

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

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

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES**

**PAR
ALAIN GAUTHIER**

**APPLICATION DE LA THERMOLUMINESCENCE POUR L'ÉTUDE
DE LA PHOTOSYNTHÈSE : EFFET DU TMPD**

SEPTEMBRE 2006

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.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de maîtrise le docteur Robert Carpentier pour sa confiance presque aveugle et surtout, à son amour pour la recherche qu'il sait si bien transmettre. Je remercie Johanne Harnois, qui sait rire et faire rire. Je tiens aussi à remercier le docteur Jean-Marc Ducruet qui m'a accueilli et hébergé à son appartement de Paris au printemps 2005, en plus de me permettre de découvrir les alpes françaises. Et que dire de Sri, Nicolaï, Elena, Raja, David, Caroline, Steve, Rémy, Julian, Yousi et Frank le concierge. Rien à dire de plus ... seulement les remercier pour ce qu'ils sont, c'est-à-dire des passionnés de la vie.

De plus, je désire me remercier infiniment pour avoir décidé de retourner aux études afin de réaliser un de mes rêves d'enfance : faire de la recherche scientifique. Pendant toute mon enfance et mon adolescence, deux hommes importants pour moi ont largement contribué à ma curiosité et ma tendance à vouloir comprendre tout de notre univers : ces deux hommes sont mon père Jean-Marie Gauthier et mon guide spirituel, Raël. Merci.

Septembre 2006

CONTRIBUTION AU TRAVAIL DE RECHERCHE

Johanne Harnois, qui est assistante de recherche au laboratoire du docteur Robert Carpentier, a effectué certaines extractions de matériel biologique qui ont été utilisées dans plusieurs mesures. Le docteur Sridharan Govindachary a effectué certaines mesures avec des échantillons de thylacoïdes et a participé à la rédaction de l'article à 50%. Pour ma part, j'ai effectué la majorité des extractions de matériel biologique, la majorité des mesures effectuées avec des échantillons de thylacoïdes et la totalité des mesures effectuées avec des échantillons de BBY. J'ai conçu entièrement le logiciel de simulation des courbes de thermoluminescence avec l'aide technique du docteur Jean-Marc Ducruet.

RÉSUMÉ DU PROJET

Ce projet de recherche a été réalisé dans le but d'étudier l'influence du *N,N,N',N'*-tetraméthyl-*p*-phenylenediamine (TMPD) sur les processus de recombinaison de charges dans le photosystème II (PSII) et son action auprès des côtés donneur et accepteur du PSII afin d'obtenir des informations supplémentaires sur le fonctionnement du complexe d'évolution d'oxygène (CDO).

Dû au faible coût de l'équipement utilisé, de son opération simple et de l'étude sélective du PSII, la thermoluminescence (TL) a été utilisée pour évaluer les modifications induites par le TMPD sur des échantillons de thylacoïdes et de membranes enrichies en PSII (BBY) isolés à partir de feuilles d'épinard, de pois et d'orge. Par contre, pour connaître l'état redox de l'accepteur quinonique primaire Q_A , nous avons mesuré la fluorescence chlorophyllienne F_{Chl} .

Puisqu'il n'est pas facile de limiter l'effet du traitement du TMPD à un côté du PSII, nous avons tiré profit des deux accepteurs quinoniques du côté accepteur de PSII en comparant l'effet sur la température maximale de TL entre les paires de charges $S_2Q_A^-$ et $S_2Q_B^-$. Et comme la génération de la bande B implique les états S_2 et S_3 , la température d'émission et le comportement oscillant de cette bande de TL fournit des informations utiles au sujet des propriétés des états S du CDO. De plus, nous sommes en mesure de vérifier la désactivation des états S_{2-3} , la déstabilisation du noyau de Mn, le retranchement de certaines protéines extrinsèques, la modification du couple redox S_1/S_2 et/ou S_2/S_3 , la modification du ratio de la population initiales $S_0:S_1$ et la perturbation du transport d'électrons entre Q_A et Q_B .

Les mesures de TL ont été effectuées avec un instrument spécialement conçu pour notre laboratoire. Toutes les mesures ont été faites dans l'obscurité. Les données acquises ont été analysées en utilisant un logiciel développé pour s'exécuter sur le système d'exploitation Windows. Des courbes expérimentales ont été simulées pour déterminer les valeurs de

l'énergie d'activation (E_a). Le TMPD a été fraîchement préparé à chaque séance d'échantillonnage avant les mesures de TL.

Des plants de pois et d'orge ont été cultivés dans une chambre de croissance à environnement contrôlé tandis que les feuilles d'épinards ont été achetées dans un marché local. Les membranes de thylacoïdes ont été isolées à partir de feuilles de plants de pois vieilles de 10 jours et de feuilles de plants d'orge et d'épinard vieilles de 7-9 jours. Les membranes enrichies en PSII ont été préparées à partir de thylacoïdes.

Avec des thylacoïdes, nous avons observé un déclin du signal des bandes B et Q qui s'accroît avec la concentration de TMPD. De plus, le signal de la bande B au 2^{ième} éclair devient plus important que le 1^{ier} éclair avec l'ajout de 2.5 μ M TMPD. Des décalages de 11°C du maximum de la bande B et de 4°C du maximum de la bande Q vers les basses températures à 10 μ M TMPD ont été aussi observés. Le déclin du signal de la bande C a été plus faible que celui de la bande Q. Nous avons aussi mesuré par la F_{chl} un ralentissement général du processus global de recombinaison.

D'un autre côté, le motif d'oscillation a conservé une oscillation normale malgré la perte du signal à tous les éclairs. Et grâce aux simulations, nous avons aussi déduit qu'il y avait une diminution de ~ 30 mV de l'énergie d'activation des paires S_2Q_A et $S_2Q_B^-$ à 10 μ M TMPD et un déclin de la population initiale des CR dans l'état Q_B .

Les résultats des expériences effectuées avec les BBY ont été semblables à ceux obtenus avec les thylacoïdes.

Dans le futur, nous prévoyons utiliser la technique du dégagement d'oxygène généré par des éclairs pour comprendre davantage l'effet du TMPD. Avec cette technique, il sera plus facile de vérifier si le TMPD affecte l'avancement des états $S_{2/3}$ du noyau de Mn par un mécanisme re-réduction du TMPD via un transport cyclique dans le PSII impliquant le cytochrome b_{559} .

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
COMTRIBUTION AU TRAVAIL DE RECHERCHE	iii
RÉSUMÉ DU PROJET	iv
TABLE DES MATIÈRES	vi
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS	xii
CHAPITRE I – INTRODUCTION DU PROJET	1
CHAPITRE II – INTRODUCTION GÉNÉRALE	3
2.1 Le mécanisme général de la photosynthèse	4
2.2 L'absorption lumineuse	4
2.3 La fixation du carbone	4
2.4 La décomposition de l'eau.....	4
2.5 Les « photosystèmes »	5
2.6 Un enchaînement de réactions	5
2.7 La localisation de la photosynthèse dans les plantes	5
2.8 La constitution d'un chloroplaste	6
2.9 Les photosystèmes I et II	7
2.10 Les réactions lumineuses	8
2.11 Les échanges d'électrons.....	9
2.12 Le transport linéaire d'électrons	9
2.13 La photophosphorylation cyclique.....	10
2.14 Le flux de protons	10
2.15 Fixation du carbone (anciennement appelée phase obscure).....	11

CHAPITRE III – APPAREIL PHOTOSYNTHÉTIQUE	12
3.1 Photosystème II.....	12
3.2 Le transfert d'électrons du P ₆₈₀ à Q _B	13
3.3 Le complexe de dégagement d'oxygène (noyau de manganèse)	15
3.4 Le cytochrome b ₆ f.....	16
3.5 Photosystème I.....	17
CHAPITRE IV – FLUORESCENCE ET INDUCTION DE FLUORESCENCE....	19
4.1 Fluorescence chlorophyllienne	19
4.2 Induction de fluorescence : effet Kautsky	21
4.3 L'atténuation (« quenching ») de la fluorescence	22
CHAPITRE V – THERMOLUMINESCENCE	25
5.1 Origines de la TL photosynthétique.....	26
5.2 Formation et stabilisation des paires de charges dans le PSII	27
5.3 Émission de la TL par la recombinaison activée thermiquement (liens avec la fluorescence retardée).....	29
5.4 Mesures et analyses de la TL.....	31
5.5 Simulation des courbes de TL	32
5.6 Analyse des oscillations dans l'intensité de la TL.....	35
5.7 Attributions des bandes de TL aux paires de charges.....	37
5.7.1 La bande B (T _m ~ 35°C)	38
5.7.2 La bande Q (T _m ~ 0 à 10°C à pH physiologique)	38
5.7.3 La bande A (T _m ~ -20 à -10°C).....	39
5.7.4 La bande A _T	39
5.7.5 La bande Z _V	40
5.7.6 La bande C.....	40
5.7.7 La bande Z (T _m ~ -160°C, quand éclairé à 77 K)	41
5.7.8 Les bandes de TL aux températures en dessous 77 K	41
5.7.9 Les bandes à hautes températures (HTL).....	42

5.7.10	Thermoluminescence provenant du PSI et bande AG	42
5.8	Implication du côté accepteur du PSII dans la TL.....	43
5.9	Implication du côté donneur du PSII dans la TL.....	44
5.10	Avantages et inconvénients de la TL.....	46
CHAPITRE VI – OBJECTIF DU PROJET		47
CHAPITRE VII – PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES		50
7.1	Matériel végétal utilisé.....	50
7.2	Isolation des membranes de thylacoïdes.....	50
7.3	Isolation des membranes enrichies en PSII (BBY)	50
7.4	Évaluation de l'intégrité fonctionnelle des membranes de thylacoïdes et des membranes enrichies en PSII.....	51
7.5	Mesures de thermoluminescence.....	51
7.6	Sources lumineuses et excitation des échantillons	52
7.7	Préparation des échantillons pour les mesures de TL.....	53
7.8	Périodes d'incubation et séquence de flashes.....	54
7.9	Acquisition et analyse du signal de thermoluminescence	54
7.10	Décomposition des courbes de thermoluminescence	55
7.11	Modifications des bandes caractéristiques de TL avec un traitement au TMPD et/ou des inhibiteurs.....	55
RÉSUMÉ DE L'ARTICLE (ABSTRACT).....		57
ARTICLE SCIENTIFIQUE.....		58
DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION.....		96
PERSPECTIVES		113
BIBLIOGRAPHIE		115
ANNEXES		126

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Schéma général de la chaîne de transport d'électrons entre le PSII et le PSI qui aboutit à la formation du NADPH.....	6
Figure 2 :	Organisation du chloroplaste et vue générale des constituants de sa membrane (dite membrane photosynthétique).....	7
Figure 3 :	Vue simplifiée de la constitution de la membrane photosynthétique des plantes supérieures avec ses constituants principaux : le PSI, le PSII, le cytochrome b_6f et l'ATP synthétase	8
Figure 4 :	Vue schématique du rôle du P_{680} et du P_{700} dans la synthèse d'ATP	9
Figure 5 :	Le complexe protéinique appelé ATP synthétase qui utilise le gradient de protons pour transformer l'ADP en ATP	11
Figure 6 :	Représentation schématique du centre réactionnel du PSII	12
Figure 7 :	Schéma des états de transition du centre réactionnel du PSII	14
Figure 8 :	Les réactions de transfert d'électrons au niveau du cytochrome b_6f . La localisation des groupes prosthétiques et des sites de liaison des plastoquinones / plastoquinols (Q_0 et Q_1) (gracieuseté Jon Nield)	16
Figure 9 :	Les sous-unités du PSI sont marquées par une lettre qui représente le gène codant (par exemple A pour psa A). Les flèches indiquent le trajet du transfert d'électrons. La ferredoxine (Fd) peut se dissocier pour interagir avec la ferrédoxine-thiorédoxine oxydo-réductase (gracieuseté Jon Nield)	18
Figure 10 :	Diagramme des différents chemins de désexcitation d'une chlorophylle excitée : transfert d'énergie 1) à une Chl voisine du même complexe, 2) à une Chl voisine d'un autre complexe, 3) par fluorescence (désexcitation radiative), 4) par désexcitation non-radiative (dissipation de chaleur), 5) par formation de l'état triplet et 6) à un centre réactionnel ouvert (conversion photochimique)	19
Figure 11 :	L'induction de fluorescence (effet Kautsky, cinétique rapide).....	21
Figure 12 :	Schéma représentant des résultats qui permettront d'analyser l'atténuation de la fluorescence chlorophyllienne en utilisant la méthode de pulses saturants (gracieuseté Julie Scholes).....	23

- Figure 13 : Transport d'électrons généré par la lumière dans le PSII qui modifie l'état redox du côté accepteur et fait avancer les états S du côté donneur. Différentes bandes de TL sont le produit de recombinaison entre certaines charges positives du côté donneur et certaines charges négatives du côté accepteur..... 28
- Figure 14 : Diagramme énergétique de la TL et modulation du maximum de température. $[D^+A^-]_s$ et $[D^+A^-]_d$ indiquent les paires de charges stabilisées ayant un plus petit (s-shallower) et un plus grand (d-deeper) piège énergétique dû à des modifications au PSII comme une mutation, une dénaturation ou le retranchement d'un co-facteur essentiel..... 30
- Figure 15 : Motif d'oscillation de période 4 typique de la bande B résultant de l'application de plusieurs éclairs. Le panneau A correspond à un échantillon de thylacoïdes brièvement adapté à l'obscurité ou à un échantillon de chloroplastes et le panneau B à un échantillon de thylacoïdes longuement adapté à l'obscurité..... 37
- Figure 16 : Photographie d'un thermoluminomètre qui permet d'acquérir des spectres de thermoluminescence de feuilles et d'échantillons en suspension. FP représente la source d'éclairs, WI et WO : entrée et sortie de la circulation d'eau, DAQ : système d'acquisition des données, C : boîte de liaison entre l'ordinateur et l'appareil, TR : support de la plaque Peltier, PMT : photomultiplicateur, PU : unité d'alimentation, FB : l'émetteur d'éclairs, LG : fibres optiques..... 53
- Figure 17 : Diminution de l'intensité de la bande B d'échantillons de membranes enrichies en PSII (BBY) pour un et deux éclairs exposés à 0.0 (1), 2.5 (2), 5.0 (3), 7.5 (4), 10.0 (5) et 15.0 μ M (6) de TMPD 100
- Figure 18 : Ratio de l'intensité de la bande C sur la bande Q en fonction de la concentration du TMPD (cercles noirs, 1 éclair; cercles blancs, 2 éclairs) 104
- Figure 19 : Simulation de motifs d'oscillation de la bande B en faisant varier uniquement la population initiale S_0 et S_1 (panneau A) et la population initiale Q_{B^-} et Q_B (panneau B)..... 109

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Énergies de stabilisation et temps de demi-vie de différentes paires de charges luminescentes dérivées de simulation de courbes de TL (Inoue 1995)	33
Tableau 2 : Changement dans le motif d'oscillation de période 4 de la bande B en fonction du nombre de centres réactionnels du PSII capable de luminescence après une série d'éclairs pour des thylacoïdes longuement et brièvement adaptés à l'obscurité. Les ratés et les doubles touchés sont négligés. L'étoile (*) indique les centres réactionnels luminescents. Pour la section A et B, la première ligne en gris indique le nombre d'éclairs et la deuxième indique le nombre de centres réactionnels luminescents.....	36
Tableau 3 : Assignation de paires de charges à des bandes de TL.....	39
Tableau 4 : Diminution de l'intensité et décalage de la température du maximum de la bande B d'échantillons de thylacoïdes en fonction de la concentration du TMPD pour un et deux éclairs (Référence : Figure 1 de l'article, panneaux A et B, page 91).....	96
Tableau 5 : Diminution de l'intensité et décalage de la température du maximum de la bande Q d'échantillons de thylacoïdes en fonction de la concentration du TMPD pour un et deux éclairs (Référence : Figure 1 de l'article, panneaux C et D, page 91).....	97
Tableau 6 : Valeurs initiales (en pourcentage) des populations S_0 , S_1 , Q_{B^-} et Q_B qui ont été nécessaires afin de simuler les motifs obtenus à différentes concentrations de TMPD (Référence : Figure 4 de l'article, page 93)	108
Tableau 7 : Valeurs du signal de la bande Q au 1 ^{ier} éclair et de la bande B au 8 ^{ième} éclair (en pourcentage) pour différentes concentrations de TMPD.....	112

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

ADP	adénosine diphosphate
ADRY	accélération de la désactivation du complexe de dégagement d'oxygène
ATP	adénosine triphosphate
BBY	membranes enrichies de photosystème II
CCCP	carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone
CDO	complexe de dégagement (ou d'évolution) d'oxygène
CR	centre réactionnel du photosystème II
D ₁	la protéine de 32 kDa du centre réactionnel du photosystème II
D ₂	la protéine de 34 kDa du centre réactionnel du photosystème II
DCMU	(ou diuron) herbicide -3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-diméthylurea
E _a	énergie d'activation
F _o	fluorescence à l'obscurité, centres ouverts
F _{max}	fluorescence maximale, centres fermés
F _v	fluorescence variable, F _{max} -F _o
FQR	Ferrédoxine : plastoquinone : réductase
FR	rouge lointain, lumière continue à 720 nm
HTL	thermoluminescence à haute température, supérieures à 60°C
LED	light emitting diode
LHC	complexe antenne de chlorophylles a/b
NADP ⁺	nicotine-amide dinucléotide NDH NADPH-déshydrogénase
P ₆₈₀	chlorophylle du centre réactionnel du photosystème II (P ₆₈₀ [*] est une P ₆₈₀ excitée)
Pheo	phéophytine, l'accepteur primaire d'électron du photosystème II
PQ	plastoquinone (quinone oxydée)
PQH ₂	plastoquinol ou plastohydroquinone (quinone réduite)
PSI	photosystème I
PSII	photosystème II
Q _A	la quinone acceptrice primaire du photosystème II

Q _B	la quinone acceptrice secondaire du photosystème II (site de liaison de PQs)
S ₀ -S ₄	états redox du complexe de manganèse
TL	thermoluminescence
T _m	température maximale d'une bande de thermoluminescence
TMPD	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl- <i>p</i> -phenylenediamine
Y _D	donneur d'électron auxiliaire de P ₆₈₀ , résidu Tyr160 de la protéine D2
Y _Z	donneur d'électron régulier de P ₆₈₀ , résidu Tyr161 de la protéine D ₁

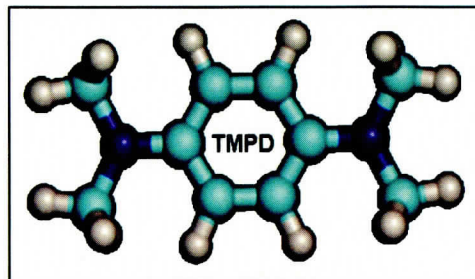
CHAPITRE I

INTRODUCTION DU PROJET

Pour étudier le fonctionnement du complexe de dégagement d'oxygène (CDO) et la réactivité du noyau de manganèse (Mn) du photosystème II (PSII), au moins deux groupes de ces composés ont été largement utilisés jusqu'à maintenant. Le premier groupe est une classe de composés reconnus pour leur capacité à accélérer des réactions de désactivation du CDO (ADRY). Ils désactivent sélectivement les états S_2 et/ou S_3 du noyau de Mn. Kok et al. (1970) ont proposé un modèle où les états d'oxydation du noyau de Mn vont de 0 à 4(+), appelés états S, de S_0 à S_4 .

Le deuxième groupe se compose de l'hydroxylamine (NH_2OH) et de l'hydrazine (NH_2NH_2) qui accède facilement au site catalytique du CDO et cause des changements importants au rendement du dégagement d' O_2 (Messinger et al. 1990-1991-1993). D'autre part, la perturbation du transport d'électrons du côté accepteur du PSII par des oxydants chimiques et des quinones exogènes influence nettement les interactions des plastoquinones (PQs) avec le site Q_B , ce qui amène à une atténuation rapide de la fluorescence des chlorophylles (Chls) (Bukhov et al. 2003-2004).

Un autre agent redox, le N,N,N',N'-tétraméthyl-p-phénylènediamine (TMPD), qui a été largement utilisé en tant que donneur d'électrons pour le photosystème I (PSI) au cours des trois dernières décennies, agit également en tant qu'accepteur efficace d'électrons du PSII (Bukhov et al. 2003). En fait, le TMPD interrompt le transport linéaire d'électrons et permet un flux régulier d'électrons entre le PSII et le PSI sans passer par le cytochrome b_6f .



