygène qui peut atteindre 100% selon les cas (voir tableaux 5.7). La modification des protéines au sein du PSII entraîne une inhibition importante fonction de dégagement d'oxygène. Dans le cas du  $NO_3^-$  et du  $I^-$ , on pourrait croire que leur interaction avec les charges des protéines entraîne une désorganisation de l'architecture moléculaire du PSII. On pense donc que l'anion  $I^-$  interagirait avec la tyrosine en provoquant l'inhibition du dégagement d'oxygène (Papageorgiou et Lagoyanni, 1991; Bograh et al., 1996). Cet anion pourrait aussi empêcher la tyrosine de céder un électron lors du transfert d'électrons. Quant au  $NO_3^-$ , nous ne savons pas exactement de quelle façon il établit les interactions avec les protéines du PSII. Mais nous pensons que cet anion pourrait interagir avec d'autres protéines du PSII pour provoquer l'inhibition du dégagement d'oxygène. Une étude plus poussée avec une autre méthode d'analyse pourrait permettre de mieux comprendre le type d'interaction qu'il établit avec les protéines du PSII.

Quant à l'effet des polyamines sur le changement de conformation, il pourrait être dû à leur effet ionique. Cet effet ionique peut leur permettre d'interagir fortement avec les protéines du PSII (Cabane et al., 1981; Grimes et al., 1986; Srivastava et Smith, 1982). Les charges positives des polyamines (qui sont 4 dans le cas de la Spm et 3 dans le cas de la Spd) pourraient aussi être la cause des interactions avec les protéines du PSII. Ces charges leur confèrent une grande liberté d'interaction avec les liaisons peptidiques des protéines du PSII. Il pourraient soit provoquer l'enlèvement des protéines extrinsèques du PSII

responsables du dégagement d'oxygène, ou en modifier l'organisation structurale des autres protéines du PSII.

Dans le cas du cholestérol, nous pouvons dire que c'est son encombrement stérique dans les membranes qui provoque une désorganisation des protéines du PSII qui, à leur tour provoque l'inhibition du dégagement d'oxygène.

Pour le moment, nous pouvons aussi dire que la perte d'activité du dégagement d'oxygène pour des concentrations élevées est la conséquence d'une diminution de la concentration des protéines de 16, 23, et 33 kDa responsables de l'activité photosynthétique (Fragata et Menikh, 1994). Cela a également été observé dans les membranes préformées avec les phospholipides. Dans ce cas, cette perte d'activité a été attribué à l'inhibition du transport d'électrons dans les travaux de Miller et al., (1983) et par une perte d'activité du dégagement d'oxygène dans les travaux de Fragata et al., (1994).

Avec les deux méthodes d'analyse utilisées, nous avons donc établi une corrélation entre la structure des protéines du PSII et sa fonction de dégagement d'oxygène. Nous avons constaté que le changement de conformation induit une inhibition du dégagement d'oxygène. Par contre, on constaté qu'une inhibition ne se traduit pas forcément en terme de changement au niveau du PSII. Cet constat nous laisse croire que le changement de conformation dans certains cas induit une désorganisation de l'architecture des protéines du PSII qui inhibe le dégagement d'oxygène. Les résultats obtenus montrent qu'il y a une relation entre les liaisons établies, le changement de conformation et certainement le transfert des électrons au niveau du PSII. Car lorsqu'il y a un changement de



conformation, il y a une inhibition du dégagement d'oxygène mais l'effet contraire n'est pas vérifié (cas de la Spm à 0.1 mM).

À travers cette étude, nous comprenons que l'excès des concentrations des substances telles la Spm et la Spd qui en concentration normales régularisent les activités physiologiques des végétaux supérieurs, inhibe le dégagement d'oxygène du PSII. L'étude des effets du cholestérol au niveau du PSII, nous révèle aussi que le cholestérol peut nuire au PSII.

En nous appuyant sur les résultats mentionnés ci-dessus, nous proposons qu'une étude à l'aide de l'électrophorèse soit effectuée avec une autre méthode d'analyse dans le but d'observer les effets des anions inorganiques ( $\text{NO}_3^-$  et  $\text{I}^-$ ), des polyamines (Spm et Spd), et du cholestérol sur les protéines du PSII. Ce qui pourrait nous permettrait de savoir si l'action de ces substances sur le PSII provoque l'enlèvement d'une ou de plusieurs protéines du complexe de dégagement d'oxygène ou des autres protéines. On comprendrait davantage le mécanisme de l'action des substances sur les protéines du PSII.

## BIBLIOGRAPHIE

**Ahmed, Abdelwahab, I.** Proteine secondary structure of the isolated photosystem II (PSII) particles and light-harvesting complex (LHCII) studied by Fourier Transform infrared spectroscopy. *Thèse de Doctorat.*, 1996.