Le TMPD a déjà été identifié comme un composant ADRY (Velthuys 1983) par sa capacité à donner des électrons à l'état S_2 . En présence de DCMU, la réduction du TMPD est inhibée après un premier éclair (Velthuys 1983).

Il a été montré récemment que le TMPD modifiait le taux de transport d'électrons dans le PSII de façon complexe et à plusieurs sites dont certains ne sont pas identifiés (Bukhov et al. 2003, 2004; Joly et al. 2005). Par exemple, dans des mesures utilisant des thylacoïdes, environ 20 μM de TMPD reconstitue efficacement la phase manquante J-I de la cinétique d'induction de fluorescence de Chl comportant trois phases intermédiaires (O-J, J-I et I-P) dans les tissus photosynthétiques intacts (feuilles) (Joly et al. 2005). Cependant, le mécanisme précis de l'action de TMPD n'est pas très clair. La phase J-I de l'induction de fluorescence de Chl correspond à la stabilisation des PSII dans l'état $Q_A^-Q_B^-$ et également l'état $Q_A^-Q_B^{2-}$ (Bukhov et al. 2004; Joly et al. 2005). Q_A est une plastoquinone localisée sur la protéine D_2 et Q_B est un site localisé sur la protéine D_1 où les plastoquinones peuvent se lier et accepter deux électrons. Ceci laisse ouverte la question importante de l'interaction du TMPD avec le site Q_B qui joue un rôle majeur dans le transfert d'électrons du côté accepteur.

Un article récent a démontré qu'à concentration élevée référence (~ 1 mM), le TMPD peut détacher les Mn^{2+} des noyaux de Mn du PSII dépourvus de cofacteurs essentiels tels que Ca^{2+} et Cl (Kuntzleman et al. 2004). Si le CDO est reconstitué avec le Ca^{2+} , l'effet du TMPD au niveau du noyau de Mn est amoindri. Cependant, l'oxydation du TMPD par réduction de Mn^{4+} à Mn^{3+} n'est pas empêchée. Il vaut la peine de mentionner que le NH_2OH provoque un effet semblable sur le noyau de Mn (Kuntzleman et al. 2004). En l'absence de Ca^{2+} , l'état de Mn^{3+} du noyau de Mn est également vulnérable à une réduction par le TMPD. Il a été montré que même à faible concentration, le TMPD peut interférer avec les états S du noyau de Mn (Bukhov et al. 2003-2004). Cependant, il reste à définir comment le TMPD agit sur l'un et l'autre des côtés du PSII.

CHAPITRE II

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Cette section a été inspirée de plusieurs revues de littératures, d'un site web et de livres traitants en totalité ou en partie du sujet de la photosynthèse. Le site web consulté a été celui de Michael Gregory hébergé par le Clinton Community College que l'on retrouve à l'adresse suivante : <http://faculty.clintoncc.suny.edu/faculty/Michael.Gregory>. Les livres consultés ont été **Biochimie**, traduit de la 2e édition américaine par Yves Gaudemer et publié chez DeBoeck, et **Advances in Photosynthesis**, volume 10 publié chez Kluwer Academic Publishers. Pour ces raisons, aucune référence directe n'a été ajoutée au texte de l'introduction générale.

De toutes les sources d'énergie disponibles aux organismes vivants sur notre belle planète Terre, la lumière du soleil est la plus couramment utilisée. Sur une base quotidienne, les plantes possédant des pigments chlorophylliens réalisent la photosynthèse en utilisant l'énergie solaire pour synthétiser des composés organiques, les glucides, et de l'oxygène à partir du gaz carbonique et de l'eau. Ce phénomène existe aussi chez les algues et chez certaines bactéries.

Pour bien comprendre l'importance des recherches fondamentales réalisées sur la photosynthèse, il faut avoir à l'esprit que les plantes sont la principale source alimentaire sur notre planète. Mais elles ne sont pas utiles que pour l'alimentation. Leurs produits de transformation sont des plus variés; que ce soit le bois comme matériau de construction et de chauffage, le charbon et le pétrole convoités par les grandes puissances du monde et utilisés dans l'industrie, l'oxygène, la fertilisation des sols, la filtration de l'eau et que dire de la beauté du paysage. Pour faire un résumé très simple, on peut dire que sans la lumière du soleil il n'aurait pas de plantes et que sans les plantes, il n'y aurait pas d'animaux supérieurs.

2.1 Le mécanisme général de la photosynthèse

Le mécanisme de la photosynthèse se divise en deux phases : l'absorption des rayons solaires et la fixation du carbone de l'atmosphère. Elles sont qualifiées respectivement de phase photochimique et de phase biochimique. Cette dernière n'a pas besoin de lumière pour se réaliser.

2.2 L'absorption lumineuse

Ce sont les molécules de chlorophylle (pigment photosynthétique) contenues dans les chloroplastes (organites spécialisés localisés dans les cellules des tissus verts des végétaux) qui fixent ou absorbent les rayons lumineux. L'excitation des molécules de chlorophylle par la lumière déclenche un processus de transfert d'électrons qui aboutit à la formation de deux molécules de haut niveau d'énergie, lesquelles interviennent dans toutes les réactions bioénergétiques : le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) dans sa forme réduite et l'adénosine triphosphate (ATP).

2.3 La fixation du carbone

L'énergie contenue dans l'ATP et le NADPH est indispensable à l'assimilation du carbone, qui permet de synthétiser les matières organiques tels que les glucides et principalement l'amidon à partir des molécules simples de gaz carbonique et d'eau. Tous les organismes ont besoin d'énergie pour vivre et croître; cependant, si les plantes utilisent directement l'énergie solaire pour élaborer les nutriments qui leur sont essentiels, les animaux en sont incapables; ces derniers ont donc besoin de consommer des plantes ou des animaux herbivores.

2.4 La décomposition de l'eau

Une conséquence importante de la photosynthèse est que l'énergie lumineuse décompose des molécules d'eau et libère l'un de ses atomes constitutifs : l'oxygène. Cette libération de gaz renouvelle la réserve d'oxygène atmosphérique, qui, sinon, serait rapidement épuisée par la respiration des organismes et la combustion du pétrole, du charbon, des gaz naturels,

etc. La photosynthèse et la respiration sont des phénomènes fondamentalement complémentaires, puisque le premier fixe le gaz carbonique produit par le second et que le second utilise le oxygène moléculaire produit par le premier.

2.5 Les « photosystèmes »

Chez les plantes supérieures, deux réactions lumineuses se déroulent successivement. Les molécules de chlorophylle *a* et *b* (Chl *a* et Chl *b*) se regroupent en deux unités distinctes, appelées «photosystèmes». Les photosystèmes sont des associations de protéines et de pigments dans lesquelles les molécules de chlorophylle (au nombre de 300 environ) forment une antenne collectrice. Celle-ci peut transmettre, par résonance, l'énergie reçue de la lumière à une molécule de chlorophylle particulière, ou centre réactionnel, capable de libérer un électron.

2.6 Un enchaînement de réactions

Lorsque le premier centre réactionnel absorbe un quantum de lumière, la chlorophylle s'oxyde et peut, en retour, oxyder l'eau en déplaçant les atomes d'hydrogène et en libérant l'atome d'oxygène (*voir figure 1*). L'électron arraché à la chlorophylle pendant cette première réaction lumineuse passe, par l'intermédiaire d'une chaîne de transporteurs d'électrons au second centre réactionnel. À ce stade, l'absorption d'un deuxième quantum de lumière oblige l'électron à quitter la chlorophylle et à circuler ensuite à travers une seconde chaîne de transporteurs jusqu'au NADP^+ . La réduction du NADP^+ en NADPH, forme riche en énergie, permet la réalisation d'une série de réactions de catalyse enzymatique introduisant le carbone du gaz carbonique dans des produits organiques complexes.

2.7 La localisation de la photosynthèse dans les plantes

Généralement, les chloroplastes ont une longueur de 4 à 6 μm , et une forme variable : en lentilles arrondies chez les cormophytes (plantes supérieures); en cloches, en rubans ou en étoiles chez les algues. Chez certaines bactéries, on les trouve représentés par de petits

organites sphériques de 20 à 100 nm, appelés chromatophores. De plus, le nombre de ces chloroplastes dans les cellules végétales varie suivant l'espèce étudiée.

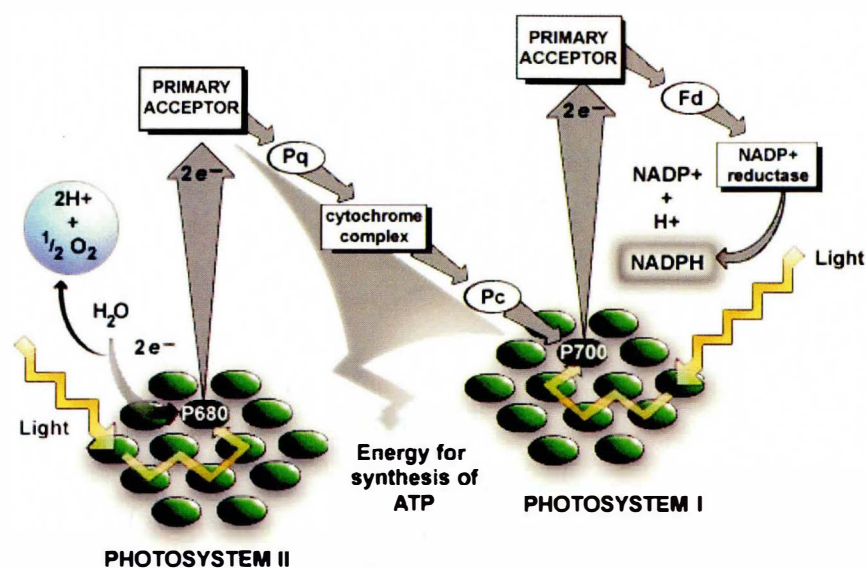


Figure 1 Schéma général de la chaîne de transport d'électrons entre le PSII et le PSI qui aboutit à la formation du NADPH.

2.8 La constitution d'un chloroplaste

L'enveloppe qui entoure les chloroplastes est composée de deux membranes lipoprotéiques, chacune d'une épaisseur de 60 Å. L'intérieur de cette enveloppe est constitué d'un fluide granuleux, le stroma, dans lequel est visible un déploiement complexe de membranes (lamelles). Ces lamelles en forme de disque, nommées thylacoïdes, ont tendance à se superposer en structures ordonnées, les grana; ces derniers sont reliés de manière sporadique par les thylacoïdes non agencés (*voir figure 2*).

Les complexes formés de protéines et de pigments photosynthétiques sont localisés sur la partie externe de la membrane des thylacoïdes. La membrane des thylacoïdes est constituée des principaux pigments photosynthétiques (chlorophylle, caroténoïdes et phycobilines) et des protéines responsables du transport électronique. Le stroma est le lieu où se déroulent

les différentes étapes chimiques de la photosynthèse. Les chloroplastes produisent aussi des protéines grâce à l'apport de leur propre ADN transmettant l'information génétique nécessaire.

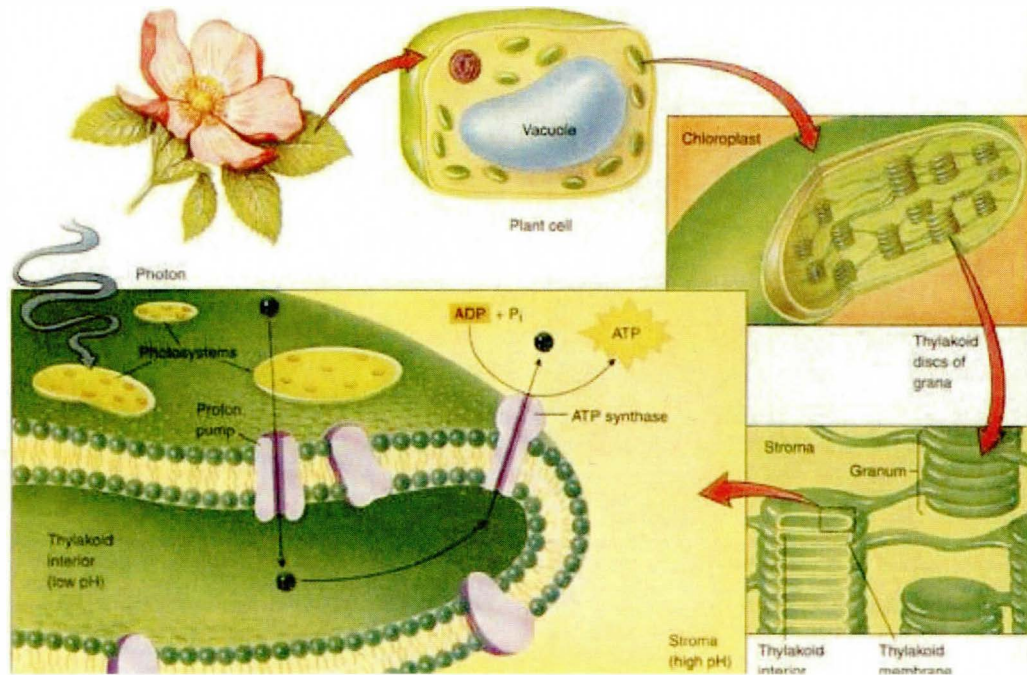


Figure 2 Organisation du chloroplaste et vue générale des constituants de sa membrane (dite membrane photosynthétique).

2.9 Les photosystèmes I et II

Les pigments chlorophylliens sont agencés en unités photosynthétiques, chacune contenant en général de 200 à 330 molécules. Cependant, dans chaque unité, un dimère de chlorophylles est réactif et constitue le centre réactionnel. Les autres molécules sont des pigments accessoires (Chl *a* et Chl *b*, phycobilines, caroténoïdes...) formant une antenne collectrice. Deux réactions lumineuses successives et interdépendantes déclenchent la photosynthèse chez les plantes supérieures. Les produits résultant du premier système photorécepteur sont utilisés par le second.

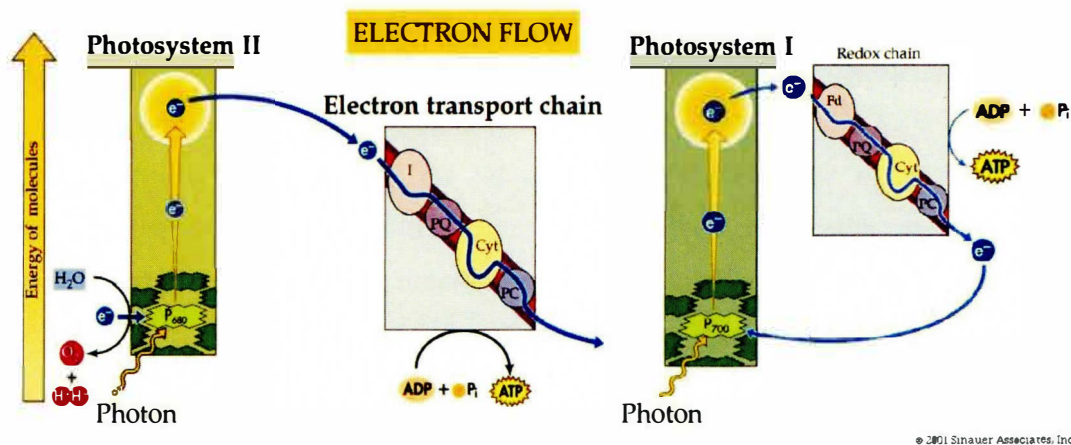


Figure 4 Vue schématique du rôle du P₆₈₀ et du P₇₀₀ dans la synthèse d'ATP.

2.11 Les échanges d'électrons

La chlorophylle P₆₈₀ oxydée est devenue capable d'oxyder de l'eau et libérer de l'oxygène moléculaire. Le potentiel normal d'oxydoréduction du P₆₈₀ est de 900 mV, il peut donc recevoir sans problème les électrons issus de la photolyse de l'eau (décomposition de l'eau entretenue par l'absorption de la lumière), dont le potentiel normal est inférieur :

La photolyse de l'eau est un phénomène encore mal compris; il semble cependant que les ions Mn²⁺, Ca²⁺ et Cl⁻ y jouent un rôle de catalyseurs. Les quatre électrons issus de la photolyse servent en retour à neutraliser (réduire) la molécule de chlorophylle P₆₈₀⁺.

2.12 Le transport linéaire d'électrons

Le premier accepteur d'électrons est la phéophytine (molécule de chlorophylle sans Mg, notée Pheo), les suivants étant des plastoquinones (Q, PQ), le cytochrome f et la plastocyanine (protéine bleue contenant du Cu et notée PC). Simultanément au transport d'électrons, des protons (H⁺) sont transloqués d'un côté de la membrane photosynthétique (stroma) à l'autre (lumen) et sont réutilisés pour la synthèse de l'ATP à partir de ses précurseurs, l'ADP et le phosphate inorganique (Pi) : le phénomène est appelé transport linéaire d'électron ou photophosphorylation non cyclique.

En atteignant le centre réactionnel P_{700} ($E' = 430 \text{ mV}$), un deuxième quantum de lumière est absorbé et permet aux électrons libérés de réduire la ferrédoxine (Fd), protéine contenant du fer et du cuivre, laquelle a un potentiel très bas ($E' = -420 \text{ mV}$). Cela constitue une deuxième chaîne de transport, où les électrons circulent tout en suivant les lois d'oxydoréduction. Lorsque la ferrédoxine capte deux électrons, elle devient un agent réducteur extrêmement puissant, notamment du dernier accepteur, le NADP^+ , qu'elle réduit en NADPH.

2.13 La photophosphorylation cyclique

Un autre système de photophosphorylation existe : les électrons issus du PSI atteignent la ferrédoxine, puis la plastoquinone, pour revenir finalement, par une nouvelle chaîne de transporteurs, au P_{700} . Lorsque les électrons traversent cette chaîne, des protons sont aussi translocés et peuvent servir à la formation d'ATP à partir de l'ADP et du phosphate inorganique. On l'appelle photophosphorylation cyclique, du fait que l'électron circule autour d'une boucle continue de transporteurs.

Par ailleurs, dans le transport linéaire d'électrons, les électrons circulent par la chaîne de transfert du PSII au PSI. En variant la proportion de transport linéaire (produisant uniquement de l'ATP) et la phosphorylation non cyclique (produisant de l'ATP et du NADPH), le taux adéquat de NADPH et d'ATP est produit pour les réactions de fixation du carbone.

2.14 Le flux de protons

Les phénomènes de transfert électronique créent un flux d'ions hydrogène (protons), ainsi qu'une différence de potentiel à travers la membrane des thylacoïdes. Il y a 1 000 fois plus de protons dans le lumen des thylacoïdes que dans le stroma (le pH du lumen est d'environ 5 et celui du stroma est d'environ 8). Pour contrer cette accumulation de protons, un système permet leur retour dans le stroma, système fait de protéines transmembranaires,

appelées facteurs de couplage (notés CF_0 et CF_1 , voir **figure 5**). L'entrée des protons crée un gradient d'énergie, qui est récupéré pour synthétiser de l'ATP.

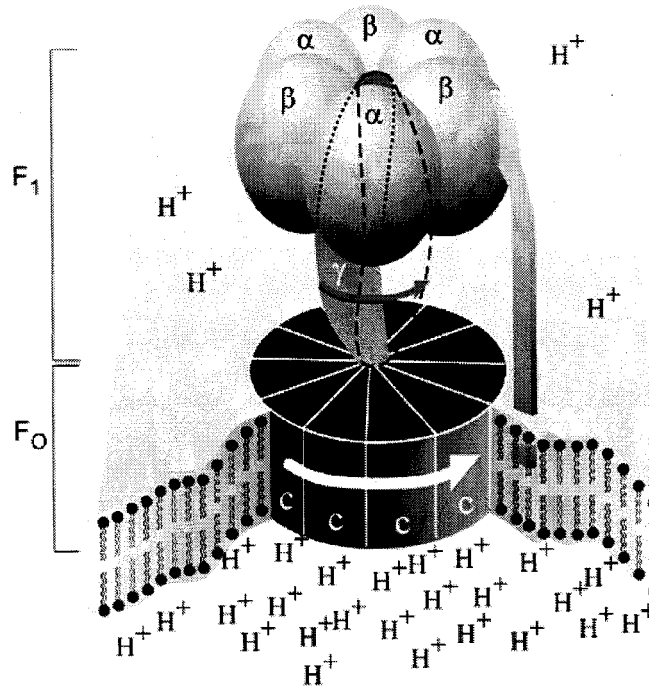


Figure 5 *Le complexe protéinique appelé ATP synthétase qui utilise le gradient de protons pour transformer l'ADP en ATP.*

2.15 Fixation du carbone (anciennement appelée phase obscure)

Ce processus, aussi dénommé cycle de Calvin, utilise l'ATP et le NADPH produits par les réactions lumineuses. La réaction clé de ce cycle est la fixation du carbone après addition d'une molécule de dioxyde de carbone à un sucre, le ribulose-1,5-biphosphate (ou RuBP). Cette réaction donne naissance à deux molécules d'acide phosphoglycérique (APG). Les autres réactions du cycle impliquent la régénération du RuBP. Pour chaque molécule de dioxyde de carbone fixée, trois molécules d'ATP et deux de NADPH sont nécessaires.

les protéines CP43 et CP47 (produites par les gènes *psbC* et *psbB* respectivement) auxquelles sont liées des molécules de chlorophylle *a* et *b* formant l'antenne cœur, et trois protéines extrinsèques de 33kDa, 23kDa et 17kDa du côté luminal (produites par les gènes *psbO*, *psbP* et *psbQ*) qui jouent un rôle de stabilisation des ions Cl^- et Ca^{2+} , cofacteurs essentiels pour le bon fonctionnement du système de dégagement d'oxygène (pour une revue détaillée, voir Ghanotakis et Yocum 1990, Rutherford et al. 1992).