**Ahmed, A., & Tajmir-Riahi, H.-A.** Interaction of Toxic Metal Ions  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ , and  $\text{Pb}^{2+}$  with Light-Harvesting Proteins of Chloroplast Thylakoid Membranes. An FTIR Spectroscopic Study. *J. Inorg. Biochem.*, 1993, 50, 235-243.

**Allakhverdiev, S. I., Ahmed, A. Tajmir-Riahi, H.-A., Klimov, V. V., & Carpentier, R.** Ligth-induced Fourier transform infrared spectrum of the cation radical  $\text{P680}^+$ . *FEBS Lett.*, 1994, 339, 151-154.

**Allakhverdiev, S. I., Vyacheslav, V. K., & Carpentier, R.** Evidence for the Involvement of Cyclic Electron Transport in the Protection of Photosystem II against Photoinhibition: Influence of a New Phenolic Compound. *Biochem.*, 1997, 36, 14.

**Allen, J. F.** How does protein phosphorylation regulate photosynthesis? *Trends Biochim. Biophys. Sci.*, 1992, 17, 12-17.

**Alvarez, J. Haris, P. I. Lee, D. C., & Chapman, D.** Conformational changes in concanavalin A associated with demetallization and  $\alpha$ -methymannose binding studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochem. Biophys. Acta*, 1987, 1916, 5-12.

**Anderson, J. M., & Melis, A.** Heterogeneity of photosystem II in spinach thylakoids. Dans: *The oxygen evolving system of photosynthesis*, Inoue Y., Crofts A. R., Govindjee, Murata N., Renger G., Satoh K. (Eds), Academic Press, London, New York, 1983, 273-280.

**Andersson, B., Critchchlorophylleey, C., Ryrie, I. J., Jansson, C., Larsson, C., & Anderson, J. M.** Modification of the chloride requirement for photosynthetic  $\text{O}_2$  evolution. The role of the 23 kDa polipeptide. *FEBS Lett.*, 1984, 168, 113-117.

**Andersson, B.** Proteins participating in photosynthetic water oxidation. Dans: *Encyclopedia of Plant of Plant Physiology*, New Series, Édés par L. A. Staehelin et C. J. Arntzen, Springer-Verlag, Berlin, 1986, 19, 447-456.

**Andreas, B., Werner, K., & Werner, M.** Changes of protein structure, nucleotide microenvironment, and  $\text{Ca}^{2+}$ -binding states in the catalytic cycle of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase investigation of nucleotide binding, phosphorylation and phosphoenzyme conversion by FTIR difference spectroscopy. *Bioch. Biophys. Acta*, 1994, 75-91.

**Arnon, D. I.** Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenyloxidase in beta vulgaris. *Plant Physiol.*, 1949, 14, 1-15.

**Arnon, D. I.** Photosynthetic  $\text{CO}_2$  assimilation by chloroplasts: Assertion, refutation, discovery. *Trends Biochem. Sci.*, 1987, 12, 39-42.

**Arntzen, C. J., & Pakrasi, H. B.** Photosystem II reaction center: polypeptide subunits and functional cofactors. Dans: *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, Édité par: L. A. Staehelin et C. J. Arntzen, Springer-Verlag, Berlin, 1986, 457-467.

**Bandekar, J.** Amide modes and protein conformation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, 1120, 123-143.

**Barber, J.** Surface electrical charges and protein phosphorylation. Dans: *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, Édité par L. A. Staehelin et C. J. Arntzen, Springer-Verlag, Berlin, 1986, 653-664.

**Barber, J.** Photosynthetic reaction centres: a common link. *Trends Biochem. Sci.* 1987, 12, 321-326.

**Beigbeder, A., & Kotzabasis K.** The influence of exogenous supplied spermine on protochlorophyllide and chlorophyll biosynthesis. *J. Photobiol. B: Biol.*, 1994, 23, 201-206.

**Bellamy, L. J.** The infrared spectra of complex molecules. Troisième édition, Publiée par *Chapman et Hall Ltd*, Halsted Press, New York, 1975.

**Benevides, M. James, Thomas C. Terwilliger, Stanislav Vohík., & Georges J. Thomas, Jr.** Raman Spectroscopy of the Ff Gene V Protein and Complexes with Poly (dA): Nonspecific DNA Recognition and Binding. *Biochemistry*, 1996, 35, 9603-9609.

**Berthold, D. A., Babcock, G. T., & Yocum, C. F.** A highly resolved oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes. *FEBS Lett.*, 1981, *134*, 231-234.

**Berthomieu, C., Boussac, A., Mäntele, W., Breton, J., & Navedryk, E.** Molecular changes following oxidoreduction of cytochrome b-559 characterized by Fourier transform infrared difference spectroscopy and electron paramagnetic resonance: Photooxidation in photosystem II and electrochemistry of isolated cytochrome b-559 and iron protoporphyrin IX-bisimidazole model compounds. *Biochemistry*, 1992, *31*, 11460-11471.

**Blubaugh, D. J., Cheniae, G. M.** *Biochemistry* 1990, *29*, 5109-5118.

**Bograh, A., Carpentier R., & Tajmir-Riahi, H. A.** The effects of inorganic anions Cl, Br, I and NO<sub>3</sub> on the solution structure of proteins of photosystem II. Metal Ions in Biology and Medicine; Dds. Ph. Collery, J. Corbella, J. L. Domingo, J. C. Etienne, J. M. Llobet. *John Libbey Eorotex*, Paris, 1996, 91-93.

**Bograh, A., Gingras Y., Tajmir-Riahi, H. A., & Carpentier R.** The effects of spermine and spermidine on the solution structure of proteins of PSII in relation to inhibition of electron transport. *FEBS Lett.*, 1997, *402*, 41-44.

**Byler, D. M., & Susi, H.** Examination of secondary structure of proteins by deconvoluted FTIR spectra. *Biopolymers*. 1986, *25*, 469-487.

**Cabane, F., Dalebroux, M. A., Martin-Tanguy, J., & Martin, C.** Hydroxy cinnamic-acid amides and ripening to flower of *Nicotiana tabacum* cultivar Xanthi N. C. *Physiol. Plant.* 1981, *53*, 399-404.

**Camm, E. L., & Green, B. R.** Fractionation of thylakoid membranes with the nonionic detergent octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside. *Plant Physiol.*, 1980, *66*, 428-432.

**Camm, E. L., & Green, B. R.** Isolation of PSII reaction centre and its relationship to the monir chlorophyll-protein complexes. *J. Cell. Biochem.*, 1983, *23*, 171-179.

**Chapados, C.** Infrared study of the C-H stretching bands of chlorophylleorophyll a and of chlorophylleorophyll b in monolayers. *Biophys. Chem.*, 1985, *21*, 227-242.

**Chapados, C., Beliveau, J., Trudel, M., & Levesque, C.** Comparison of resolution enhancement by different computer technique of the chlorophylleorophyll carbonyls. *Appl. Spectrosc.*, 1986, *40*, 773-738.

**Chapados, C., Lemieux, S., & Carpentier, R.** Infrared study of a photosystem II submembrane preparation. *Curr. Res. Photosynth.*, 1990, *1*, 343-346.

**Chapados, C., Lemieux, S., & Carpentier, R.** Protein and chlorophylleorophyll in photosystem II probed by infrared spectroscopy. *Biophys. Chem.*, 1991, 39, 225-239.

**Chapel, M., Teissie, A. J., & Alibert G.** Electrofusion of spermine treated plant protoplasts. *FEBS Lett.*, 1984, 173, 331-336.

**Chavanne, M., Beaudoin, G. J., Julien, A., & Flamand, E.** Chimie organique expérimentale. Préface de Odermatt G. et Tanielian C. Deuxième édition, 1991. *Modulo Éditeur*, Québec, Canada.

**Chirgadze, Y. N., Fedorov, O. V., & Trushina, N. P.** Estimation of amino acid residue side-chain. Absorption in the infrared spectra of protein solution in heavy water. *Biopolymers*, 1975, 14, 679-694.

**Critchlorophylleey, C.** The role of chloride in photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, 811, 33-46.

**Darnell, J., Lodish, H., & Baltimore, D.** Biologie moléculaire de la cellule. Deuxième édition, *De Boeck University*, 1993.

**Debus, R. J.** The manganese and calcium ions of photosynthetic oxygen evolution. *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, 1102, 269-352.

**De Las Rivas, J., & Barber, J.** Structure and thermal stability of photosystem II reaction center studied by infrared spectroscopy. *Biochemistry*, 1992, 36, 8897-8903.

**Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., & Michel, H.** X-Ray structure analysis of a membrane protein complex. *J. Mol. Biol.*, 1984, 180, 385-398.

**Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., & Michel, H.** Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction center of *Rhodospseudomonas Viridis* at 3 Å resolution. *Nature*, 1985, 318, 618-624.

**Delieu, T., & Walker, D. A.** An improved cathode for the measurement of photosynthetic oxygen evolution by isolated chloroplasts. *New Phytol.*, 1972, 71, 201-225.

**Demel, R. A., Goormaghtigh, E., & De Kruijff, B.** Lipid and peptide specificities in signal peptide-lipid interactions in model membranes. *Biochem. Biophys. Acta*, 1990, 1027, 155-162.