Le transport d'électrons est organisé vectoriellement à travers la membrane photosynthétique. Il crée un gradient de protons par acidification du lumen et un champ électrique trans-membranaire. Les propriétés fonctionnelles du PSII ont été discutées par de nombreux auteurs Ghanotakis et Yocum (1990), Hansson et Wydrzynski (1990), Rutherford et al. (1992) et Evans et Nugent (1993).

3.2 Le transfert d'électrons du P_{680} à Q_B

Le donneur primaire d'électrons, au niveau du PSII, est P_{680} , probablement un dimère de la chlorophylle *a*, le couplage entre les deux molécules étant plus faible que dans le cas du dimère du PSI ou de l'homologue présent dans le centre réactionnel des bactéries photosynthétiques (Van Gorkom et Schelvis 1993). Le caractère hautement oxydant de la paire $\text{P}_{680}^+ / \text{P}_{680}$ ($E_m \sim 1,2 \text{ V}$) permet d'extraire des électrons d'une molécule de l'eau ($E_m = 800 \text{ mV}$). Dans l'état excité singulet, $^1\text{P}_{680}^*$, le dimère chlorophyllien transfère un électron vers une molécule de phéophytine *a* (Pheo) ($E_m = -610 \text{ mV}$, Rutherford et al. 1981) localisée sur la protéine D_1 (Nixon 1994) en générant la paire radicalaire $\text{P}_{680}^+\text{Pheo}^-$. L'électron célibataire de ce radical est transféré vers une molécule de plastoquinone Q_A (localisée sur la protéine D_2). Le P_{680} est localisé vers le côté luminal du PSII, tandis que Q_A se trouve du côté du stroma, de sorte que le transfert d'électron du P_{680} vers Q_A va générer un potentiel trans-membranaire. L'anion semi-quinonique, Q_A^- ($E_m \text{ Q}_A/\text{Q}_A^- = -80 \text{ mV}$, Krieger et al. 1995), formé par le transfert d'un électron du Pheo^- , va réduire le deuxième accepteur quinonique Q_B (le temps de demi-vie est de $\sim 150 \mu\text{s}$, Bowes et Crofts 1980) localisé sur la protéine D_1 . Cette réduction est accompagnée par la

liaison d'un proton (le temps de demi-protonation est de 2,7 ms, Polle et Junge 1986) à un ou plusieurs résidus acide-aminés situés dans la proximité du site Q_B (Crofts et al. 1984).

Après la réduction du P_{680}^+ , le centre réactionnel du PSII est capable d'effectuer une deuxième séparation de charge, conduisant, du côté accepteur, à la réduction du Q_B^- (H^+) par Q_A^- (le temps de demi-vie de $\sim 600\mu s$, Bowes et Crofts 1980). Le deuxième proton est lié en quelques millisecondes (Polle et Junge 1986). Le quinol ainsi formé, forme doublement réduite de la quinone, a une faible affinité pour le site Q_B , et diffuse dans le bassin de plastoquinones / plastoquinols (PQ / PQH₂). Voici la succession des réactions qui ont lieu aux côtés donneur et accepteur du PSII dans la *figure 7* :

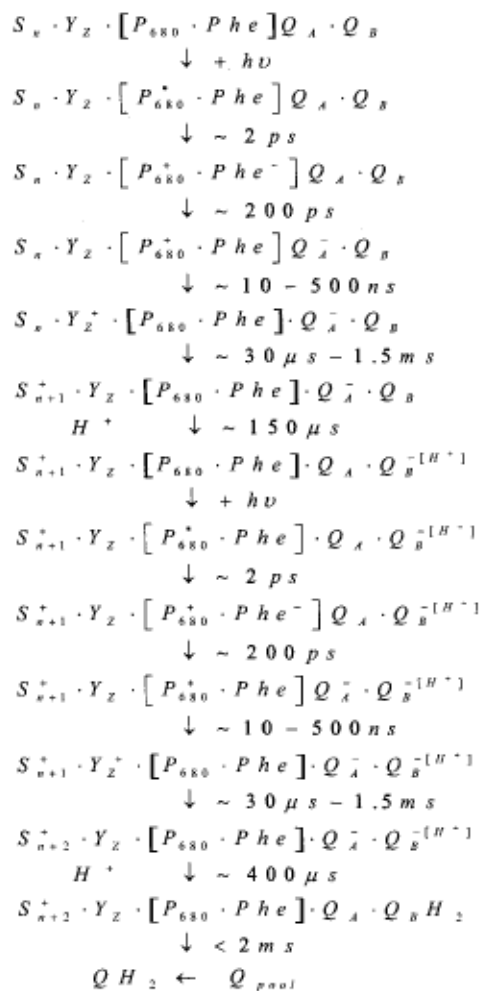
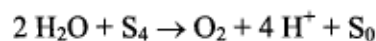


Figure 7 Schéma des états de transition du centre réactionnel du PSII.

3.3 Le complexe de dégagement d'oxygène (noyau de manganèse)

Pour chaque photon converti photochimiquement, le centre réactionnel du PSII engendre une charge positive qui est stabilisée sur le côté donneur. Après chaque séparation de charge, P_{680}^+ est réduite par une tyrosine localisée sur D_1 (Y_Z). Y_Z^+ oxyde, à son tour, un complexe formé de quatre atomes de manganèse (Mn), qui constitue le système de dégagement d'oxygène, situé du côté donneur du PSII (pour une revue voir Rutherford et al. 1992).

La libération d'une molécule d'oxygène nécessite l'extraction des quatre électrons de deux molécules d'eau, ce qui est rendu possible par l'accumulation de 4 charges positives hautement oxydantes au niveau du noyau de Mn. Kok et al. (1970) ont proposé un modèle où les états d'oxydation vont de 0 à 4(+), appelés états S, de S_0 à S_4 . L'état S_4 n'est pas stable car il participe à l'oxydation de l'eau :



Après adaptation à l'obscurité, seuls les états S_0 et S_1 sont présents, dans une proportion de ~25% et ~75%, respectivement. Un éclair produisant une et une seule séparation de charge conduit à une oxydation $S_n \rightarrow S_{n+1}$. Cela correspond à une oscillation de période 4 du dégagement d'oxygène au cours d'une séquence d'éclairs, avec un maximum au troisième éclair (Joliot et al. 1969), lorsque les centres à l'état S_1 , majoritaires à l'obscurité, atteignent l'état S_4 . Toutefois, il peut se produire des manques ($S_n \rightarrow S_n$ dans les centres avec Q_A^- présent, où la charge négative ne peut pas aller au delà de Pheo^- , et donc se recombine avec P_{680}^+) ou des doubles coups ($S_n \rightarrow S_{n+2}$, dans les centres où se produisent deux séparations de charges au cours d'un éclair), ce qui explique la disparition des oscillations de période 4 après une vingtaine d'éclairs ($S_0 = S_1 = S_2 = S_3$). Parmi les états S, seuls S_2 et S_3 sont capables de se recombinaison avec un électron porté par l'un des accepteurs quinoniques du PSII et cette recombinaison participe à l'émission de luminescence.

3.4 Le cytochrome b₆f

Le complexe cytochrome b₆f (*voir figure 8*) est constitué par quatre polypeptides majeurs : cytochrome f (31 kDa, codé par le gène *petA*), cytochrome b₆ (23 kDa, codé par le gène *petB*), la protéine fer-soufre « Rieske » (20 kDa codée par le gène *petC*) et la sous-unité IV (17 kDa, codée par le gène *petD*) (Cramer et al. 1991). Le rôle du cytochrome b₆f est de catalyser le transfert d'électrons du plastoquinol à la plastocyanine et de pomper des protons à travers la membrane thylacoïdale, vers le lumen (Q cycle).

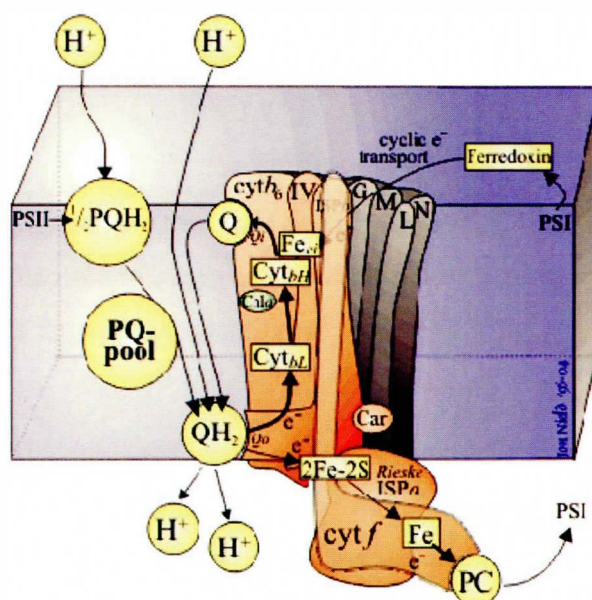
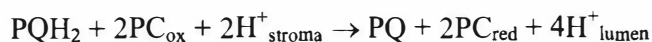


Figure 8 Les réactions de transfert d'électrons au niveau du cytochrome b₆f. La localisation des groupes prosthétiques et des sites de liaison des plastoquinones / plastoquinols (Q₀ et Q₁) (gracieuseté Jon Nield).

La réaction stœchiométrique, qui reflète le rôle catalytique du cytochrome b₆f est donnée par :



Le complexe possède deux sites qui interagissent avec le couple plastoquinone / plastoquinol. Au niveau du site Q₀ localisé du côté luménal, le plastoquinol est oxydé par une réaction où le premier électron va réduire le groupe fer-soufre Rieske à haut potentiel et

l'autre va réduire le cytochrome b_{LP} (bas potentiel). Les deux protons produits pendant l'oxydation du plastoquinol sont libérés dans le lumen thylacoïdal. Le groupe fer-soufre, réduit, transfère un électron au cytochrome f , qui est le point de sortie de cet électron vers la plastocyanine. L'autre électron arrivé sur le cytochrome b_{LP} est transféré rapidement ($<10^4 \text{ s}^{-1}$) sur le second groupe hémique de potentiel plus élevé, b_{HP} localisé vers le côté stromal du complexe. Le cytochrome b_{HP} est en contact avec le site de liaison pour la seconde quinone, Q_1 . La plastoquinone liée à ce site est partiellement réduite par le cyt b_{HP} en générant une semiquinone faiblement liée. Ensuite, une seconde molécule de plastoquinol est oxydée au niveau du site Q_0 , avec prise simultanée de deux protons du côté stromal de la membrane (Rich et al. 1992; Hope 1993; Kramer et Crofts 1994; voir *figure 8*).

En état stationnaire on estime que, dans le complexe b_6f , la molécule de plastoquinol générée au site Q_1 se déplace très rapidement vers le site Q_0 , où a lieu sa réoxydation, sans échange avec le bassin de plastoquinones (Rich et al. 1992).

3.5 Photosystème I

Le PSI est constitué par un hétéro-dimère protéique dont les deux polypeptides ont une masse d'environ 83 kDa chacun et sont codés par les gènes *PsaA* et *PsaB* (voir *figure 9*). Ils portent la plupart des groupes prosthétiques impliqués dans le transfert des électrons à ce niveau. L'hétéro-dimère lie aussi de 12 à 15 molécules de β -carotène et chaque sous-unité lie 45 molécules de chlorophylle a , constituant les antennes proximales du P_{700} . Le complexe PSI assure le transfert des électrons entre la plastocyanine du lumen et la ferrédoxine (Fd) située du côté stromal. La ferrédoxine réduit ensuite le NADP^+ en donnant le NADPH, par l'intermédiaire du complexe enzymatique FNR (ferrédoxine : NADP : réductase).

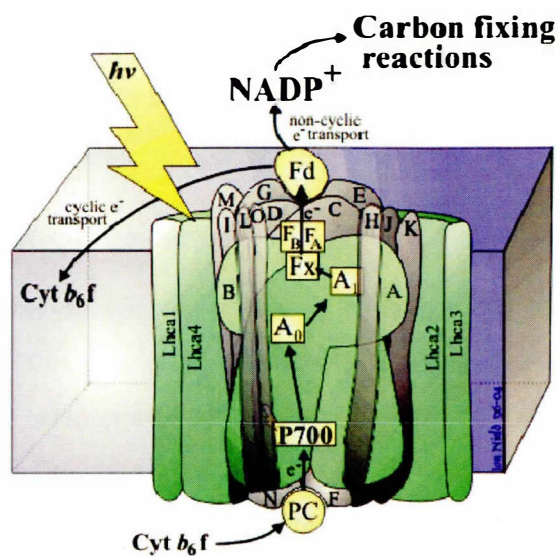


Figure 9 Les sous-unités du PSI sont marquées par une lettre qui représente le gène codant (par exemple A pour *psa A*). Les flèches indiquent le trajet du transfert d'électrons. La ferredoxine (Fd) peut se dissocier pour interagir avec la ferredoxine-thiorédoxine oxydo-réductase (gracieuseté Jon Nield).

CHAPITRE IV

FLUORESCENCE ET INDUCTION DE FLUORESCENCE

4.1 Fluorescence chlorophyllienne

L'absorption d'un photon du spectre UV ou Visible par des molécules chromophores, comme c'est le cas de la chlorophylle, provoque la transition de ces molécules vers l'état excité singulet (S_1 , S_2 etc.) dont la durée de vie est de l'ordre de la nanoseconde. L'excitation migre dans l'antenne chlorophyllienne (environ 200 à 320 chlorophylles par centre réactionnel). Les quanta d'excitation sont soit convertis photochimiquement, soit ré-émis sous forme de fluorescence, $\lambda_{\text{rad. absorbée}} < \lambda_{\text{rad. émise}}$ (pour une revue voir Horton et Bowyer 1990; Krause et Weiss 1991), soit dissipés sous forme de chaleur (*voir figure 10*).

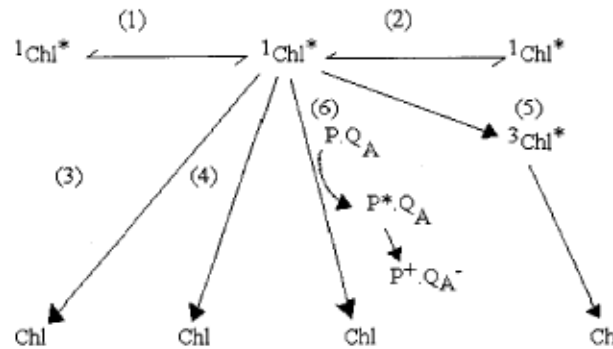


Figure 10 Diagramme des différents chemins de désexcitation d'une chlorophylle excitée : transfert d'énergie 1) à une Chl voisine du même complexe, 2) à une Chl voisine d'un autre complexe, 3) par fluorescence (désexcitation radiative), 4) par dissipation de chaleur, 5) par formation de l'état triplet et 6) à un centre réactionnel ouvert (conversion photochimique).

Comme ces processus sont compétitifs, le rendement de la fluorescence est inversement dépendant de l'activité photochimique et peut être calculé par l'expression :

$$\Phi F = k_f / (k_f + k_{pi} + k_{te} + k_p)$$

où k_i sont les constantes de vitesse k_f de fluorescence, k_{pi} des processus internes tels que croisements intersystème ou conversion interne, k_{te} du transfert d'énergie et k_p des processus photochimiques. Dans des conditions optimales et sous éclairage faible, les processus photochimiques primaires se produisent avec une efficacité très haute. Dans une feuille adaptée à l'obscurité, le rapport de la fluorescence variable à la fluorescence maximum $F_v/F_m = 0,832 \pm 0,004$ à 692 nm (Bjorkman et Demmig 1987), ce qui correspond au rendement quantique maximum du PSII (Genty et al. 1989).

A la température ambiante, la plus grande partie de l'émission de fluorescence est due au PSII. Elle possède un maximum à 685 nm correspondant à l'émission $S_1 \rightarrow S_0$ de la chlorophylle a . La contribution à la fluorescence du PSI se produit à 730 nm (la fluorescence constante, émise par les pigments des antennes) et seulement 1-2% du rendement de fluorescence à 685 nm est dû au PSI, car elle est normalement éteinte par le centre réactionnel (Holzwarth 1990), sauf à très basses températures.

La raison de l'utilisation de la fluorescence chlorophyllienne pour l'étude du PSII est due au fait que son rendement dépend principalement de l'état redox de l'accepteur quinonique primaire Q_A (Duysens et Sweers 1963) : le rendement de fluorescence est bas (F_0) lorsque Q_A est oxydée (centres ouverts), tandis qu'il monte à une valeur maximale (F_m) si Q_A est réduit (centres fermés) et quand la majorité du bassin de plastoquinones est réduit ($PQ \rightarrow PQH_2$). Cela correspond respectivement à l'atténuation (extinction) photochimique q_p et à l'atténuation non-photochimique q_N . Plus récemment, d'autres atténuations, non photochimiques celles-la, ont été mis en évidence, notamment l'atténuation électrochimique q_E liée à la formation du gradient de protons (pour une revue, voir Ruban et Horton 1995; Owens 1996).

4.2 Induction de fluorescence : effet Kautsky

L'évolution de F_0 à F_m est dénommée l'induction de fluorescence et la différence $F_m - F_0$ constitue la fluorescence variable F_v . Le rendement minimal de fluorescence F_0 , attribué principalement à la fluorescence des Chl *a* des antennes du PSII (Munday et Govindjee 1969; Butler 1978), est mesurable au début de l'éclairement ou lorsque l'intensité du faisceau de mesure est suffisamment faible pour ne pas provoquer des effets actiniques. Cette augmentation de fluorescence est multiphasique dans les premières secondes d'éclairement (*voir figure 11*). Elle présente les phases O→J et J→I, correspondant à la réduction de Q_A (pour une revue, voir Lavergne et Leci 1993), mais cela n'est vrai qu'en faible lumière. En effet le niveau I augmente avec l'intensité d'excitation, et il représente un équilibre transitoire entre la réduction de Q_A et sa réoxydation par les plastoquinones.

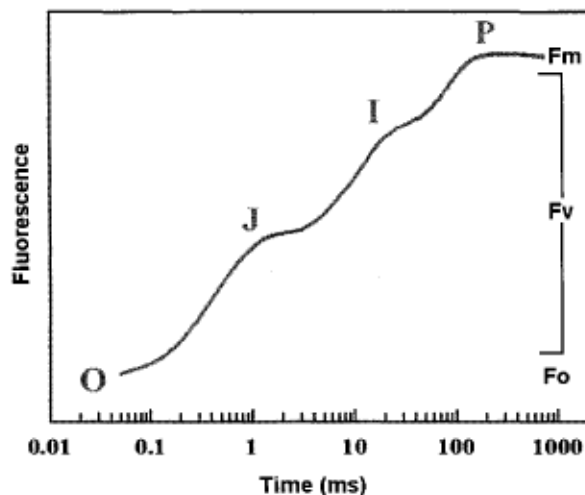


Figure 11 L'induction de fluorescence (effet Kautsky, cinétique rapide).

La phase I→P correspond à l'épuisement des plastoquinones capables de réoxyder Q_A^- , aboutissant à une réduction complète de l'accepteur primaire ($q_p = 0$). L'ensemble est appelé effet Kautsky. Le rendement de la réaction photochimique au niveau du PS-II est défini par la relation :

$$\Phi P_o = k_p / (k_f + k_{pi} + k_{ie} + k_p) = (\Phi F_m - \Phi F_0) / \Phi F_m = F_v / F_m.$$

F_v / F_m , l'efficacité de piégeage des photons par les centres PSII, est un paramètre caractéristique de l'état physiologique de l'appareil photosynthétique. Pour des nombreuses espèces et écotypes sains de plantes supérieures, il est remarquablement constant ($0,832 \pm 0,004$; pour des mesures faites à 77K) (Bjorkman et Demmig 1987). Pour des plantes en bon état physiologique, il est généralement compris entre 0,75 et 0,85 à température ambiante.

L'aire complémentaire au-dessus de courbe Kautsky, entre F_0 et F_m reflète le degré de réduction du bassin de plastoquinones (Lavorel et Etienne 1977). Si le transfert d'électrons est bloqué par le DCMU au niveau du site Q_B , cette aire va diminuer considérablement, car aucune ré-oxydation de Q_A^- n'aura lieu. La montée $F_0 \rightarrow F_m$ est beaucoup plus rapide en présence de DCMU et F_0 est légèrement plus élevé.

4.3 L'atténuation (« quenching ») de la fluorescence

L'atténuation dû à Q_A oxydé est l'atténuation photochimique (q_p) :

$$q_p = (F_m - F) / (F_m - F_0)$$

A part Q_A^- / Q_A , il y a d'autres facteurs qui influencent le rendement de fluorescence des antennes. Les phénomènes produisant une diminution du ΦF lorsque les centres sont fermés constituent l'atténuation non-photochimique (q_N) de la fluorescence chlorophyllienne, dont la définition est (Van Kooten et Snel 1990) :

$$q_N = 1 - (F_m' - F_0') / (F_m - F_0)$$

F_0' et F_m' étant respectivement le niveau minimal et maximal de fluorescence lorsque le matériel est éclairé. Une augmentation du q_N correspond à une diminution de F_v (*voir figure 12*) : ceci indique un abaissement de l'efficacité photochimique des centres

ouverts. Pour éviter d'avoir à déterminer F_0' , l'atténuation non-photochimique est généralement estimée par le rapport (Krause et al. 1982; Schreiber et al. 1986) :

$$NPQ = (F_m - F_m') / F_m'$$

L'efficacité quantique de la photochimie du PSII est donnée par l'expression (Genty et al. 1989) :

$$\Phi_{PSII} = q_p (F_v / F_m) = (F_m' - F) / F_m'$$

F étant le niveau de fluorescence à un instant donné de la courbe d'induction, et F_m' le niveau maximum lorsque tous les centres PSII sont fermés, i.e. $q_p = 0$, $q_N \geq 0$.

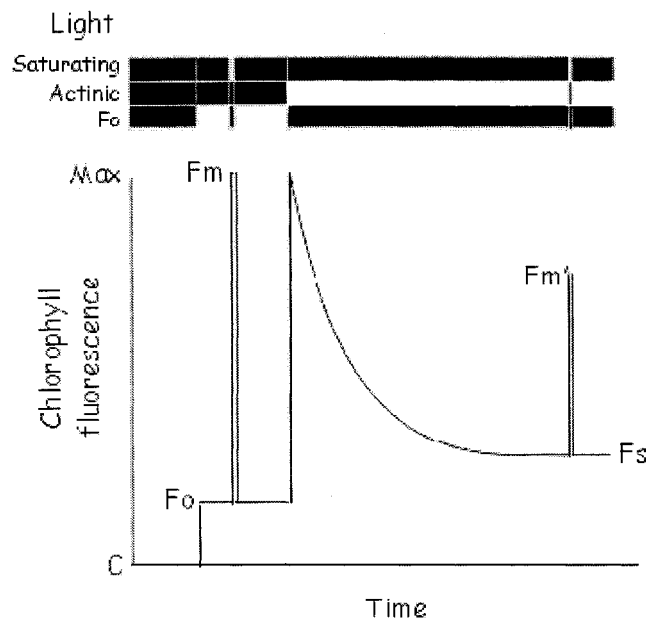


Figure 12 Schéma représentant des résultats qui permettront d'analyser l'atténuation de la fluorescence chlorophyllienne en utilisant la méthode de pulses saturants (gracieuseté Julie Scholes).

Une classification des atténuations de la fluorescence chlorophyllienne peut être faite en quatre classes principales (Walters et Horton 1991; Dau 1994) :

- q_P : atténuation photochimique lié à l'état redox de l'accepteur primaire Q_A .
- q_E : atténuation énergétique ou le atténuation dépendant du ΔpH (Briantais et al. 1979; Krause et al. 1982). La cinétique d'apparition est de l'ordre de la dizaine de secondes et sa relaxation est plus lente : de quelques minutes à quelques dizaine de minutes selon la température.
- q_T : atténuation liée à une transition d'états Etat II - Etat I régulée par la phosphorylation d'une partie des complexes LHCII (Allen et al. 1981). Son temps de demi-relaxation est d'environ 10 minutes.
- q_I : atténuation de photoinhibition dont le temps de demi-relaxation est de l'ordre de quelques heures.

CHAPITRE V

THERMOLUMINESCENCE

La thermoluminescence (TL) est l'apparition d'une émission lumineuse se produisant à des températures caractéristiques quand des matériaux organiques ou inorganiques préalablement illuminés à de basses températures sont chauffés graduellement dans l'obscurité. Ce phénomène est commun à tous les semi-conducteurs sensibles à la lumière et est connu comme étant le résultat d'une recombinaison activée thermiquement entre des électrons et des trous positifs qui sont générés par des réactions photochimiques et emprisonnés ou stabilisés à basse température.

Dans des échantillons photosynthétique, l'apparition d'une émission lumineuse se produit à différentes températures, montrant des tracés de luminescence différents composés de plusieurs bandes d'émission qui dépendent des conditions de pré-illumination. À travers des études exhaustives depuis 20 ans, plusieurs bandes de la TL photosynthétique ont été isolées et bien caractérisées. Il est maintenant pleinement établi que la plupart des composantes (bandes) de la TL photosynthétique résultent de l'inversion de la séparation de charges (induite par la lumière dans le PSII) qui est une recombinaison activée thermiquement entre les charges positives accumulées dans les intermédiaires du système d'oxydation de l'eau du côté donneur (D) et les charges négatives stabilisées sur les accepteurs primaires (Q_A) ou secondaires de la quinone (Q_B) du côté accepteur (A).

Les attributions des paires de charges responsables des bandes respectives de la TL nous ont maintenant permis d'utiliser la TL comme une sonde, simple mais efficace, du transport d'électrons du PSII qui fournit des informations uniques et valables autant des côtés donneur et accepteur du PSII. Nous passerons en revue les connaissances actuelles de la TL photosynthétique et nous discuterons de quelques nouveaux secteurs potentiels de recherches auxquels la technique de la TL peut être appliquée.

5.1 Origines de la TL photosynthétique

Les premiers à avoir observé la TL avec des échantillons photosynthétiques sont Arnold et Sherwood en 1957. Cette découverte succédait à la découverte de la luminescence retardée observée dans des chloroplastes par Strehler et Arnold en 1951. Dans leurs études précédentes, ils avaient remarqué que la courbe de luminescence d'échantillons photosynthétiques se composait de plusieurs bandes de TL ayant des températures d'émission différentes, indiquant la participation de plus de deux espèces de paires de charges dans la TL photosynthétique. Ils ont également indiqué que ces composantes (bandes) de TL provenaient en grande partie du PSII, mais pas du PSI.

Cependant, une caractérisation plus détaillée du phénomène a dû attendre l'attribution des espèces respectives de paires de charges responsables de chaque bande de la TL. Le fait que les charges positives s'accumulent dans le CDO du PSII soient impliquées dans le phénomène de la TL photosynthétique a été suggéré la première fois lors d'observations de feuilles de gymnospermes croissants dans l'obscurité, des feuilles d'angiosperme verdies sous des éclairs intermittents grandement espacés dans le temps ou des cellules d'algues développées dans un milieu déficient en Mn ne montrant pas les bandes principales de TL, à moins que leurs noyaux de Mn inactifs soient photoactivés par exposition continue à des éclairs peu espacés dans le temps (Ichikawa et al. 1975; Inoue 1976; Inoue et al. 1976).

Cette suggestion a été confirmée par l'observation que l'intensité de la bande principale de TL présente une oscillation de période 4 (Inoue et Shibata 1977a). Cette découverte a mené à la conclusion que les états S intermédiaires spécifiques étaient les porteurs des charges positives responsables des bandes de TL (Rutherford et al. 1982), et a ainsi ouvert de nouvelles applications de la TL pour étudier le rôle des protéines extrinsèques et des autres cofacteurs dans les avancements normaux ou modifiés des états S.

Quant aux porteurs de charge négative, la première indication de la participation de deux quinones (Q_A et Q_B) du côté accepteur du PSII a été obtenue par les travaux de Rubin et Venediktov (1969). Ceux-ci ont observé une interconversion entre deux bandes

(composantes) de TL suite à un traitement au DCMU. Cette observation a été plus tard détaillée par Demeter et al. (1985a) par l'étude de mutants (plantes) résistants aux herbicides. Ils ont observé une diminution significative de la température maximale de TL chez les mutants, indiquant une modification significative des propriétés de liaisons de Q_B qui se produit lorsque quelques acides aminés sont remplacés dans la protéine D_1 .

Soutenue par ces découvertes, la TL photosynthétique est maintenant devenue un outil simple mais efficace du PSII extensivement utilisée non seulement pour des recherches fondamentales en biophysique mais également pour aider les recherches sur l'environnement et les OGMs (pour une revue, voir Misra et al. 2001).

5.2 Formation et stabilisation des paires de charges dans le PSII

Le centre réactionnel (CR) du PSII se compose de quatre protéines membranaires : l'unité D_1 , l'unité D_2 , le cytochrome b_{559} et le produit du gène de *psbI*, dans lesquelles les chromophores prosthétiques fonctionnels et les quinones acceptrices sont censés être maintenus dans une position symétrique comme dans le CR des bactéries photosynthétiques pourpres. Cependant, afin de maintenir le noyau de Mn fonctionnel, et de ce fait ses capacités d'oxydation de l'eau, beaucoup plus de protéines membranaires et une protéine extrinsèque associées au CR sont requises (*voir figure 13*).

La capture d'un photon par une chlorophylle du PSII a comme conséquence l'excitation du donneur primaire d'électron, P_{680} , lequel provoque la séparation de charges rapide entre P_{680} et Pheo (l'accepteur primaire du PSII) en quelques picosecondes. L'état de séparation de charges est alors stabilisé pendant environ 300 picosecondes par un transfert rapide d'électron de $Pheo^-$ vers Q_A (la quinone accepteur primaire d'un électron du PSII), qui est alors suivi de près par un transfert de l'électron vers Q_B (la quinone accepteur secondaire de deux électrons du PSII) en 100-200 microsecondes. Q_B réduit (Q_B^-) est stable pendant environ 10 secondes voir même plusieurs heures à la température ambiante et constitue le piège principal des charges négatives dans les phénomènes photosynthétiques de TL. Q_A^-

ne constitue pas un piège en raison de sa vie courte, à moins que le transport d'électron entre la Q_A et Q_B soit bloqué, par exemple par des herbicides. Suite à une deuxième capture d'un photon et à la même séquence photochimique dans le CR, Q_B^- est réduit en Q_B^{2-} , mais cette espèce est facilement remplacée par un plastoquinone (PQ) du bassin qui ne participe pas à la TL photosynthétique dans des conditions normales.

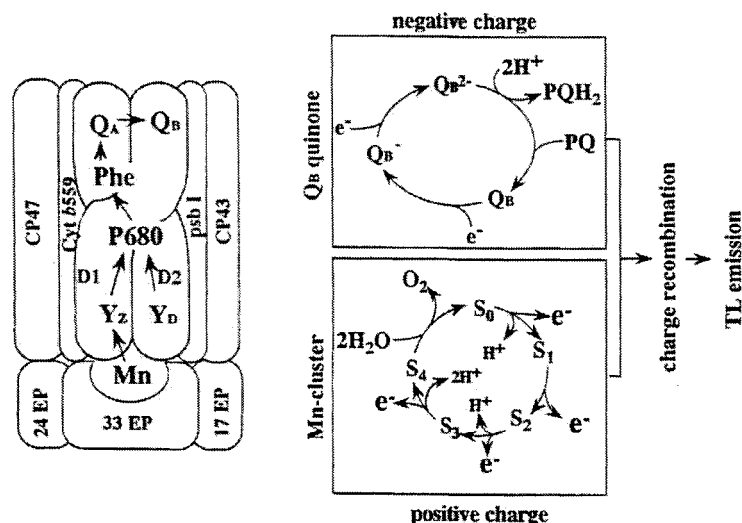


Figure 13 *Transport d'électrons généré par la lumière dans le PSII qui modifie l'état redox du côté accepteur et fait avancer les états S du côté donneur. Différentes bandes de TL sont le produit de recombinaison entre certaines charges positives du côté donneur et certaines charges négatives du côté accepteur.*

La stabilisation de l'état de charges séparées se produit également du côté donneur du PSII. Le radical cationique de P₆₈₀, P_{680}^+ , est réduit par Y_z , le résidu Tyr161 de la protéine D₁, et Y_z^+ est alors réduit par le transfert d'un électron du noyau de Mn du CDO, constitué de quatre atomes de Mn. Le noyau de Mn comporte cinq états redox dénotés S_i ($i = 0$ à 4), avec S_0 et S_4 comme le plus bas et le plus élevé état d'oxydation, respectivement. L'activité photochimique répétée au CR du PSII avance les états S un par un à chaque étape, et l'extraction de quatre électrons de deux molécules d'eau a comme conséquence le dégagement d'une molécule d' O_2 . Parmi les cinq états S intermédiaires, S_0 (aucune charge positive) et S_1 (une charge positive) sont stables dans des conditions d'adaptation à l'obscurité, mais ils ne participent pas à la TL. Tandis que les états S_2 et S_3 portent

l'équivalent d'une charge positive et sont stables pendant une dizaine de secondes à la température ambiante, de sorte qu'ils constituent la source principale des charges positives à l'origine de la TL photosynthétique.

Le modèle de dégagement de protons couplés au cycle du système des états S a été postulé pour être 1, 0, 1, 2 basé sur des travaux précédents (Fowler 1977; Saphon et Crofts 1977; Forster et Junge 1985), mais ceci a été récemment contesté. Le modèle de dégagement de protons explique la variété de phénomènes d'émission de TL photosynthétique connus jusqu'ici. Basé sur ce modèle de dégagement de protons, les espèces stables des états S reconnues qui portent l'équivalent d'une charge positive (contribuant à la TL photosynthétique) sont supposées être les états S₂ et S₃.

À part Y_Z, un autre donneur secondaire auxiliaire à P₆₈₀ est connu; le résidu redox-actif Tyr160 de la protéine D₂ dénoté Y_D. Sa forme oxydée (connue sous le nom de EPR Signal IIs) est stable dans l'obscurité à la température ambiante et a été désignée comme un participant à la TL (Demeter et al. 1993; Krieger et al. 1993; Johnson et al. 1994). Le cytochrome *b*-559 et certaines molécules de chlorophylle entourant le CR du PSII sont connues comme étant photooxydables dans certaines conditions. Cependant, leurs produits d'oxydation ne semblent pas constituer un piège de charges positives à l'origine de la TL, bien que leur formation par la photochimie du CR puisse être une source d'électrons pour réduire la Q_A (ou le Q_B) au lieu du noyau de Mn, et de ce fait, moduler indirectement le phénomène de la TL.

5.3 Émission de la TL par la recombinaison activée thermiquement (liens avec la fluorescence retardée)

Au tout début, le phénomène de la TL et la fluorescence retardée (DL) étaient considérés comme ayant une origine commune (Arnold 1991), un dégagement radiatif d'énergie emmagasinée suite à la recombinaison entre donneurs et accepteurs stabilisés au CR photochimique. Dans le PSII, le produit de base de la séparation de charges induites par la lumière est une paire singulet radicale [P₆₈₀⁺Pheo⁻], qui amène rapidement à la stabilisation

de l'équivalent d'une charge positive (donneur oxydé D^+) et négative (accepteur réduit A^-), et remet le CR dans son état fondamental. Pendant ce temps, la majeure partie de l'énergie capturée par la réaction photochimique est emmagasinée dans le système sous forme de différence de potentiel redox, tandis qu'une partie de l'énergie est perdue (énergie de stabilisation), tout cela résultant en un piégeage d'une paire de charges séparées (D^+A^-). Cette paire séparée possède une barrière d'énergie d'activation contre la recombinaison. Lorsque cette déperdition d'énergie libre est compensée par une activation thermique, la paire de charges de D^+A^- devient capable de se recombiner pour re-exciter le P_{680} , amenant à l'activation du P_{680}^* (ou d'une chlorophylle voisine du CR) qui est un complexe actif pour la TL photosynthétique (voir figure 14).

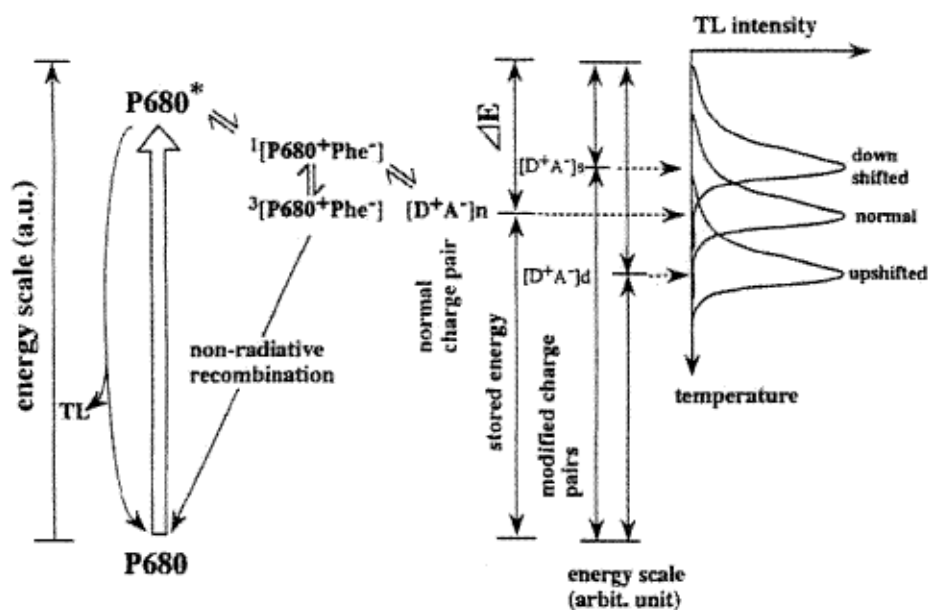


Figure 14 Diagramme énergétique de la TL et modulation du maximum de température. $[D^+A^-]_s$ et $[D^+A^-]_d$ indiquent les paires de charges stabilisées ayant un plus petit (*s-shallower*) et un plus grand (*d-deeper*) piège énergétique dû à des modifications au PSII comme une mutation, une dénaturation ou le retranchement d'un co-facteur essentiel.

Le processus de recombinaison de D^+A^- n'est pas encore bien compris, mais on considère généralement que ce processus passe par une série d'équilibre à travers un nombre variable

d'états intermédiaires de charges séparées (deVault et al. 1983; deVault et Govindjee 1990) pour produire finalement la paire de radicaux $P_{680}^+P_{heo}^-$ dans la configuration singulet ou triplet. Parmi les paires de radicaux avec deux configurations de spins différentes, la configuration triplet se recombine de façon non radiative pour retourner à l'état fondamental P_{680} , tandis que la configuration singulet est capable de produire la configuration singulet activée P_{680}^* (Van Gorkom 1985), de sorte qu'ils puissent contribuer à la TL ou à la fluorescence retardée. Nous pouvons considérer ainsi que la fluorescence retardée et la TL sont les deux expressions différentes du même processus :

- La DL est due à la recombinaison spontanée à un rythme constant (habituellement bas) qui est limitée par le taux d'approvisionnement en énergie thermique de l'environnement à une température donnée;
- La TL est due à la recombinaison à des fréquences plus élevées et accélérées avec l'élévation de la température pendant un chauffage artificiel. En fait, une oscillation similaire de période 4 a été observée pour les deux phénomènes. Ceci a été également confirmé par des analyses des spectres d'émission de la fluorescence retardée (Hideg et al. 1991) et de TL (Sonoike et al. 1991).