**Diner, B.** The reaction center of photosystem II. Dans: *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, Édité par L. A. Staehelin et C. J. Arntzen, Springer-Verlag, Berlin, 1986, 422-436.

**Dong, A., Huang, P., & Caughey, W. S.** Protein secondary structures in water from second-derivative amide I infrared spectra. *Biochemistry*, 1990, 29, 3303-3308.

**Dong, A., Huang, P., & Caughey, W. S.** Redox-dependent changes in  $\beta$ -extended chain and turn structures of cytochrome c in water solution determined by second derivative amide I infrared spectra. *Biochemistry*, 1992, 31, 182-189.

**Dousseau, F., & Pézolet, M.** Determination of secondary structure content of proteins in aqueous solutions from their amide I and amide II infrared bands. Comparison between classical and partial least-squares methods. *Biochemistry*, 1990, 29, 8771-8779.

**Doyle, B. B., Bendit, E. G., & Blout, E. R.** Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides. *Biopolymers*, 1975, 14, 937-957.

**Elizabeth, S.** Le cholestérol et l'alimentation. *Éds du Trécarré*, St Laurent, Québec, Canada, 1991.

**Fabian, H., Naumann, D., Misselwitz, R., Ristau, O., Gerlach, D., & Welfe, H.** Secondary structure of streptokinase in aqueous solution: A Fourier transform infrared spectroscopic study. *Biochemistry*, 1992, 31, 6532-6538.

**Flink, L., & Pettijohn, D. E.** Polyamines stabilize DNA folds. *Nature*, 1975, 253, 62-63..

**Förtsten, T.** Delocalized excitation and excitation transfert. In O. Sinanoglu (Ed). *Modern Quantum Chemistry*. New York: *Academic Press*, 1965, 3, 93-137.

**Foyer, C. H., Noctor, G., Lelandais, M., Lescur, J. C., Valadier, M. H., Boutin, J. P., & Horton, P.** Short-term effects of nitrate, nitrite and ammonium assimilation on phosphorylation in maize. *Planta*, 1994, 192, 211-220.

**Fragata, M., Nénonéné, E. K., Bellemare, F., Champagne, N., & Dupont, I.** Characterization of oxygen evolution activity of low molecular mass photosystem II preparation from barley and spinach isolated by gel chromatography. *Photosynthetica*, 1990, 24, 249-256.

**Fujiwara, M., & Tasumi, M.** Resonance raman and infrared studies on axial coordination to chlorophylls a and b in vitro. *J. Phys. Chem.*, 1986, 90, 250-255.

**Genzel, L., Santo, L., & Shen, S. C.** Far-infrared spectroscopy of biomolecules. Dans: *Spectroscopy of biological molecules*, C. Sandorfy et T. Theophanides (eds), D. Reidel Publishing Company, 1984, 609-619.

**Ghanotakis, D. F., Babcock, G. T., & Yocum, C. F.** Calcium reconstitutes high rates of oxygen evolution in polypeptide depleted photosystem II preparations. *FEBS Lett.*, 1984, 167, 127-130.

**Ghanotakis, D. F., Babcock, G. T., & Yocum, C. F.** On the role of water-soluble polypeptides (17, 23 kDa), calcium and chloride in photosynthetic oxygen evolution. *FEBS Lett.*, 1985a, 192, 1-3.

**Ghanotakis, D. F., & Yocum, C. F.** Polypeptides of photosystem II and their role in oxygen evolution. *Photosynthesis Res.*, 1985b, 7, 97-114.

**Ghanotakis, D. F., & Yocum, C. F.** Photosystem II and the oxygen-evolving complex. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1990, 41, 255-276.

**Gingras, Y., Harnois, J., Ross, G., & Carpentier, R.** Inhibition of oxygen evolution in chloroplast photosystem II by the protein-modifying agent tetranitromethane. *Photochem. Photobiol.*, 1995, 183-189.

**Glaeser, R. M., Downing, K. H., & Jap, B. K.** What spectroscopy can still tell us about the secondary structure of bacteriorhodopsin. *Biophys. J.*, 1991, 59, 934-938.

**Golbeck, J. H.** Structure, function and organisation of photosystem I reaction center complex. *Biochim. Biophys. Acta*, 1987, 895, 167-204.

**Goormaghtigh, E., Cabiaux V., & Ruyschaert J. M.** Secondary structure and dosage of soluble and membrane proteins by attenuate total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy on hydrated films. *Eur. J. Biochem.*, 1990, 193, 409-420.

**Govindjee, K. T., & Coleman, W.** The electron donor side of photosystem II: The oxygen evolving complex. *Photochem. Photobiol.*, 1985, 42, 187-210.