5.4 Mesures et analyses de la TL

La TL photosynthétique peut être enregistrée avec une installation simple. Contrairement à la mesure de la fluorescence retardée, elle n'exige aucun système de commande de synchronisation, ni un photomultiplicateur déclencheur, ni un enregistreur transitoire. Le facteur le plus important est le refroidissement du photomultiplicateur afin d'augmenter le rapport signal/bruit en diminuant l'effet du courant parasite. L'utilisation d'un compteur de photons, d'un thermomètre numérique équipé d'un système de ROM de linéarisation et d'un ordinateur pour l'acquisition de données/analyse est préférable, mais tout cela n'est pas nécessaire. Un contenant ayant une petite capacité thermique est recommandé pour pouvoir refroidir rapidement les échantillons après l'illumination.

Un disque de feuille adapté à l'obscurité ou un morceau de papier filtre imbibé d'une suspension adaptée à l'obscurité (20 µg de chlorophylle) est fixé à un support près duquel un petit réchaud (50 W) est installé. On procède à l'illumination avec un ou plusieurs court(s) éclair(s) (quelques microsecondes de durée à une température constante (habituellement -40 à +25 °C) puis introduit avec le support en l'immergeant dans l'azote liquide. L'échantillon refroidi (avec le support) est alors placé en sorte que l'image de l'échantillon soit focalisée sur la surface du photomultiplicateur par un fort objectif. L'échantillon est alors chauffé graduellement à un taux constant de 0.5 à 1.0 °C par seconde au moyen du réchaud installé près du support. L'émission de TL est mesurée avec le photomultiplicateur tout en enregistrant la température de l'échantillon avec un thermocouple. L'intensité de la TL en fonction de la température de l'échantillon est enregistrée sur un enregistreur X/Y, ou au besoin, par un ordinateur. Mais avec un support de petite capacité thermique, il n'est pas facile d'obtenir un taux de chauffage constant. Il est préférable de maintenir la température constante autour du support par n'importe quel moyen. En raison de cette difficulté et de bien d'autres (deVault et al. 1983), les températures des bandes de TL rapportées par divers laboratoires sont variables. Cependant, la détection de la variation de quelques degrés dans la température maximale n'est pas cruciale si une série de mesures est réalisée sur la même installation dont l'utilisation est faite dans le souci de maintenir la reproductibilité des résultats.

5.5 Simulation des courbes de TL

La cinétique du processus photosynthétique de la TL a été décrite par diverses approches (Vass et al. 1981; deVault et al. 1983; deVault et Govindjee 1990). Elle est simplement basée sur un modèle développé pour des phénomènes de TL dans les systèmes de l'état solide. Parmi ces approches, celle développée par Vass et al. (1981) est très utile pour les applications pratiques dans lesquelles les équilibres multiples compliqués sont traités comme un seul équilibre du premier ordre.

$$I_{TL} = cT \cdot \exp\left\{-Ea/kT - (skT^3/BEa) \cdot \exp(-Ea/kT)\right\}$$

où I_{TL} , T , k et B sont des paramètres mesurés ou constants; l'intensité de TL, la température absolue, la constante de Boltzmann et la rampe de chauffage, respectivement. En changeant c (constante de proportionnalité), E_a (énergie d'activation) et s (facteur de fréquence) comme paramètres de simulation, nous pouvons simuler une courbe de luminescence avec une exactitude suffisante pour résoudre les bandes de recouvrement de TL et pour déterminer également l'énergie d'activation pour chaque bande TL. Un logiciel efficace pour l'analyse graphique et numérique des courbes de luminescence de TL a été développé (Ducruet et Miranda 1992). Ces simulations de courbe de luminescence nous fournissent les paramètres requis pour calculer le temps de demi-vie d'une paire de charges basée sur l'équation ci-dessus, qui nous permet de confirmer la validité de ces analyses (*voir tableau 1*).

Table 1. Stabilization energies and half-lives of thermoluminescent charge pairs derived from TL glow curve simulation.

TL band	Charge pair	Stabilization energy	Half life	
			Calculated	Observed
Z _v -band	P680 ⁺ Q _A ⁻	~0.5 V	~200 μs	~150 μs
Q-band	S ₂ Q _A ⁻	~0.78 V	~2.5 s	~2 s
B ₂ -band	S ₂ Q _B ⁻	~0.86 V	~40 s	~60 s
C-band	Y _D ⁺ Q _A ⁻	~0.94 V	~12 min	~10 min

Tableau 1 *Énergies de stabilisation et temps de demi-vie de différentes paires de charges luminescentes dérivées de simulation de courbes de TL (Inoue 1995)*

Parmi ces paramètres dérivés des mesures de la TL, la température maximale d'une bande nous fournit l'information la plus utile. Cependant, les températures maximales des bandes ont jusqu'ici été rapportées par divers laboratoires et diffèrent significativement :

- La première raison de cela est d'ordre théorique, la différence dans la rampe de chauffage utilisée (deVault et al. 1983);

- La deuxième raison est d'ordre technique, par exemple la différence dans le positionnement du thermocouple autour de l'échantillon ou du support.

En dépit des différences, une variation dans la température maximale induite dans un échantillon traité peut facilement et correctement être détectée en comparant avec un échantillon non traité (contrôle), quand la même configuration de l'appareil est employée. Un décalage de la température maximale d'une bande de TL vers les plus hautes températures indique qu'une plus grande énergie d'activation est exigée pour recombiner la paire de charges séparées, indiquant qu'un piège énergétique plus profond a été induit par le traitement, alors qu'un décalage vers les plus basses températures indique qu'un piège moins profond a été induit. Si nous supposons que le traitement utilisé a un effet sélectif du côté de donneur ou accepteur du PSII, une variation dans la température maximale de la bande de TL peut être directement interprétée comme un changement du potentiel redox de l'espèce positivement ou négativement chargée respectivement : des pièges plus profonds et moins profonds du côté de donneur correspondent à des potentiels redox plus et moins élevés de l'espèce positivement chargée, et ceux sur le côté accepteur à des potentiels redox moins et plus élevés respectivement.

En fait, il n'est pas toujours facile de limiter l'effet d'un traitement à un côté du PSII. Cependant, en tirant profit des deux accepteurs de quinone du côté accepteur de PSII, nous pouvons comparer l'effet d'un traitement sur la température maximale de TL entre les paires de charges $S_2Q_A^-$ et $S_2Q_B^-$. Si le même décalage ou un décalage similaire est détecté pour les deux bandes de TL, nous pouvons conclure que le décalage est dû à un changement du potentiel redox des espèces positivement chargées du côté donneur avec aucun ou peu d'effets sur les espèces négativement chargées du côté accepteur.

5.6 Analyse des oscillations dans l'intensité de la TL

Dans le PSII adapté à l'obscurité, la paire redox S_1Q_B est habituellement l'espèce la plus dominante parmi les CR. Quand un CR est exposé à une série d'éclairs courts, les paires

redox prévues après 1, 2, 3 et 4 éclairs sont $S_2Q_B^-$, S_3Q_B , $S_0Q_B^-$ et S_1Q_B , respectivement. Puisque S_2 et S_3 sont les espèces positivement chargées, la probabilité de la stabilisation des charges positives du côté donneur oscille en suivant le modèle 1, 1, 0, 0, tandis que la probabilité de la stabilisation des charges négatives du côté accepteur oscille suivant le modèle 1, 0, 1, 0, dû au mécanisme à deux électrons de la quinone Q_B . Ainsi la probabilité de stabilisation des charges positives et négatives au CR du PSII, qui est un préalable à l'émission de la TL, oscille en suivant le modèle 1, 0, 0, 0.

Dans les préparations de PSII, ce modèle est perturbé par plusieurs facteurs :

- i. Distribution initiale de $Q_B^-:Q_B$,
- ii. Distribution initiale de $S_0 : S_1$,
- iii. La probabilité des ratés et des doubles touchés,
- iv. Le ratio du rendement de TL des recombinaisons de charges entre $S_2Q_B^-$ et de $S_3Q_B^-$.

De ces facteurs, les facteurs (ii) à (iv) sont la plupart du temps constants : $S_0:S_1 = 25:75$, les ratés et les doubles touchés sont autour de 10% et 5%, respectivement, et le rapport de rendement de TL de $S_2Q_B^-:S_3Q_B^- = 1:1.7$. En revanche, le rapport initial de $Q_B^-:Q_B$ change selon les conditions de l'échantillon et leur adaptation : 50:50 dans les thylacoïdes après une brève adaptation à l'obscurité ou dans une longue adaptation à l'obscurité pour des chloroplastes intacts, tandis qu'elle est 25:75 dans les thylacoïdes longuement adaptés à l'obscurité ou dans des fragments de membrane de PSII.

A. Thylacoïdes longuement adaptés à l'obscurité ($S_0:S_1 = Q_B^-:Q_B = 25:75$)

Obscurité	1 éclair	2 éclairs	3 éclairs	4 éclairs	5 éclairs	6 éclairs	7 éclairs
1 S_0Q_B	1 $S_1Q_B^-$	1 S_2Q_B	1 $S_3Q_B^-*$	1 S_0Q_B	1 $S_1Q_B^-$	1 S_2Q_B	1 $S_3Q_B^-*$
1 $S_0Q_B^-$	1 S_1Q_B	1 $S_2Q_B^-*$	1 S_3Q_B	1 $S_0Q_B^-$	1 S_1Q_B	1 $S_2Q_B^-*$	1 S_3Q_B
5 S_1Q_B	5 $S_2Q_B^-*$	5 S_3Q_B	5 $S_0Q_B^-$	5 S_1Q_B	5 $S_2Q_B^-*$	5 S_3Q_B	5 $S_0Q_B^-$
1 $S_1Q_B^-$	1 S_2Q_B	1 $S_3Q_B^-*$	1 S_0Q_B	1 $S_1Q_B^-$	1 S_2Q_B	1 $S_3Q_B^-*$	1 S_0Q_B
0 TL	5 TL	2 TL	1 TL	0 TL	5 TL	2 TL	1 TL

B. Thylacoïdes brièvement adaptés à l'obscurité ($S_0:S_1 = 25:75$, $Q_B^-:Q_B = 50:50$)

Obscurité	1 éclair	2 éclairs	3 éclairs	4 éclairs	5 éclairs	6 éclairs	7 éclairs
1 S_0Q_B	1 $S_1Q_B^-$	1 S_2Q_B	1 $S_3Q_B^-*$	1 S_0Q_B	1 $S_1Q_B^-$	1 S_2Q_B	1 $S_3Q_B^-*$
1 $S_0Q_B^-$	1 S_1Q_B	1 $S_2Q_B^-*$	1 S_3Q_B	1 $S_0Q_B^-$	1 S_1Q_B	1 $S_2Q_B^-*$	1 S_3Q_B
3 S_1Q_B	3 $S_2Q_B^-*$	3 S_3Q_B	3 $S_0Q_B^-$	3 S_1Q_B	3 $S_2Q_B^-*$	3 S_3Q_B	3 $S_0Q_B^-$
3 $S_1Q_B^-$	3 S_2Q_B	3 $S_3Q_B^-*$	3 S_0Q_B	3 $S_1Q_B^-$	3 S_2Q_B	3 $S_3Q_B^-*$	3 S_0Q_B
0 TL	3 TL	4 TL	1 TL	0 TL	3 TL	4 TL	1 TL

Tableau 2 *Changement dans le motif d'oscillation de période 4 de la bande B en fonction du nombre de centres réactionnels du PSII capable de luminescence après une série d'éclairs pour des thylacoïdes longuement et brièvement adaptés à l'obscurité. Les ratés et les doubles touchés sont négligés. L'étoile (*) indique les centres réactionnels luminescents. Pour la section A et B, la première ligne en gris indique le nombre d'éclairs et la deuxième indique le nombre de centres réactionnels luminescents.*

Le **tableau 2** décrit les changements prévus du nombre de CR capables d'émettre de la TL, quand des préparations de PSII adaptées à l'obscurité ayant deux ratios typiques initiaux $Q_B^-:Q_B$ sont illuminés avec une série d'éclairs. La distribution de Q_B^- aux CR pour S_0 et S_1 est considérée la même, et les ratés et les doubles touchés sont négligés. Le nombre de CR émettant de la TL montre des maximums après le 1^{ier} et 5^{ième} éclairs si le ratio initial de $Q_B^-:Q_B = 25:75$ ou après le 2^{ème} et 6^{ème} éclairs si le ratio initial de $Q_B^-:Q_B = 50:50$. Quand les ratés et les doubles touchés et la différence dans le rendement de luminescence sont pris en considération, les modèles d'oscillation représentés dans la **figure 15** à la page suivante sont obtenus. Ces modèles sont conformes à ceux observés, soutenant les mécanismes de l'oscillation de la TL et alternativement les attributions de la bande B (Inoue 1983; Demeter

et Vass 1984). Suite à un traitement inhibiteur, la perte de quelques cofacteurs essentiels ou des mutations dans le PSII, l'oscillation dévie des modèles standard, ce qui fournit des informations sur le fonctionnement du cycle des états S et du mécanisme à deux électrons de Q_B dans le PSII inhibé ou modifié.

5.7 Attributions des bandes de TL aux paires de charges

Les composants de la TL sont distinguables par leurs bandes respectives d'émission sur la courbe de luminescence qui montre les températures caractéristiques pour l'émission maximum. Pour plusieurs de ces composantes, les paires de charges responsables ont été identifiées (*voir tableau 3*). Dans les points suivants, nous discuterons de l'information disponible au sujet des propriétés des bandes respectives de la TL.

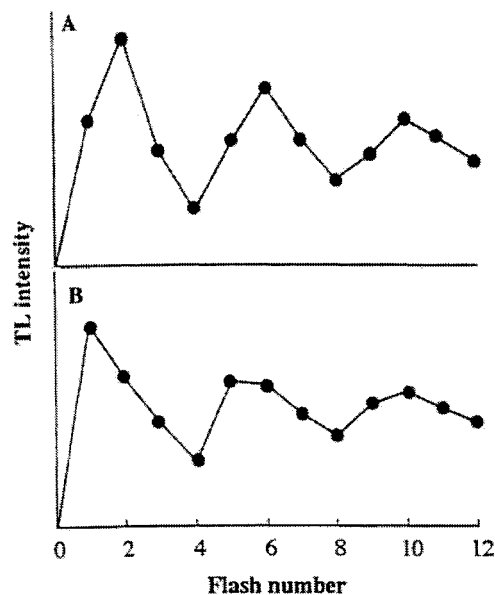


Figure 15 Motif d'oscillation de période 4 typique de la bande B résultant de l'application plusieurs éclairs. Le panneau A correspond à un échantillon de thylacoïdes brièvement adapté à l'obscurité ou à un échantillon de chloroplastes et le panneau B à un échantillon de thylacoïdes longuement adapté à l'obscurité.

5.7.1 La bande B ($T_m \sim 35^\circ\text{C}$)

La bande B, qui apparaît à environ $+35^\circ\text{C}$, est la bande la mieux caractérisée de la TL photosynthétique. Cette bande est clairement corrélée avec le complexe de dégagement d'oxygène (Inoue et Shibata 1977a), particulièrement en présence de Mn fonctionnellement actif (Inoue 1976; Rozsa et Demeter 1982), et a été associée à la recombinaison de charge de $S_2Q_B^-$ et de $S_3Q_B^-$ (Rutherford et al. 1982, 1985). Après une excitation par plusieurs éclairs saturants, l'intensité de la bande B montre une période 4 d'oscillation dans les thylacoïdes (Inoue et Shibata 1977a; 1977b; Demeter et Vass 1984; Demeter et al. 1984), dans des feuilles intactes et des fragments de membranes enrichies de PSII (Rutherford et al. 1984). L'analyse du modèle d'oscillation indique que les états S_2 et S_3 sont impliqués dans la production de cette bande de TL (Rutherford et al. 1982; Demeter et Vass 1984). La participation de Q_B comme piège de charge négative a été démontrée par la modulation du ratio initial de $Q_B^-:Q_B$ par le prétraitement chimique ou lumineux ou par le retrait et la reconstitution de Q_B (Rutherford et al. 1982; Demeter et Vass 1984; Wydrzynski et Inoue 1987). À un pH 7.0-7.5 ou supérieur, les recombinaisons de $S_2Q_B^-$ et de $S_3Q_B^-$ provoquent la même bande de TL en ce qui concerne la température maximale et la forme de la bande, mais au-dessous de pH 6.0, elles montrent deux bandes distinctes dénotées les bandes B_2 et B_1 , avec une différence de quelques degrés pour la température maximale (Inoue 1981). Le rendement de la TL de la dernière recombinaison est supérieure par un facteur de 1.7-2.0 du à des raisons inconnu (Rutherford et al. 1985; Demeter et al. 1985b). Le spectre d'émission des bandes B a un maximum à environ 690 nm (Sonoike et al. 1991) selon l'hypothèse que la recombinaison de $S_{2/3}Q_B^-$ re-excite la P_{680} .

5.7.2 La bande Q ($T_m \sim 0$ à 10°C à pH physiologique)

Après un traitement avec le DCMU sur le PSII ou d'autres herbicides du PSII, la bande B est supprimée tandis qu'une nouvelle bande de TL apparaît entre 0 et $+10^\circ\text{C}$ (Rubin et Venediktov 1969). Cette bande s'appelle la bande Q et provient de la recombinaison de charge de $S_2Q_A^-$ (Demeter et Vass 1984; Rutherford et al. 1982). La conversion de la bande B en bande Q est due à l'inhibition par le DCMU du transfert d'électron entre Q_A

et Q_B . Cela permet la stabilisation de Q_A^- comme charge négative détectable par la TL au lieu de Q_B^- . La bande Q est souvent utilisée pour analyser les mécanismes de stabilisation de l'état S_2 .

TL components	Peak temperature	Charge pair
Z-band	$\sim -169^\circ\text{C}$	$\text{Chl}^+ \text{Chl}^- (?)$
Z_v -band	$\sim -80 \sim -30^\circ\text{C}$ (variable)	$\text{P68O}^+ \text{Q}_A^- (?)$
A-band	$\sim -10^\circ\text{C}$	S_3Q_A^-
A_T -band	$\sim -10^\circ\text{C}$	$\text{His}^+ \text{Q}_A^-$
Q-band	$\sim +5^\circ\text{C}$	S_2Q_A^-
B_1 -band	$\sim +20^\circ\text{C}$	S_3Q_B^-
B_2 -band	$\sim +30^\circ\text{C}$	S_2Q_B^-
C-band	$\sim +50^\circ\text{C}$	$\text{Y}_D^+ \text{Q}_A^-$

Tableau 3 *Assignment de paires de charges à des bandes de TL.*

5.7.3 La bande A ($T_m \sim -20$ à -10°C)

Quand le PSII est pré-illuminé avec deux éclairs à la température ambiante, puis refroidi à -196°C (77 K), et encore illuminé avec une lumière continue à 77 K, une bande nette de TL dénotée la bande A apparaît à environ le -10°C (Läuffer et al. 1978; Inoue 1981; Demeter et al. 1985b). Cette bande a été définie comme provenant de la recombinaison de charge de S_3Q_A^- basée sur les considérations suivantes : l'illumination avec deux éclairs à la température ambiante produit un état S_3Q_B^- qui est incapable de générer un signal de TL dû à l'absence d'une charge négative (*voir tableau 2*), mais l'illumination à 77 K oxyde le cytochrome b_{559} ou la chlorophylle au lieu du noyau de Mn (dans l'état S_3) et produit Q_A^- , qui recombine avec l'état S_3 précédemment formé par l'illumination avec deux éclairs, stabilisé par le refroidissement et inchangé pendant l'illumination à 77 K (Koike et al. 1986)

5.7.4 La bande A_T

Le traitement du PSII démuné du noyau de Mn fonctionnel avec un tampon Tris émet une bande de TL à environ le -10°C (Inoue et al. 1977; Rosza et Demeter 1982). Cette bande est dénotée la bande A_T pour la distinguer d'avec la bande A qui a la même température d'émission (Koike et al. 1986). L'origine de cette bande n'était pas claire. Plus tard, il fut

proposé qu'elle résulte de la recombinaison de charge entre Q_A^- et le résidu d'histidine photooxydée d'une protéine du CR du PSII au moyen de PSII chimiquement modifié (Ono et Inoue 1991a). Cette hypothèse fut explorée plus en détails au moyen de PSII mutés et on a indiqué que la substitution de His195 et de His190 affecte l'émission de cette bande de TL (Kramer et al. 1994). L'équivalent positif de l'histidine photooxydée présente une affinité élevée pour le Mn^{2+} exogène et est proposé d'être impliqué dans le photoligation des ions de Mn^{2+} en cours de photoactivation d'un CDO latent (Ono et Inoue 1991b).