**Govindjee, K. T., & Coleman, W.** La production d'oxygène par les plantes. *Pour la science*, 1990, 150, 42-49.

**Govindjee, K. T., & Homann, P. H.** In *Highlights of Modern Biochemistry* (Kotyk, A., Skoda, J., Paces, V., and Kostka, V., Eds.), 1989, 961-963.

**Gregory, R. P. F.** Biochemistry of Photosynthesis, Troisième édition, A. Wiley Inter Science Publication, *John Wiley et Sons*, 1989, 98-121.

**Grimes, H. D., Slocum, R. D., & Boss, W. F.**  $\alpha$ -Difluoromethylarginine treatment inhibits protoplast. *Biochim. Biophys. Acta*, 1986, 886, 130-134.

**Hamon, M. F. P., Guernet, M., & G. Mahuzier.** Chimie analytique. Méthodes spectrales et analyse organique. Tome 3. Deuxième édition révisée et augmentée. *Masson*. Paris, Milan, Barcelone, Mexico, 1990.

**Hansson, Ö., & Wydrzynski, T.** Current perceptions of photosystem II. *Photosynthesis Res.*, 1990, 23, 131-162.

**He, W-Z., Newell, W. R., Haris, P. I., Chapman, D., & Barber, J.** Protein secondary structure of isolated photosystem II reaction center and conformational changes studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry* 1991, 30, 4552-4559.

**Heller R., Esnault R., & Lance C.** Physiologie Végétale. Tome 1, Nutrition. Cinquième édition mise à jour et augmentée. *Masson*. Paris, Millan, Barcelone, 1993.

**Heller R.; Esnault R.; & Lance C.** Physiologie Végétale. Tome 2, Nutrition 5e édition mise à jour et augmentée. *Masson*. Paris, Millan, Barcelone, 1995.

**Hooper, J. K.** Chloroplasts, Y. Inoue, (eds). *Plenum Press*, New York, 1984, 20-89.

**Horvath, G., Melis, A., Hideg, E., Droppa, M., & Vigh, L.** Role of lipids in the organization and function of hydrogenation of thylakoid membranes in situ. *Biochim. Biophys. Acta*, 1987, 891, 68-74.

**Horvath, G., Droppa, M., Hideg, E., Rozsa, Z., & Farkas, T.** The role of phospholipids in regulating photosynthetic electron transport activities: treatment of chloroplasts with phospholipase A<sub>2</sub>. *J. Photochem. Photobiol.*, 1989, 3, 515-527.

**Ikeuchi, M., Koike, H., & Inoue, Y.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1988, 932, 160-169.

**Ikeuchi, M., Yuasa, M., & Inoue, Y.** Simple and discrete isolation of an O<sub>2</sub>-evolving PSII reaction center complex retaining Mn and the extrinsic 33 kDa protein. *FEBS Lett.*, 1985, 185, 316-322.



**Iordanov, I. T., & Goltsev, V. N.** Regulation of photosynthesis at the level of phosphorylation of the light-harvesting complex and photophosphorylation. *Photosynthetica*, 1987, 21, 236-250.

**Jackson, M., & Mantsch, H. H.** *Spectrochim. Acta Rev.*, 1993, 15, 53-69.

**Jansson, C.** Protein involved in photosynthetic oxygen evolution: Isolation and characterization. Dans: *Advances in Photosynthetic Research*, Sybesma, C., (ed), M. Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, The Hague/Boston/Lancaster, 1984, 375-378.

**Kaiser, E. T., & Kézdi, F. J.** Peptides with affinity for membranes. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 1987, 16, 561-581.

**Kennedy, D. F., Slotboom, A. J., de Haas, G. H., & Chapman, D.** A Fourier transform infrared spectroscopic (FTIR) study of porcine and bovine pancreatic phospholipase A<sub>2</sub> and their interaction with substrate analogues and a transition-state inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta*, 1990, 1040, 317-326.

**Kim, T. W., & Heinrich, G.** *Photosynthetica*, 1995, 31, 315-319.

**Kotzabasis K., Fotinou C., & Ghanotakis K.** Polyamines in the photosynthetic apparatus. Photosystem II highly resolved subcomplexes are enriched in spermine. *Photosynthetic research.*, 1993, 38, 83-88.

**Krause, G. H., & Weis, E.** Chlorophyll fluorescence signals. *Photosynth. Res.*, 1984, 5, 139-157.

**Krimm, S., & Bandekar, J.** Vibrational spectroscopy and conformational of peptides, polypeptides, and proteins. Dans: *Advances in Protein Chemistry*, Édité par C. B. Anfinsen, J.T. Edsall et F. M. Richards. Academic Press Inc., Orlando, San Diego, New York, 1986, 181-364.

**Kuwabara, T., & Murata, N.** Inactivation of photosynthetic oxygen evolution and concomitant release of three polypeptides in the photosystem II particules of spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiol.*, 1982, 23, 533-539.

**Kuwabara, T., & Murata, N.** Chemical and physicochemical characterization of proteins involved in the oxygen evolution system. Dans: *Advances in Photosynthetic Research*, Sybesma, C., (ec), M. Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, The Hague/Boston/Lancaster, 1984, 371-374.

**Kyle, D. J., Kuang, T-Y., Watson, J.L., & Arntzen C. J.** Movement of sub-population of light harvesting complex (LHCII) from grana to stroma lamellae as a consequence of its phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, 765, 89-96.

**Langoutte, B., & Mathis, P.** The photosystem I reaction center: structure and photochemistry. *Photochem. Photobiol.*, 1989, 49, 833-844.

**Lavorel, J., Breton, J., & 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.

**Lehninger, A. L.** Bases moléculaires de la structure et des fonctions cellulaires. Biochimie: *Worth Publishers Inc.*, Flammarion Medecine Sciences, 1981.

**Leonard, M., Naberdryk, E., Bergeron, G., Breton, J., & Mäntele, W.** Model compound studies of pigments involved in photosynthetic energy conversion: Infrared-spectroelectrochemistry of chlorophylls and pheophytins. *Curr. Res. Photosynth.*, 1990, 1, 89-92.

**Lutz, M., & Mäntele, W.** Vibrational spectroscopy chlorophylls. Dans: *Chlorophylls*, Édité par Hugo Scheer, CRS Press Inc., Boca Raton, Ann Arbor, Boston, London, 1991, 855-902.

**Lutz, M.** In *Advanced in infrared and Raman Spectroscopy*, R. J. H. Clark, R. E. Hester, (Eds). *Wiley Heyden, London*, 1994, 11, 211-300.

**Maillet, M.** Biologie cellulaire. Septième édition refondue, *Masson*, Paris, Milan, Barcelone, 1995.

**McDonald, G. M., & Barry, B. A.** Difference FT-IR study of novel biochemical preparation of photosystem II. *Biochemistry*, 1992, 31, 9848-9856.

**Mehta A. M., Saftner R. A., Schaeffer G. W., & Mattoo A. K.** Translational modification of 18 kDa polypeptide by spermine in rice cell suspension cultures. *Plant Physiol*, 1991, 95: 1294-1297.

**Menikh, A.** Rôle du digalactosyldiacylglycérol (DGDG) dans l'empilement des thylacoïdes et dans l'activité du photosystème II. *Thèse de Doctorat en Biophysique*. UQTR, Juillet 1994.

**Michel, H., & Deisenhofer, J.** X-Ray diffraction studies on a crystalline bacterial photosynthetic reaction center: a progress report and conclusions on the structure of photosystem II reaction centers. Dans: *Encyclopedia of Plant Physiology*, New

Series, Édité par L. A. Staehelin et C. J. Artzen, Springer-Verlag, Berlin, 1986, 371-381.

**Mino, H., Satoh, J., Kawamori, A., Toriyama, K., & Zimmermann, J. L.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1993, 1144, 426-433.

**Miyao, M., & Murata, N.** Calcium ions can be substituted for the 24 kDa polypeptide in photosynthetic oxygen evolution. *FEBS Lett.*, 1984, 168, 118-120.

**Miyao, M., & Murata, N.** The Cl<sup>-</sup> effect on photosynthetic oxygen evolution: interaction of Cl<sup>-</sup> with 18 kDa, 24 kDa and 33 kDa proteins. *FEBS Lett.*, 1985, 180, 303-308.

**Miyao, M., & Murata, N.** Photoinactivation of the oxygen-evolving complex of photosystem II. Dans: *Photoinhibition*, édité par D. J. Kyle, C. B. Osmond et C. J. Artzen, Elsevier Science Publishers B. V. (Biomedical Division), 1987, 289-307.

**Miyao, M., & Murata, N.** Lavorel, J. Maison-Peteri, B., Boussac, A. & Etienne, A-L. Effect of the 33 kDa protein on the state transitions in photosynthetic oxygen evolution. *Biochim. Biophys. Acta*, 1987, 890, 151-159.

**Miyao, M., & Murata, N.** The mode of binding of three extrinsic proteins of 33 kDa, 23 kDa, and 18 kDa in the photosystem II complex of spinach. *Biochim. Biophys. Acta*, 1989, 977, 315-321.

**Morita, E. H., Hayashi, H., & Tasumi, M.** Temperature dependence of light-induced infrared difference spectra of chromatophores and reaction centers from photosynthetic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, 1993, 1142, 146-154.