5.7.5 La bande Z_V

Une composante mineure de TL dénotée la bande Z_V apparaît entre -80 et $-30^\circ C$. La température d'émission de cette bande de TL change selon la température lors de l'excitation (Ichikawa et al. 1975), étant habituellement plus haute de 10 à $20^\circ C$ que la température d'excitation. Cette bande est supprimée par un traitement avec 1% d'éthanol et montre une période 4 d'oscillation qui dépend la vitesse d'oscillation des états S (Demeter et al. 1985b), bien qu'on rapporte que la bande provienne de la préparation de CR de PSII ($D_1/D_2/b_{559}$) déficiente en noyau de Mn (Vass et al. 1989). Bien qu'il ait été proposé que cette bande résulte de la paire de charges de $P_{680}^+Q_A^-$ dont la profondeur de piégeage est modulée par la conformation du CR, son origine n'est pas encore claire. La participation de Q_A^- comme contre-partie négative a été récemment confirmée par la reconstitution de Q_A^- artificielles dans la préparation de CR purifiée au moyen de plastoquinone-9 (PQ-9) (Chapman et al. 1991).

5.7.6 La bande C

Une composante de la TL dénotée la bande C apparaît à environ $+50^\circ C$ sur des courbes de luminescence provenant d'échantillons photosynthétiques traitées au DCMU (Desai et al. 1975). La participation de Q_A^- comme contre-partie négative est probable, si on en juge par l'augmentation de son intensité en présence d'une concentration élevée de DCMU. On rapporte que la bande C montre une période 4 d'oscillation avec des maximums avec les états S_0 et S_1 , suggérant que cette bande résulte de la recombinaison de charge de $S_{0/1}-Q_A^-$

(Demeter et al. 1984). Y_D^+ (résidu Tyr160 de la protéine D₂) a été proposée en tant que candidate pour l'équivalent positif dans des états S_0 et S_1 . Demeter et al. (1993), Krieger et al. (1993) et Johnson et al. (1994) ont rapporté que cette bande résulte de la recombinaison de charge entre Q_A^- et Y_D^+ dans le cas de PSII dépourvu de Ca^{2+} .

5.7.7 La bande Z ($T_m \sim -160^\circ C$, quand le matériel photosynthétique est éclairé à 77 K)

Une large bande de TL apparaît autour de $-160^\circ C$ quand divers échantillons photosynthétiques sont illuminés à 77 K avec une lumière continue. Cette composante, dénotée la bande Z, montre un maximum d'émission à environ 730 nm, contrairement à 690 nm de la bande B provenant d'une réaction photochimique du CR, et est excitée avec une lumière bleue à un plus grand rendement qu'avec une lumière rouge (Arnold et Azzi 1968). En élevant la température d'excitation au dessus de 77 K, seulement la partie de température la plus élevée de la bande Z apparaît, indiquant que le piège pour cette composante a une large distribution d'énergie libre stabilisatrice. Il s'est avéré récemment que LHCI et LHCII, qui n'ont aucun centre photochimique réactionnel, ou la chlorophylle purifiée (sa forme agrégée en particulier), émettent cette bande plus fortement que le PSI ou le PSII (Sonoike et al. 1991), indiquant que la bande Z n'est corrélée ni avec le CR du PSI ni avec celui du PSII. On a constaté que cette bande est préférentiellement chargée par une lumière bleue, et les charges piégées sont libérées par l'illumination avec une lumière rouge, dû probablement à un effet thermique local (Hagen et al. 1995). Cet effet pourrait être relié au mécanisme d'atténuation non-photochimique, lequel est postulé être le résultat de changements de conformation de LHC et de l'accumulation de la zéaxanthine via le cycle des xanthophylles.

5.7.8 Les bandes de TL aux températures en dessous 77 K

Trois nouvelles bandes de TL émettant au environ de 20, 50 et 70 K ont été résolues de la courbe de luminescence aux températures en dessous de 77 K, et dénotées les bandes Z_α , Z_β et Z_γ , respectivement (Noguchi et al. 1992). La courbe de luminescence excitée aux températures de l'hélium liquide montre une autre composante à environ 90 K, mais celle-

ci s'est avéré être une expression différente de la bande Z bien connue qui émet au-dessus de 77 K. Les propriétés de ces trois bandes sont essentiellement identiques à celles de la bande Z : étant préférentiellement excitées par une lumière bleue et émises plus fortement par les LHCs et les agrégats de chlorophylle. Cela suggère qu'elles proviennent du stockage de charges des molécules de chlorophylle agissant l'un sur l'autre ou avec les molécules du solvant.

5.7.9 Les bandes à hautes températures (HTL)

Deux types distincts des bandes HTL ont été rapportés dans les systèmes photosynthétiques soumis aux différents stress oxydatifs. Les bandes à $T_m \sim 75$ à 90°C (Hideg et Vass 1993; Stallaert et al. 1995; Marder et al. 1998) et les bandes à $T_m \sim 115$ à 140°C (Venediktov et al. 1989; Vavilin et al. 1991; Vavilin et Ducruet 1998; Vavilin et al. 1998). La bande à 130°C est observée pour des échantillons desséchés et correspond véritablement à la décomposition (thermolyse) radiative des peroxydes, alors que la bande HTL à ~ 75 - 90°C n'est observée que dans les échantillons maintenus humides : elle refléterait donc une compétition entre la thermolyse radiative et l'hydrolyse non-radiative des peroxydes dans cette zone de température (Ducruet et Vavilin 1999). Cette émission dans la région spectrale 650-750nm, indépendante d'une illumination préalable, est corrélée à la présence de peroxydes des lipides au niveau de la membrane thylacoïdale (Venediktov et al. 1989; Vavilin et al. 1991; Vavilin et Ducruet 1998).

5.7.10 Thermoluminescence provenant du PSI et bande AG

Une luminescence retardée (AG) induite par un rayonnement rouge lointain (far-red) a été rapportée la première fois par Bertsch et Azzi (1965). Il a été proposé que cette bande, qui est à environ 50°C , résulte du PSI puisqu'elle est induite par un éclairage à 740 nm (Desai et al. 1975). La bande AG est supprimée par le DCMU (inhibiteur de transport d'électrons du PSII) et par l'antimycine (inhibiteur de transport d'électrons du PSI) ou des découpleurs de transports cycliques (Bjorn 1971). Ceci suggère qu'en plus du PSII, le transport cyclique d'électrons et/ou le gradient de protons est impliqué dans la formation de

la bande AG. Bien que cette hypothèse n'ait pas été confirmée, une nouvelle composante TL, appelée la bande AG (afterglow), a été identifiée comme provenant du PSII, mais modulée par le transport cyclique d'électrons autour du PSI quand celui-ci est éclairé par du rouge lointain (Miranda et Ducruet 1995). Il est à noter que les bandes de TL, indépendantes du transport photosynthétique d'électrons et émises par le PSI, semblent provenir du stockage d'énergie des antennes (Sonoike et al. 1991; Noguchi et al. 1992) ou d'une chimiluminescence oxydante (Hideg et Vass 1993).

5.8 Implication du côté accepteur du PSII dans la TL

Le potentiel des couples redox Q_B/Q_B^- et Q_A/Q_A^- diffère d'environ 50-70 mV, et cette différence se manifeste sur les courbes de TL par une différences de 25-30°C dans la température d'émission entre la bande B et la bande Q, qui résultent respectivement des paires $S_2Q_B^-$ et de $S_2Q_A^-$. La stabilité énergétique des quinones réduites peut facilement être étudiée par la TL (Demeter et al. 1985a). Ces propriétés permettent d'employer la TL pour l'étude de la résistance aux herbicides.

En traitant le PSII avec des herbicides, la bande B est convertie en bande Q en raison de l'inhibition du transfert d'électron entre Q_A et Q_B . Notoirement, la température d'émission de la bande résultante Q est influencée par la structure chimique de l'herbicide utilisé : les herbicides de type phénolique induisent une bande Q émettant entre -15 et 0°C, tandis que les herbicides de type urée/triazine induisent une bande Q entre 0 et +10°C (Vass et Demeter 1982). La température plus faible du maximum de la bande Q en présence des herbicides de type phénolique peut être attribuée à un potentiel redox abaissé de Q_A/Q_A^- ou à l'accélération des réactions de désactivation dans le CDO qui affecte les propriétés des états S_2 du côté donneur du PSII. De tels effets sur la TL sont utilisés pour caractériser le mode d'action de nouveaux herbicides (Asami et al. 1988; Koike et al. 1989).

Les mutants résistants aux herbicides montrent un remarquable décalage vers les basses températures de la bande B. Dans les mutants résistants à la triazine de *Eligeron canadensis* et *Synechocystis* PCC 6714, la température d'émission de la bande B est décalée en baisse

de 15°C par rapport à celle des types sauvages (Demeter et al. 1985a). Ceci indique que la différence de potentiel redox entre Q_B/Q_B^- et Q_A/Q_A^- est diminuée de 70 à 30 mV dû à un changement structurel du site de liaison de Q_B par la mutation. L'analyse des mutants de cyanobactéries indique que la température d'émission de la bande B est grandement sensible au remplacement du résidu Ser264 de D_1 par Ala ou Gly qui induit simultanément une forte résistance aux triazines. Mais elle est plutôt immunisée contre le remplacement du résidu Phe255 par Tyr qui induit la résistance aux phenylureases, suggérant un rôle plus important du résidu Ser264 dans le site de liaison de Q_B par rapport au résidu Phe255 (Etienne et al. 1990; Gleiter et al. 1990, 1992).

5.9 Implication du côté donneur du PSII dans la TL

La génération des bandes B ($B_1 + B_2$) et la bande A implique les états S_2 et S_3 , de sorte que la température d'émission et le comportement oscillant de ces bandes de TL fournissent des informations utiles au sujet des propriétés des états S et du rôle de divers cofacteurs impliqués dans des transitions des état S.

Ces propriétés ont été utilisées la première fois pour déterminer la dépendance de la température sur la transition des états S. Lors de l'abaissement de la température ambiante, les transitions des états S deviennent inhibées. Provenant de l'oscillation de la bande B sous l'excitation d'éclairs, les transitions S_2 -à- S_3 et S_3 -à- S_4 ont montré un blocage à -35 et -20°C, respectivement, alors que la transition S_1 -à- S_2 a été bloquée à -65°C (Inoue et Shibata 1977b). D'autres études plus précises indiquent que les transitions S_1 -à- S_2 , S_2 -à- S_3 et S_3 -à- S_0 sont complètement bloquées à -100, -65 et -40°C, et à moitié bloqué à -95, -45 et -23°C, respectivement (Demeter et Vass 1984; Demeter et al. 1985b; Koike et Inoue 1987). Par une analyse sophistiquée de la dépendance de la température au moyen de deux protocoles différents pour l'excitation par éclair à basse température, « dernier éclair à basse température » et « tous les éclairs à basse température », on a proposé un état intermédiaire sensible à basse température qui existe entre S_2 et S_3 , qui pourrait être un précurseur de l'état S_3 dans lequel le dégagement de proton n'est pas complété (Koike et Inoue 1987).

Une autre application typique de la TL pour des études du côté donneur du PSII est l'effet du retranchement de protéines extrinsèques. Le PSII des plantes supérieures contient un ensemble de trois protéines extrinsèques de masses moléculaires de 33, 24 et 18 kDa, qui sont électrostatiquement associées à la surface du lumen du PSII et impliquées dans la régulation des conditions nécessaires pour les cofacteurs inorganiques et la stabilité du noyau de Mn. Par un lavage approprié de sel suivi d'un mixage avec un extrait concentré des trois protéines extrinsèques, ces protéines peuvent être réversiblement enlevées et reconstituées avec l'inactivation et l'activation du CDO. Lors du retranchement de l'ensemble de protéines, l'activité du CDO est presque complètement perdue tandis que la TL de la bande B peut être encore entièrement induite. Malgré que le PSII dépourvu des protéines extrinsèques présente une oscillation normale jusqu'à l'état S_3 , la transition finale S_3 -à- S_0 qui libère l'oxygène moléculaire est bloquée (Ono et Inoue 1985). Lors du retranchement des protéines extrinsèques, la position maximale de la bande B demeure à la même température, suggérant qu'il n'y a aucun changement appréciable de la stabilité de la paire de charges $S_2Q_B^-$. En revanche, la température maximale de la bande Q est remarquablement décalée vers les hautes températures de 20-25°C indiquant une stabilisation accrue de l'état S_2 en l'absence des protéines extrinsèques (Vass et al. 1987a). La différence de stabilisation entre les paires de charges $S_2Q_B^-$ et $S_2Q_A^-$ peut être due à un effet secondaire mais spécifique sur le site de liaison de Q_B , en plus de l'effet principal sur l'état S_2 .

Des données similaires de TL ont été obtenues pour des cellules génétiquement modifiées de cyanobactéries dans lesquelles le gène de *psb0* codant la protéine extrinsèque de 33 kDa a été supprimé (Burnap et al. 1992). Les résultats indiquent que les méthodes de TL peuvent avec succès caractériser les propriétés du PSII du côté donneur des mutants sans besoin d'isoler des thylacoïdes. Des données de TL impliquant une association incomplète de la protéine de 33 kDa avec les membranes de PSII ont été également accumulées pour des mutants de cyanobactéries dans lesquels quelques acides aminés sur la boucle lumenal de la protéine CP47 ont été supprimés (Gleiter et al. 1994). Par analogie à ces derniers, la

TL a été intensivement appliquée en sondant les propriétés redox du côté de donneur de PSII dépourvu de Ca^{2+} (Ono et Inoue 1989, 1990) ou dépourvu de Cl^- (Vass et al. 1987b).

5.10 Avantages et inconvénients de la TL

Les avantages et les inconvénients de la TL peuvent être récapitulés comme suit :

Les avantages sont :

- Le faible coût de l'équipement!
- L'opération simple n'exigeant aucune expérience!
- La préparation simple des échantillons. Des cellules entières sont parfois essentielles dans des mesures utilisant les mutants d'algues.
- L'application facile pour la caractérisation du PSII dans des études à utilité physiologique ou environnementale.
- L'étude sélective du PSII en ignorant le PSI.

Les désavantages sont :

- Le phénomène est limité au PSII. Il ne peut pas être appliqué au PSI et aux centres réactionnels bactériens.
- Les courbes de TL ne fournissent pas directement les paramètres physiques.
- Les interprétations multiples : par exemple une variation dans la température maximale peut être attribuée à un changement du côté donneur ou du côté accepteur.

CHAPITRE VI

OBJECTIF DU PROJET

L'intérêt du présent projet de recherche est d'examiner l'influence du TMPD sur les processus de recombinaison de charges dans le PSII et son action auprès des côtés donneur et accepteur du PSII afin d'obtenir des informations supplémentaires sur le fonctionnement du CDO. La TL sera utilisée pour comprendre les modifications induites par le TMPD dans les processus de recombinaison de paires de charges luminescentes sur des échantillons de thylacoïdes et de membranes enrichies en PSII isolés à partir de feuilles d'épinard, de pois et d'orge. Et certaines mesures de la fluorescence chlorophyllienne F_{Chl} seront effectuées pour connaître l'état redox de l'accepteur quinonique primaire Q_A .

Comme nous l'avons expliqué dans l'introduction générale, la TL est une technique qui permet de mesurer et apprécier les modifications faites au transport d'électrons au niveau donneur et accepteur du PSII (le PSI ne contribue pas directement à la génération d'un signal de TL). Les changements induits aux différentes caractéristiques des bandes de TL (amplitude, forme et position) par l'ajout d'un composé chimique nous informent sur la nature des modifications de ce dernier sur le PSII. Une courbe de TL est généralement composée de plusieurs bandes, chacune provenant d'une paire de charges qui produit de la luminescence en se recombinant. On génère la séparation de charges avec un ou plusieurs éclairs à des températures assez basses pour conserver celles-ci séparées juste avant de commencer le chauffage linéaire de l'échantillon.

Le décalage d'une bande de TL vers les basses températures ou vers les hautes températures nous informe d'une modification des couples rédox S_1/S_2 , S_2/S_3 , Q_A/Q_{A^-} , Q_B/Q_{B^-} (de la chaîne de transport d'électrons), alors que la diminution du signal d'une bande de TL indique qu'un ou plusieurs partenaires de recombinaison sont perdus. Il y a aussi le cas où une bande est induite à la suite du blocage du transport d'électrons à un endroit de la chaîne de transport. C'est ce qui se passe avec la bande B ($S_2Q_{B^-}$) qui se transforme graduellement

en bande Q ($S_2Q_A^-$) à mesure que la concentration de DCMU, ajouté à un échantillon contenant des PSII est augmentée, empêchant les PQs du bassin de se lier au site Q_B .

L'utilisation du DCMU permet de savoir si les modifications à la chaîne de transport d'électron ne proviennent que du côté donneur. En fait, si seul le côté accepteur est affecté par un composé chimique (couple Q_A/Q_{A^-} ou Q_B/Q_{B^-}), il n'y a aura pas de changement au couple redox S_1/S_2 ou S_2/S_3 . Un changement aux derniers couples résultera en un décalage du maximum de la bande de TL qui nous intéresse vers les plus basses (\downarrow de l'énergie d'activation) ou les plus hautes (\uparrow de l'énergie d'activation). La sensibilité de la TL pour détecter des variations d'énergie d'activation est de l'ordre de ~ 2 mV, ce qui correspond à une différence de 1°C pour la bande B.

Ainsi, doté d'une technique d'analyse aussi sensible, nous pensons être en mesure de vérifier ou de confirmer que l'effet du TMPD est de :

- Désactiver les états S_2 et/ou S_3 ,
- Destabiliser et/ou dégrader le noyau de Mn,
- Retrancher certaines protéines extrinsèques,
- Modifier le couple redox S_1/S_2 et/ou S_2/S_3 ,
- Modifier le ratio de la population initiales $S_0:S_1$,
- Perturber le transport d'électrons entre Q_A et Q_B en stabilisant la charge sur Q_A ou le contraire,
- Avoir une affinité pour le site Q_B (en compétition avec les PQs du bassin),
- Affecter le bassin de PQs, ce qui aurait comme effet de modifier le ratio de la population initiale $Q_{B^-}:Q_B$.

Le TMPD pourrait aussi affecter le taux de recombinaison générale des paires de charges accélérant ou ralentissant le taux des recombinaisons non radiatives. Des changements des pourcentages de ratés et/ou double touché donneraient d'autres informations pertinentes sur les modifications du transport d'électrons initiées par le TMPD.

CHAPITRE VII

PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES

7.1 Matériel végétal utilisé

Des plants de pois (*Pisum sativum* L) et d'orge (*Hordeum vulgare* L) empotés avec un mélange de terre et de vermiculite respectivement, ont été cultivés dans une chambre de croissance à environnement contrôlé (C.P.Fabien Inc., Montréal, Canada) à $20 \pm 2^\circ\text{C}$ avec une lampe Ceramalux[®] au sodium et au mercure (Philips electronics Ltd., Scarborough, Canada) pendant 14 heures ($100\text{-}120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) suivi de 10 heures d'obscurité. Les feuilles d'épinards ont été achetées dans un marché local (Trois-Rivières).

7.2 Isolation des membranes de thylacoïdes

Les membranes de thylacoïdes ont été isolées à partir de feuilles de plants de pois vieilles de 10 jours et de feuilles de plants d'orge et d'épinard vieilles de 7-9 jours avec la procédure définie par Boucher et al. (1990), sauf que le mélange de feuilles broyées a été filtré à l'aide d'une couche de Miracloth (EMD Biosciences, Inc., La Jolla, USA). Le culot contenant les membranes de thylacoïdes a été resuspendu dans un tampon contenant 20 mM Tricine-NaOH (pH 7,8), 250 mM sorbitol, 10 mM KCl, 10 mM NaCl et 5 mM MgCl_2 avec une concentration finale 2 mg Chl/mL mesurée d'après la procédure décrite par Porra et al. (1989).