**Murata, N., Miyao, M., Omata, T., Matsunami, H., & Kuwabara, T.** Stoichiometry of components in the photosynthetic oxygen evolution system of photosystem II particules prepared with Triton X-100 from spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1984, 765, 363-369.

**Murphy, D. J.** The molecular organisation of the photosynthetic membranes of higher plants. *Biochim. Biophys. Acta*, 1986a, 864, 33-94.

**Murphy, D. J.** Structural properties and molecular organization of the acyl lipids of photosynthetic membranes. Dans: *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, édité par L. A. Staehelin et C. J. Arntzen, Springer-Verlag, Berlin, vol. 19, 1986b, 713-725.

**Murata, N., & Miyao, M.** Extrinsic membrane proteins in the photosynthetic oxygen-evolving complex. *Trends Biochem. Sci.* 1985, 10, 122-124.

**Murata, N., & Miyao, M.** Oxygen-evolving complex of photosystem II in higher plants. Dans: *Progress in Photosynthesis Research*, Biggens, J. (Ed.), Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 1987, 453-462.

**Nabedryk, E., Biaudet, P., Darr, S., Artzen, C. J., & Breton, J.** Conformation and orientation of chlorophyll-proteins in photosystem I by circular dichroism and polarized infrared spectroscopies. *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, 767, 640-647.

**Nabedryk, E., Andrianambinintsga, S., Berger, G., Leonard, M., Mäntele, W., & Breton, J.** Characterization of bonding interactions of the intermediary electron acceptor in the reaction center of photosystem II by FTIR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 1990, 1016, 49-54.

**Nabedryk, E., Goldman, E., Robles, S. J., Youvan, D. C., & Breton, J.** Probing the primary donor environment in the histidine<sup>M200</sup>-leucine and histidine<sup>L173</sup>-leucine heterodimer mutants of rhodobacter capsulatus by light-induced Fourier transform infrared difference spectroscopy. *Biochemistry*, 1992, 31, 10852-10858.

**Nahar, S., Tajmir-Riahi H. A., & Carpentier R.** A quantitative analysis of protein secondary structure of photosystem II particules and lightharvesting complex of chloroplast thylakoid membranes by FTIR spectroscopy. *J. Molecular Structure*, 1994, 328, 115-120.

**Nahar, S., & Tajmir-Riahi H. A.** Complexation of Heavy Metal Cations Hg, Cd, and Pb with Proteins of PSII: Evidence for Metal-Sulfur Binding and Protein Conformational Transition by FTIR Spectroscopy. *J. Colloid Interface Sci.*, 1996, 178, 648-656,.

**Nakatani, H. Y., Arntezn, C. J., & Inoue, Y.** Characterization of the photosystem II reaction center polypeptide (CP47). Dans: *Advance in Photosynthetic Research*, Sybesma C. (ed.), M. Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, The Hague/Boston/Lancaster, 1984, 99-102.

**Nanba, O., & Satoh, K.** Isolation of a PSII reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome b-559. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 109-112.

**Nénonéné, K. E.** Effets du phosphatidylglycerol et des cations mono-divalents dans la formation et l'activité des complexes lipide-polypeptides du photosystème II. *Thèse de Doctorat en Biophysique*. UQTR, Juin 1992.

**O'Malley, P. J., & Babcock, G. T.** EPR properties of immobilized quinone cation radicals and the molecular origin of signal II in spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, 765, 370-379.

**Ortega, J. M., Hervas, M., & Losada, M.** Location of cytochrome b-559 between photosystem II and photosystem I in non cyclic electron transport. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1989, 975, 244-251.

**Pacher, K. G., Matlok, F., & Gremlich, H. U.** Merck FTIR Atlas. A collection of FTIR spectra. Merck (ed), Darmstadt, 1988.

**Pachlorophylleer, K. G. R., Matlok, F., & Gremlich, H-U.** Merck FT-IR atlas, A collection of FT-IR spectra. *Édité par Merck*, Darmstadt, 1988.

**Papageorgiou, G. C., & Lagoyanni T.** Interactions of Iodide Ions with Isolated Photosystem 2 Particules. *Arch. of biochem. and biophys*, 1991, 339-343.

**Parker, F. S.** Application of infrared, raman and resonance raman spectroscopy in biochemistry, 1983. *Plenum Press*, New York.

**Pearlstein, R. M.** Chlorophyll singulet excitons. In Govindjee (Ed). Photosynthesis I. Energy conversion by plants and bacteria. New York: *Academic Press*, 1982, 293-330.