7.3 Isolation des membranes enrichies en PSII (BBY)

Les membranes enrichies en PSII ont été préparées à partir de thylacoïdes d'après la procédure de Berthold et al. (1981) modifiée. Les thylacoïdes ont été lavés une première fois dans un tampon de 20 mM Mes-NaOH (pH 6,5), 400 mM de sucrose, 5 mM MgCl_2 et 15mM NaCl et resuspendus dans le même tampon avec une concentration finale de 2 mg Chl/mL, puis doucement mélangés dans une solution à 4% Triton X-100 préparée dans le tampon décrit ci-dessus. Les thylacoïdes ont été ajoutés goutte à goutte pour atteindre la

concentration de Triton X-100:Chl de 20:1. Après 20 minutes d'incubation dans l'obscurité et sur de la glace, la suspension détergent-thylacoïdes a été centrifugée à 3500 X g pendant 5 minutes pour enlever les membranes non-solubilisées. Les membranes enrichies en PSII ont été finalement obtenues par la centrifugation du surnageant exempt de thylacoïdes à 37 500 X g pendant 30 minutes. Le culot de membranes enrichies en PSII a été lavé deux fois avec le tampon contenant 20 mM Mes-NaOH (pH 6,5), 400 mM sucrose, 5 mM MgCl₂ et 15 mM NaCl pour enlever le détergent avant de faire les mesures de TL, de dégagement d'oxygène et de fluorescence chlorophyllienne.

7.4 Évaluation de l'intégrité fonctionnelle des membranes de thylacoïdes et des membranes enrichies en PSII

L'intégrité fonctionnelle des membranes de thylacoïdes et des membranes enrichies en PSII a été évaluée par des mesures du rendement quantique des PSII défini comme étant le rapport de F_v/F_m en utilisant le Plant Efficiency Analyser (Hansatech, King's Lynn, Norfolk, UK). Le rendement quantique du PSII était de 0.800 ± 0.003 (SE), 0.820 ± 0.004 , et 0.778 ± 0.009 pour les thylacoïdes obtenus à partir de feuilles de pois, d'épinards et d'orge, respectivement. Avec le DCBQ (350 μ M) comme accepteur d'électrons du PSII, on a observé des taux de dégagement d'oxygène à lumière saturante pour les thylacoïdes entre 170 et 230 μ mol O₂ / mg Chl h. Pour les membranes enrichies de PSII extraites à partir de thylacoïdes d'épinards et de pois, le rendement quantique du PSII mesuré était environ 0,811 et 0,809 respectivement. Dans le cas des membranes enrichies en PSII de l'orge, le dégagement d'oxygène a été évalué entre 340-380 μ mol O₂ / mg Chl h. La pureté des membranes enrichies en PSII a été également évaluée par l'analyse de polypeptides (Rajagopal et al. 2003).

7.5 Mesures de thermoluminescence

Les mesures de TL ont été effectuées avec un instrument spécialement conçu pour notre laboratoire. Pour obtenir la description complète de la conception et des aspects fonctionnels de l'équipement, voir la référence (Ducruet 2003). L'instrument est entièrement contrôlé par un ordinateur avec un logiciel d'acquisition de données (développé

par Jean-Marc Ducruet) qui permet l'activation de sources lumineuses, du réglage des températures d'incubation des échantillons et de l'acquisition du signal de luminescence provenant d'échantillons photosynthétiques avec des taux de chauffage prédéfinis. La carte d'acquisition DAQPad-1200 (National instruments, USA; *voir figure 16*) qui est un convertisseur analogue-numérique a été utilisée pour communiquer les commandes du logiciel vers l'équipement. Une plaque thermoélectrique à effet Peltier (Duratec, Marlow Industries Inc., Dallas, TX, USA) a facilité la régulation de la température pendant la période d'incubation des thylacoïdes dans l'obscurité, les périodes d'illumination et l'acquisition de la luminescence émise pendant une rampe de chauffage linéaire. Pour enregistrer l'émission de luminescence des thylacoïdes et/ou des membranes enrichies en PSII, un photomultiplicateur (PMT) analogue sensible au rouge lointain (far-red) (Hamamatsu H7711-50, Ichino-cho, Japon) a été utilisé. Afin d'empêcher des dommages au PMT par le chauffage de l'échantillon pendant les mesures, la luminescence émanant des échantillons a été transmise par un des bras d'un guide de 5 fibres optiques fourni par Walz (Effeltrich, Germany). Dans quelques expériences, un obturateur (Oriol Instruments, Stratford, CT, USA) était contrôlé par un dispositif pour assurer une protection supplémentaire en éliminant la queue de la lumière forte d'excitation pendant la phase initiale de la rampe de chauffage.

7.6 Sources lumineuses et excitation des échantillons

Pour les expériences de mesure du signal de TL des PSII, des flashes saturants d'environ 1 μs (position à 10 sur l'appareil) ont été générés à partir de l'unité XE-ST Pump Flash (Walz, Effeltrich, Germany) et déclenchés par une impulsion TTL provenant du DAQPad. Pour les patrons d'oscillation dépendant du nombre de flashes, le nombre de flashes était aussi contrôlé par le DAQPad. Quand une faible lumière rouge lointain (far-red) de 3 secondes de 0.1 μmol de photons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, mesurée avec une sonde SKP200 (Skye Instruments, UK) a été appliquée par une autre branche de guide à fibres optiques pour oxyder le côté accepteur du PSII, une autre sortie du DAQPAD était utilisée.

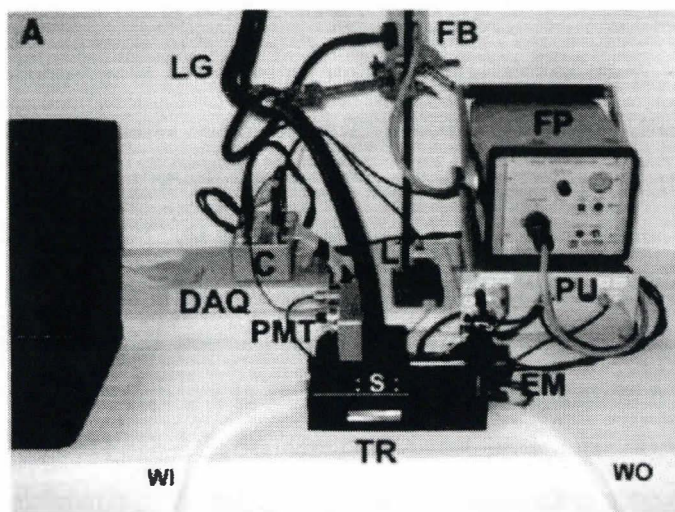


Figure 16 Photographie d'un thermoluminomètre qui permet d'acquérir des spectres de thermoluminescence de feuilles et d'échantillons en suspension. FP représente la source d'éclairs, WI et WO : entrée et sortie de la circulation d'eau, DAQ : système d'acquisition des données, C : boîte de liaison entre l'ordinateur et l'appareil, TR : support de la plaque Peltier, PMT : photomultiplicateur, PU : unité d'alimentation, FB : l'émetteur d'éclairs, LG : fibres optiques.

7.7 Préparation des échantillons pour les mesures de TL

Pour les mesures de TL, l'échantillon concentré de thylacoïdes (2 mg Chl/mL) a été diluée à 200 μg Chl/mL dans un tampon contenant 50 mM Tricine-NaOH (pH 7,8), 400 mM sorbitol, 10 mM KCl, 10 mM NaCl et 5 mM MgCl_2 . Un tampon de mesure avec 20 mM Mes-NaOH (pH 6,5), 400 mM sucrose, 5 mM MgCl_2 et 15 mM NaCl a été utilisé pour analyser des réactions de recombinaison de charge dans les membranes enrichies en PSII. Environ 200 μL d'échantillon dilué a été ajouté dans le porte-échantillon (diamètre de 15 mm) placé juste au-dessus de la plaque Peltier et couvert d'un disque de verre (Hellma 202-OS). Le porte-échantillon a été fermé avec le couvercle soutenant le guide à fibres optiques relié au PMT. Toutes les mesures ont été faites dans l'obscurité.

7.8 Périodes d'incubation et séquence de flashes

Les périodes d'incubation et la détection du signal de TL émise par des membranes de thylacoïdes ou des membranes enrichies en PSII sont présentés ci-dessous. Premièrement, les échantillons adaptés à l'obscurité ont été incubés à 20°C pendant 120 s. Après cette étape, une température de 0°C est maintenue pendant 60 s. Cette température d'incubation a été choisie afin d'éviter de créer des dommages au CDO qui génère habituellement des artefacts (Homann 1999). De courts éclairs (single turnover) de lumière blanche espacés d'une seconde ont été appliqués à la fin de la période d'incubation à 0°C afin de créer la séparation de charge des PSII. À la dernière période (étape de mesure), le chauffage linéaire (de 0 à 60°C) des échantillons dans l'obscurité active la recombinaison des charges séparées du PSII qui peuvent être détectées par l'aspect des bandes d'émission avec des maxima de température caractéristiques (Sane et Rutherford 1986; Vass and Inoue 1992; Ducruet 2003; Sane 2004).

7.9 Acquisition et analyse du signal de thermoluminescence

Le signal de TL induit par un ou des éclairs et détecté par un photomultiplicateur a été acquis par un convertisseur analogique-numérique connecté à un ordinateur puis sauvegardé dans un fichier ASCII. Les données acquises ont été analysées en utilisant ThermoLite, un logiciel développé pour s'exécuter sur le système d'exploitation Windows de Microsoft. ThermoLite est une version améliorée conçue par l'auteur de cette thèse, de la version pour DOS réalisée par Jean-Marc Ducruet. Le développement du logiciel ThermoLite a été possible grâce à Ducruet et Miranda (1992) dans lequel la méthode numérique a été utilisée pour analyser le signal de TL basé sur la théorie de recombinaison de charge (Randall et Wilkins 1945). Nous avons déterminé la proportion de charges recombinées à chaque mesure pendant le chauffage linéaire (de basse à haute température) en intégrant la théorie d'Arrhenius sur la dépendance entre la température et les paramètres réactionnels avec la théorie d'Eyring sur les états de transition. La relation obtenue donne la fraction des charges recombinées à chaque mesure, $L(T)$, en fonction de la température, T :

$$L(T) = N T \Delta t P e^{(-E_A/k_B T)}$$

où N représente le nombre de paires de charge capables de recombinaison à la température T ; Δt est le temps entre les mesures; E_a représente l'énergie d'activation (enthalpie); k_B est la constante de Boltzmann, et le facteur pré-exponentiel $P = k_B \cdot e^{(1+\Delta s/k_B)} / h$ où h est la constante de Planck et Δs l'entropie.

7.10 Décomposition des courbes de thermoluminescence

Sur la base des considérations théoriques illustrées ci-dessus, les courbes expérimentales ont été simulées pour déterminer les valeurs de l'énergie d'activation E_a . Ce procédé réduit les erreurs provenant du recouvrement partiel entre les bandes de TL. À cette fin, les courbes expérimentales ont été filtrées par lissage linéaire. Le calcul de simulation des bandes a été fait avec un logiciel à partir de l'équation précédente et en commençant à la température la plus basse et avec n_0 (représentant la surface sous chaque composante de la courbe de TL). Le calcul a été fait en faisant varier le nombre de charges piégées (n), le facteur pré-exponentiel (P) et l'énergie d'activation (E_a). À chaque étape du calcul numérique, on soustrait la valeur $L(T)$ du nombre total de charges piégées. Plusieurs itérations sont nécessaires pour minimiser la somme des différences au carré entre la courbe de TL expérimentale et la courbe TL simulée. À partir de la courbe TL simulée, des valeurs précises de E_a sont obtenues. L'aire totale sous la courbe de TL reflète le nombre total de paires de charges piégées ou encore le nombre de recombinaisons détectées par l'instrument.

7.11 Modifications des bandes caractéristiques de TL avec un traitement au TMPD et/ou des inhibiteurs

Le TMPD a été fraîchement préparé à chaque séance d'échantillonnage pour les membranes de thylacoïdes ou les membranes enrichies en PSII avant les mesures de TL. Le composé ADRY carbonylcyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) et l'inhibiteur DCMU ont été dissouts dans de l'éthanol. Dans toutes les mesures, la concentration finale d'éthanol a été maintenue à moins de 0,8% (v/v) pour empêcher des dommages induits par le solvant aux échantillons. Tous les produits chimiques ont été achetés chez Sigma Chemicals Co.,

Canada. Les échantillons de membranes de thylacoïdes ou de membranes enrichies en PSII ont été rapidement mélangées à ces produits chimiques dans un tube Eppendorf de 250µL dans l'obscurité et insérés dans le porte-échantillon de l'appareil de mesure de TL.

RÉSUMÉ DE L'ARTICLE (ABSTRACT)

La technique de thermoluminescence (TL) a été utilisée pour étudier l'action du N,N,N',N'-tétraméthyl-p-phénylènediamine (TMPD) sur la recombinaison de charge dans le photosystème II (PSII). L'ajout de TMPD à faible concentration (μM) à des échantillons de thylacoïdes a fortement diminué le signal de TL provenant des paires de charges $S_{2,3}Q_B^-$ (bande B), de $S_2Q_A^-$ (bande Q) et de $Y_D^+Q_A^-$ (bande C). De plus, l'amplitude de fluorescence chlorophyllienne après un éclair a été fortement retardée par le TMPD en présence de 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-diméthylurea (DCMU). Malgré la conservation du motif d'oscillation de la bande B d'échantillons traités avec TMPD, le signal de la bande B a été fortement diminué. Conséquemment à la perte du signal, on observe une modification importante du motif au premier et deuxième éclairs. Un traitement avec le m-chlorophenylhydrazone de carbonylcyanide (CCCP) (agent "ADRY") induit des modifications semblables au motif. La simulation du motif d'oscillation de la bande B en utilisant le modèle intégré de Joliot-Kok confirme que le TMPD a augmenté le rapport initial $S_0:S_1$ et $Q_B^-:Q_B$. En effet, le TMPD peut également concurrencer les plastoquinones (PQs) du bassin pour se lier au site Q_B et aussi désactiver les états S du noyau de Mn.

ARTICLE SCIENTIFIQUE

Interaction of *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine with photosystem II as revealed by thermoluminescence: reduction of the higher oxidation states of the Mn cluster and displacement of plastoquinone from the Q_B niche

Alain Gauthier, Sridharan Govindachary, Johanne Harnois and Robert Carpentier*

*Groupe de Recherche en Biologie Végétale (GRBV), Université du Québec à Trois-Rivières,
C.P.500 Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7*

Corresponding author:

Professor Robert Carpentier

Phone : +1-819-376-5011

Fax : +1-819-376-5057

Email address: robert.carpentier@uqtr.ca

Key words: Thylakoid membrane; Photosystem; Charge recombination; Manganese cluster; Plastoquinone; Thermoluminescence

Abstract

The flash-induced thermoluminescence (TL) technique was used to investigate the action of *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine (TMPD) on charge recombination in photosystem II (PSII). Addition of low concentrations (μM range) of TMPD to thylakoid

samples strongly decreased the yield of TL emanating from $S_2Q_B^-$ and $S_3Q_B^-$ (B-band), $S_2Q_A^-$ (Q-band), and $Y_D^+Q_A^-$ (C-band) charge pairs. Further, the temperature-dependent decline in the amplitude of chlorophyll fluorescence after a flash of white light was strongly retarded by TMPD when measured in the presence of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU). Though the period-four oscillation of the B-band emission was conserved in samples treated with TMPD, the flash-dependent yields (Y_n) were strongly declined. This coincided with an upshift in the maximum yield of the B-band in the period-four oscillation to the next flash. The above characteristics were similar to the action of the ADRY agent, carbonylcyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP). Simulation of the B-band oscillation pattern using the integrated Joliot-Kok model of the S-state transitions and binary oscillations of Q_B confirmed that TMPD decreased the initial population of PSII centers with an oxidized plastoquinone molecule in the Q_B niche. It was deduced that the action of TMPD was similar to CCCP, TMPD being able to compete with plastoquinone for binding at the Q_B -site and to reduce the higher S-states of the Mn cluster.

Abbreviations: ADRY, accelerator of the deactivation reactions; CCCP, carbonylcyanide *m*-chlorophenylhydrazone; Chl, chlorophyll; DCMU, 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea; FCCP, carbonylcyanide *p*-(trifluoromethoxy)-phenylhydrazone; F_v , variable fluorescence; OEC, oxygen evolving complex; P680, the primary electron donor of photosystem II; Pheo, Pheophytin (the primary electron acceptor of PSII); PS, photosystem; PQ, plastoquinone; Q_A and Q_B , primary and secondary quinone acceptors of photosystem II; RC, reaction center; TMPD, *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine; TL, thermoluminescence; T_m , temperature maximum of thermoluminescence emission; Y_D , the redox active tyrosine 160 of D2 protein; Y_z , the redox active tyrosine 161 of D1 subunit.

1. Introduction

Photosystem II (PSII) catalyses the light-driven electron transport from water to plastoquinone in oxygenic photosynthetic prokaryotes and chloroplasts of higher plants (for comprehensive reviews on PSII, see ref. [1]). Light energy absorbed by pigment-protein complexes is quickly transferred to the photochemical reaction centers (RC). Within the PSII RC, a rapid release of an electron from the excited special chlorophyll *a* (Chl *a*), P680, to the nearest pheophytin (Pheo) molecule initiates charge separation and formation of $P680^+Pheo^-$. Stabilization of the charge separated state takes place through electron transfer from $Pheo^-$ to the primary quinone acceptor, Q_A , in less than 200 ps [2] and reduction of the cationic radical $P680^+$ by the secondary electron donor, Tyr_Z (Tyrosine 161 of D1 subunit), in 10-500 ns [3]. As a result, PSII centers in the $Y_Z P680^+Pheo^-Q_A$ state are stabilized as $Y_Z^+P680PheoQ_A^-$ states in sub μs time scale. The secondary quinone acceptor of PSII, Q_B , receives the electrons from Q_A^- in a two-step process. Electron transfer from $Q_A^-Q_B \rightarrow Q_AQ_B^-$ and $Q_A^-Q_B^- \rightarrow Q_AQ_B^{2-}$ takes place in ~ 150 and ~ 400 μs , respectively [4]. Following protonation, plastoquinol (PQH_2) is released from the Q_B pocket and is replaced by an oxidized plastoquinone (PQ) molecule to sustain the photochemical competence of PSII.

The architecture of the photosynthetic oxygen evolving complex (OEC) deduced from the most recent X-ray analysis of PSII crystals shows that the two Chl *a* molecules (P_{D1} and P_{D2}) of P680 are spatially separated by a Mg-Mg distance of about 7.6 Å [5]. The cationic radical $P680^{*+}$ located on one of these Chl *a* monomers in a redox equilibrium [6] oxidizes both Tyr_Z and Tyr_D (Tyr 160 of D2 subunit). These two electron donors are located at a distance of about 13.5 Å from P_{D1} and P_{D2} , respectively [5]. Despite being positioned equidistantly from P680, the mechanistic roles of Tyr_Z and Tyr_D remain contentious (for a review, see Ref. [6]). In fact, $P680^{*+}$ reduction by Tyr_Z proceeds with the half-time of about 23 ns [3], whereas the Tyr_D oxidation by $P680^{*+}$ is relatively slower [6,7]. Besides, Tyr_D^+ is

highly stable. On the other hand, the lifetime of Tyr_Z^{*+} is very short as the Mn cluster of the water oxidation complex reduces it in 30-1200 μs [8]. The successive generation of oxidation potential following the absorption of four quanta of excitation light is the driving force for the Mn cluster to cycle through the S-states, $S_0 \rightarrow S_1 \rightarrow S_2 \rightarrow S_3 \rightarrow (S_4) \rightarrow S_0$, with a half-times of about 30, 110, 350, and 1300 μs , respectively for every forward transition [9]. Concurrent with the release of dioxygen from water, the S_4 -state decays to the S_0 -state after the 4th flash.

At least two groups of agents have been used to study the chemical mechanism of oxygen evolution and the reactivity of the Mn-complex. The first group of agents includes ADRY reagents that selectively accelerate the decay of S_2 and S_3 states. The second group is composed of hydroxylamine (NH_2OH) and hydrazine (NH_2NH_2) that are highly accessible to the catalytic site of water oxidation and cause robust changes in the flash-dependent yield of O_2 [10-14]. On the other hand, interaction of chemical oxidants and exogenous quinones on the stromal side of PSII markedly affects the binding of PQ in the Q_B niche, as shown by the rapid quenching of Chl fluorescence [15,16].