**Peter H. R., Ray F. E., & Susan E. E.** Biology of plants. Fifth edition. *Worth Publishers*, New York, N. Y., 1992.

**Propovic, R., Beauregard, M., & Leblanc, R. M.** Study of energy storage in bundle sheath cells of zea mays. *Plant Physiol.*, 1987, 84, 1437-1441.

**Pschorn, R., Rühle, W., & A.** Structure and function of ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-oxidoreductase. *Photosynthesis Res.*, 1988, 17, 277-266.

**Phillip, T. E., & Russell, L. M.** Do polyamines have roles in plant development? *Plant Physiol., Plant Mol. Biol.*, 1989, 40, 235-269.

**Quigley, J., Teeter, M. M., & Rich, A.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, 75, 64-68.

**Richardson, J. S., & Richardson, D. C.** Principles and patterns of protein conformation. Dans: *Prediction of protein structure and the principles of protein conformation*, Fasman, G. D. (ed), Plenum Press, New York, London, 1989, 1-98.

**Rutherford, A. W.** Photosystem II, water-splitting enzyme. *Trends Biochem. Sci.*, 1989, 14, 227-232.

**Ryzard, Stanek.** Effects of NO<sub>3</sub> ions on the photosystem II photoinhibition of triazine resistant and susceptible plants of *Erigeron canadensis* L. *Acta Physiologiae Plantarum.*, 1991, 211-214.

**Sandmann, G., & Böger, P.** Sites of herbicide inhibition at the photosynthetic apparatus. Dans: *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, édité par L. A. Staehelin et C. J. Arntzen, Springer-Verlag, Berlin, 1986, 95-602.

**Simpson, D. J., & Von, W. D.** The structure and function of the thylakoid membrane. *Carlsberg Res. Commun.*, 1989, 54, 55-65.

**Srivastava, S. K., & Smith, T. A.** The effect of some oligoamines and guanidines on membrane permeability in higher plants. *Phytochemistry*, 1982, 21, 997-1008.

**Staehelin, L. A.** Chloroplasts structure and supramolecular organization of photosynthetic membranes. Dans: *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, édité par L. A. Staehelin et C. J. Arntzen, Springer-Verlag, Berlin, 1986, 1-84.

**Surewicz, W. K., & Mantsch, H. H.** New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra. *Biochim. Biophys. Acta*, 1988, 952, 115-130.

**Surewicz, W. K., Moscarello, M. A., & Mantsch, H. H.** Fourier transform infrared spectroscopic investigation of the interaction between myelin basic protein and dimyristoylphosphatidylglycerol bilayers. *Biochemistry*, 1987, 26, 3881-3886.

**Svensson, P., Andreasson, E., & Albertsson, P. A.** Heterogeneity among photosystem I. *Biochem. Biophys. Acta*, 1991, 1060, 45-55.

**Sybesma, C.** Biophysics an introduction. *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht, Boston, London, 1989.

**Szafran, Z., Pike R. M., & Singh, M. M.** Microscale Inorganic Chemistry: A comprehensive Laboratory Experience. John Wiley & Sons, Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, 1991.

**Tajmir-Riahi, H. A., & Ahmed, A.** Complexation of copper and zinc ions with proteins of a light-harvesting complex (LHC-II) of chloroplast thylakoid membranes studies by FTIR spectroscopy. *J. Mol. Struct.*, 1993, 297, 103-108.

**Takahashi, Y., Takahashi, M.-A., & Satoh, K.** Identification of the site of iodite photooxydation in the photosystem II reaction center complex. *FEBS Lett.*, 1986, 208, 347-351.

**Tavitian, B. A., Nabedryk, E., Mäntelle, W., & Breton, J.** Light-induced Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic investigations of primary reactions in photosystem I and photosystem II. *FEBS Lett.*, 1986, *201*, 151-157.

**Thornber, J. P.** Biochemical characterization and structure of pigment-protein of photosynthetic organism. Dans: *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, édité par L. A. Staehelin et C. J. Arntzen, Springer-Verlag, Berlin, 1986, 98-142.

**Tu, A. T.** *Raman spectroscopy in biology: Principles and applications*. Wiley-Interscience Publication, John Wiley et sons Inc., New York, Toronto, Singapore, 1982.

**Widger, W. R., Cramer, W. A., Hermodson, M., & Herrmann, R. G.** Evidence for a hetero-oligomeric structure of the chloroplasts cytochrome b-559. *FEBS Lett.*, 1985, *191*, 186-190.

**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, 493-554.

**Wolfe, S. L.** Molecular and cellular biology. *Wadsworth Publishing Company*, Belmont, California, 1993.

**Yamagishi, A., & Katoh, S.** A photoactive photosystem II reaction center complex lacking a chlorophyll-binding 40 kilodalton subunit from the thermophilic Cyanobacterium *Synechococcus* SP. *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, *765*, 118-124.