Another redox agent, *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine (TMPD), which was widely used as an electron donor for photosystem I (PSI) over the period of the last three decades, also acts as an efficient PSII electron acceptor. In fact, TMPD interrupts the linear electron flow and permits the steady efflux of electrons from PSII to PSI bypassing the cytochrome b_6/f complex [17]. Recently, it was shown that TMPD can modify the rates of electron transfer between the quinone acceptors of PSII [16-18]. Indeed, in measurements using isolated thylakoids, about 20 μM TMPD effectively restores the kinetics of Chl fluorescence rise comprising of three intermediate phases (O-J, J-I, and I-P) found in intact green photosynthetic tissues [18]. The above indicates that TMPD can effectively interact with the Q_B site.

A recent report shows that high concentration of TMPD (about 1 mM) can release Mn^{2+} from the OEC devoid of essential cofactors such as Ca^{2+} and Cl^- [19]. If the water oxidation complex is reconstituted with Ca^{2+} , the reactivity of TMPD with the Mn-cluster is retarded. Yet the oxidation of TMPD by reduction of Mn^{4+} to Mn^{3+} is not prevented. It is worth mentioning that NH_2OH elicits similar effect on the Mn-cluster of the OEC [19]. In the absence of Ca^{2+} , Mn^{3+} state of the OEC is also vulnerable for reduction by TMPD. It was shown that even low concentrations of this agent may interfere with the redox state of the S-state cycle [16,17].

Thermoluminescence (TL) originating from pre-illuminated photosynthetic tissues at characteristic temperatures is used to epitomize PSII charge recombination [20-23]. Charge recombination in luminescent pairs such as $S_2Q_A^-$ (Q-band), $S_2Q_B^-$ and $S_3Q_B^-$ (B_1 and B_2 -bands), and $Y_D^+Q_A^-$ (C-band) was extensively studied over a broad range of temperatures [20,22]. Recombination of $S_2Q_A^-$ or $Y_D^+Q_A^-$ is measurable when the forward electron transfer is curtailed beyond Q_A^- [20,22]. The yield of TL originating from $S_2Q_A^-$ recombination is usually maximal at $\sim 5-15^\circ C$, compared to the peaking temperatures for back-reactions involving $S_2Q_B^-$ and $S_3Q_B^-$ ($20-35^\circ C$) or $Y_D^+Q_A^-$ ($40-50^\circ C$) charge pairs [20,22,24]. Notably, B-band emission follows a period-four oscillation pattern. The flash-dependent yield of B-band emission is frequently employed as a powerful method to examine the redox states of the intermediate carriers at the donor and acceptor sides of PSII. In the present investigation, thermoluminescence was used to elucidate the TMPD-induced modifications in the recombination reactions of the luminescent charge pairs. We show for the first time that TMPD efficiently interrupts the recombination processes within PSII. Exogenous addition of TMPD to thylakoids in darkness brought about significant loss in the amplitudes of the $S_2Q_B^-$, $S_3Q_B^-$, and $S_2Q_A^-$ recombination. This was mainly attributable to a strong decline in the available donor side recombination partners for the quinone acceptors

as a result of a change in the redox state of the S_2/S_1 couple. The period-four oscillation of the B-band emission confirmed the reduction of the higher oxidation state of the Mn-complex caused by TMPD. In this aspect, the action of TMPD was similar to CCCP but differed from NH_2OH . Further, TMPD shifted the maximal yield of the B-band in the period-four oscillation from Y_1 to Y_2 due to binding of TMPD in the PSII Q_B pocket.

2. Materials and methods

2.1 Plant material

Pea (*Pisum sativum* L.) plants were grown on potting soil mixture and vermiculite, respectively, in a climatic growth chamber (C.P.Fabien Inc., Montréal, Canada) at $20 \pm 2^\circ C$ under conditions of 14-h light ($100-120 \mu mol m^{-2} s^{-1}$) provided by Ceramalux[®] (Philips Electronics Ltd., Scarborough, Canada) sodium and mercury lamp followed by 10-h of darkness.

2.2 Isolation of thylakoid membranes

Thylakoid membranes were isolated from leaves of 10-day old pea plants according to Ref. [25] except that the homogenized leaves were filtered through a layer of Miracloth (EMD Biosciences, Inc., La Jolla, USA). The pellet of thylakoid membranes was suspended in a medium containing 50 mM Tricine-NaOH (pH 7.8), 400 mM sorbitol, 10 mM KCl, 10 mM NaCl, and 5 mM $MgCl_2$ to a final concentration of 2 mg Chl/mL as estimated following the procedure outlined in Ref. [26]. The functional integrity of the thylakoid membranes was assessed by measurements of the quantum yield of PSII as F_v/F_m ratio using Plant Efficiency Analyser (Hansatech, King's Lynn, Norfolk, UK). This quantum yield was

close to 0.800 ± 0.003 (SE), 0.820 ± 0.004 , and 0.778 ± 0.009 for thylakoids obtained from pea, spinach, and barley leaves, respectively.

2.3 Thermoluminescence measurements

Thermoluminescence measurements were carried out with a laboratory built equipment. For complete description of the design and functional aspects, see Ref. [20]. The instrument is entirely operated through a computer with specialized data acquisition software [27] that enables the activation of light sources, regulation of sample incubation temperatures and acquisition of TL emanating from photosynthetic samples with pre-defined heating rates. The DAQPad-1200 (National Instruments, USA) digital-to-analogue interface (converter) was used to direct the software commands to the equipment. The thermoelectric Peltier plate (Duratec, Marlow Industries Inc., Dallas, TX, USA) facilitated the temperature regulation during the pre-incubation of thylakoids in darkness, illumination periods, and acquisition of the emitted luminescence as a function of linear heating. Thermoluminescence was detected by a red-sensitive analog photomultiplier (Hamamatsu H7711-50, Ichino-cho, Japan). In order to prevent the damages to photomultiplier by sample heating during the measurements, the TL emanating from samples was transmitted through a light guide, one of the arms of a 5-branched fibre optic guide supplied by Walz (Effeltrich, Germany). In some experiments, a shutter (Oriel Instruments, Stratford, CT, USA) operated through a controller device provided additional protection as this strongly eliminates the tail of the strong excitation light during the initial phase of the warming process.

2.4 Light sources and excitation of photosynthetic samples

For the analyses of flash induced changes in the TL properties of PSII, saturating flashes of about 1- μ s width (setting 10) from XE-ST Pump Flash unit (Walz, Effeltrich, Germany)

were triggered by TTL pulses from one of the digital-to-analog port of the DAQPad interface. To measure the flash-dependent oscillation pattern of the TL signal, the trigger commands were preset in the data acquisition software to deliver in series.

2.5 Sample preparation for thermoluminescence measurements

For TL measurements, the concentrated suspension of thylakoid membranes (2 mg Chl/mL) was diluted to 200 μg Chl/mL in a medium containing 50 mM Tricine-NaOH (pH 7.8), 400 mM sorbitol, 10 mM KCl, 10 mM NaCl, and 5 mM MgCl_2 . About 200 μL of the diluted suspension was added to the sample well (15 mm diameter) positioned just above the Peltier plate and covered with Hellma 202-OS disc window. Then the sample chamber was closed with a holder bearing the light guide connected to the photomultiplier. All measurements were performed in the dark.

2.6 Sequences of pre-incubation periods and flash illumination

The sequence of detection of thermoluminescence emitted from thylakoids is presented below. First, dark-adapted samples were incubated for 120 s at 20°C. Following this step, temperature was brought down to 0°C within 5-10 s and kept for 60 s. This incubation temperature was selected in order to avoid freezing induced damages to the OEC that usually gives rise to artifacts [20]. A probing single turn over white flash was applied to initiate charge separation in PSII. During the last step of the measurements, linear warming of samples in total darkness activates the recombination of PSII charge pairs that can be detected by the appearance of emission bands with characteristic temperature optima [20,22].

2.7 Acquisition of thermoluminescence signal and data analysis

The flash-induced TL signal detected by the photomultiplier was acquired through the signal entrance (A/D) port of the interface and saved as ASCII files. The data were analyzed using ThermoLite, a software developed in our laboratory for the purpose of working with Windows OS. This software is an up-graded version of the original one [27] in which a numerical method based on the theory of charge recombination [28] was employed to analyze photosynthetic TL. The area under the TL curve reflects the total number of charge pairs or traps detected by the measuring system. We determined the fraction of charge recombination, $L(T)$, at every sampling step of the linear warming (from low to high temperatures) recursively by integrating the Arrhenius theory of the temperature dependence of reaction rate coefficients and transition state theory of Eyring as shown below:

$$L(T) = NT\Delta t P e^{(-E_a/K_B T)} \quad (1)$$

where N represents the number of charge pairs capable of recombining at temperature T ; $\Delta t = 1$ as the duration of the sampling step is 1 s; E_a represents the activation energy (enthalpy); K_B is the Boltzmann constant, and the pre-exponential factor, $P = K_B e^{(1+\Delta S/K_B)/h}$ where “ h ” is the Planck’s constant and ΔS the entropy.

2.8 Decomposition of the thermoluminescence glow curves

The experimental curves were simulated using the above theoretical considerations, to determine the values of E_a . This procedure removes the source of errors contributed by minor overlapping bands in the rising edge of the TL emission band. For this purpose, the experimental curves were filtered for noise by linear smoothing. Then the simulation commands were given to the software to compute equation 1 in a step-wise manner from

low to high temperature, beginning from n_0 , the initial step of the area under the TL glow curve. This was done by varying the number of traps (n), the pre-exponential factor (P) and the activation energy (E_a) obtained from the experimental glow curve with the simulation program besides deducting the value of $L(T)$ at each computation step. This curve fitting process was run several times iteratively to minimize the sum of squares of the difference between the experimental and simulated TL curves. The precise values of E_a were calculated from simulated TL curves.

2.9 Simulation of the advancement of the S_n states

The advancement of the S_n states of the OEC was evaluated for each incident saturating flash. The sum of the initial S_n states corresponds to $S_0 + S_1 + S_2 + S_3 = 100\%$ for the Mn cluster and $Q_B + Q_B^- = 100\%$ for the quinone acceptors. While varying the initial S_n states and the ratio of $Q_B:Q_B^-$, the formation of the S_n states after several flashes was evaluated by a simulation integrating the following parameters: α = miss, β = single hit, and γ = double hit. With every additional flash, a new population of the S_n states and ratio of $Q_B:Q_B^-$, respectively, was obtained.

A computer-based software was used to process the successive iterations developed as a matrix representation of a Markov chain [29] in order to evaluate the proportions of double hits (5%) and misses (8%), keeping the other parameters free, as well as the initial populations of the $S_{0/1}$ -states (26:74) and $Q_B:Q_B^-$ ratio (77:23) for our thylakoids samples at pH 7.8 before treatment. The double hit and miss values found were employed to simulate the initial states of the thylakoid samples treated with various concentrations of TMPD.

2.10 Measurement of the Chl fluorescence during the linear warming

Chl fluorescence was measured during the linear warming of thylakoids at the rate $0.5^{\circ}\text{C}/\text{s}$ from -30°C to 70°C . For this purpose, we used glycerol 25% (v/v) as cryoprotectant to minimize the freezing-induced damages to the OEC of PSII. The light-induced electron transfer in PSII was initiated by applying a single turn-over white flash before initiating the warming procedure. Chl fluorescence was detected by pulsing ultra-slow weak blue light (LED) passing through a 480 nm interference filter once every sampling step per s. Fluorescence superimposed to the TL signal was segregated by interpolation.

2.11 Changes in thermoluminescence characteristics caused by TMPD and inhibitor treatments

TMPD was freshly prepared and added to the thylakoids membranes prior to TL measurements. The ADRY agent carbonylcyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) or the inhibitor, DCMU, was prepared in ethanol. In all measurements, the final concentration of ethanol was maintained below 0.8% (v/v) to prevent solvent induced damages. All chemicals were purchased from Sigma Chemical Co., Oakville, Canada. Aliquots of thylakoids were rapidly mixed with these agents in a 250- μL Eppendorf tube in the dark and added to the sample well of the TL equipment immediately just before the sequence of TL detection as described above.

3. Results

Figure 1A shows the TL glow curves of pea thylakoid membranes in which charge separation in PSII was initiated with a strong Xenon 1- μs width white flash. With a linear increase in temperature from 0°C at the rate of $0.5^{\circ}\text{C}/\text{s}$, the amplitude of the TL signal rapidly increased to attain its maximum (T_m) at 35°C in control thylakoid samples (Fig. 1A,

trace 1). This major TL emission band corresponds to the temperature optimum of the B-band (30-40°C) attributable to charge recombination between the oxidized Mn-cluster, predominantly in the S_2 -state, and Q_B^- [30] as detailed below. In the dark, the distribution of the S_0 - and S_1 -states of the OEC usually stabilizes at a ratio of 25:75. This initial distribution pattern was verified by simulation of the experimental TL glow curves of dark-adapted thylakoid samples as described in "Materials and methods". After a flash was applied to initiate S-state advancement, the distribution of $S_0:S_1:S_2:S_3$ states was stabilized at a ratio of about 2:29:65:4 as determined by the simulation. PSII centers in S_0 and S_1 states or with oxidized Q_B do not contribute to TL emission and the fraction of centers stabilized in $S_3Q_B^-$ states was negligible (around 2-3% of the total population). Therefore, the integrated area under the B-band emission and the amplitude of the B-band after a flash manifest the accumulation of centers in $S_2Q_B^-$ state. Even low concentration of TMPD (2.5 μ M) affected the amplitude of the B-band (Fig. 1A, trace 2). This effect coincided with a global reduction in the amplitude of the B-band (Fig. 1A, traces 3-6) observed as TMPD concentration was raised. This was accompanied by a shift of T_m towards lower temperatures. Similar action of TMPD was noticeable in thylakoids isolated from either spinach or barley leaves (data not shown).

To study the TMPD induced suppression of the B-band emission of thylakoids in more detail, thylakoids were excited with two consecutive flashes with a delay time of 1-s (Fig. 1B). This permits a two-oxidation step advancement in the S-states of the Mn cluster in the dark-adapted thylakoids and stabilization of PSII centers in the mixed states of $S_2Q_B^-$ and $S_3Q_B^-$ after charge separation. In control samples, the T_m of the B-band emission was similar to that observed following a single flash but the intensity of the band decreased significantly owing to a marked change in the distribution pattern of the $S_2Q_B^-$ and $S_3Q_B^-$ charge pairs following the 2nd flash (Fig. 1B, trace 1). In order to estimate the distribution

pattern of the S-states, the simulation program was run several times using misses, single, and double hits determined with dark-adapted thylakoid membranes (see Materials and methods). After two flashes, the built up of oxidation equivalents on the Mn-complex results in the following distribution of the S-states: $S_0:S_1:S_2:S_3 = 7:4:30:59$. Based on our calculations, in this mixed population of S-states, only 43% of the S_2 -states and 25% of S_3 -states respectively, are capable of recombining with Q_B^- . The amplitude of TL originating from $S_3Q_B^-$ recombination is usually 1.7-2.0 times higher than from $S_2Q_B^-$ [21]. Therefore, more than two thirds of the area under the B-band emission is related to the former recombination pathway. The rest is ascribed for $S_2Q_B^-$ charge pairs. As for samples illuminated with a single flash, addition of $\sim 2.5 \mu\text{M}$ TMPD was sufficient to affect the B-band emission (Fig. 1B, trace 2). Both the area under the B-band and T_m decreased with increasing concentrations of TMPD (Fig. 1B, traces 3-6) even though the distribution of the S-states was significantly modified after two flashes.

The changes in the amplitudes and T_m of the B-band emission brought out by TMPD could be related to the changes in the population of the S_n states of the Mn cluster or quinone acceptors. Therefore, to segregate the effects of TMPD on the two-electron gate involving Q_B/Q_B^- couple, DCMU was used to inhibit electron transfer between Q_A^- and Q_B . With DCMU, after a single flash, a major luminescent band with T_m of 12-15°C and a minor band at about 50°C appeared in the glow curve (Fig. 1C, trace 1). The former one is the Q-band. It arises due to the back-flow of electrons from Q_A^- to S_2 -state. It is known that the conversion of $S_2 \rightarrow S_3$ usually does not occur after a single flash in the presence of DCMU if the initial redox state of Mn-complex is trapped in S_0 or S_1 -state [31]. In the presence of DCMU, the B-band completely disappeared as Q_B is not reduced. The amplitude of the Q-band slightly increased following the second flash (Fig. 1D, trace 1) owing to the complete displacement of the semiquinone from the Q_B pocket by the preceding flash as a

consequence of efficient DCMU binding. However, the shape of the band remained unaffected. On the other hand, the amplitude of the band strongly decreased with 2.5 μM TMPD whether a single or double white flash were used (Fig. 1C and D, trace 2). Upon increasing the concentration of TMPD, recombination of $\text{S}_2\text{Q}_\text{A}^-$ charge pairs further declined. The minor TL band at about 50°C in Fig. 1 C and D, the C-band, originates from the recombination between oxidized Y_D , and Q_A^- [24,32]. This band also declined with TMPD.

As mentioned earlier, the dominant population of the luminescent charge pairs contributing for the B-, or Q-band following pre-illumination with one flash is $\text{S}_2\text{Q}_\text{B}^-$ or $\text{S}_2\text{Q}_\text{A}^-$. In these charge separated states of PSII, the S_2 -state of the Mn cluster is the key recombination partner. On the other hand, the stabilization of $\text{S}_3\text{Q}_\text{B}^-$ charge pairs involves the oxidation of the S_2 -states by a supplementary flash. Therefore, it is possible that a block in the advancement of the lower S-states of the **Mn cluster** to higher oxidation caused by TMPD may contribute for the loss of B- or Q-band signal (Fig. 1). Alternatively, S_2 -states formed by one-electron oxidation step after a single white light flash may be decayed to lower S-states by TMPD.

In order to correlate the TMPD induced loss of charge pairs with the modifications in the S-states of the Mn cluster, it is necessary to compare the action of other compounds that provoke similar effects. ADRY agents like CCCP specifically reduce the higher oxidation states and suppress the period-four oscillation [33,34]. Fig. 2 shows the changes in the B-band emission characteristics elicited by CCCP in the range of 0.025-0.400 μM . All experimental procedures used were essentially similar to the measurements carried out with TMPD. It is clear from Fig. 2A that the intensity of the B-band declined with increasing concentrations of CCCP. This was accompanied by a shift in its T_m towards lower temperatures. These changes in the B-band emission caused by CCCP were not altered by a

supplementary flash (Fig. 2B). A similar decline in the Q-band was also observed (see below, Fig. 3D).

To directly compare the effects of TMPD and CCCP on the recombination kinetics of $S_2Q_B^-$, $S_3Q_B^-$, and $S_2Q_A^-$ charge pairs, we analyzed the amplitudes of the B-, and Q-bands emission quantitatively. Compared to the action of TMPD, CCCP-dependent loss of $S_2Q_B^-$ and $S_2Q_A^-$ charge pairs was observed at lower concentrations (Fig. 3). Whether S-state transitions were induced by one or two flashes, the Q-band yield decreased by almost 70% in the presence of 0.1 μM CCCP whereas 7.5 μM TMPD was required to reach a similar decline. For the B-band, it is clear that a stronger effect was observed with a single flash compared to double flashes, this phenomenon being more obvious for TMPD.

Figure 4 illustrates the changes in the B-band emission as a function of flash number. A typical oscillation pattern was obtained with control thylakoids after the application of saturating single turn over 1- μs width Xenon flashes in a sequence with a delay time of 1-s (Fig. 4A, trace 1). This resulted in the peaking of the B-band TL intensity after 1st (Y_1) and 6th (Y_6) flash as the initial ratio of the $S_0:S_1$ and $Q_B:Q_B^-$ were 26:74 and 77:23 respectively. This is consistent with the B-band oscillation pattern reported previously [35]. The use of a delay time of 100 ms between the flashes did not change the flash-dependent yield of B-band emission. However, TMPD significantly affected this oscillation pattern as illustrated in Fig. 4A. In thylakoid samples added with 2.5 μM TMPD (Fig. 4A, trace 2), the oscillation pattern showed the following. Firstly, the yield of the B-band declined after every flash in the sequence used. The observed yields of Y_1 and Y_2 are consistent with the data illustrated in Fig. 1 (Panels A-B) Secondly, the peaking of the B-band yield was upshifted from Y_1 to Y_2 . Yet, the standard pattern of the B-band oscillation corresponding to the subsequent flashes remained the same with the elevated levels of TMPD.

The flash-dependent yield of B-band emission shown in Fig. 4A was subjected to further analyses as detailed below. The set of traces presented in Fig. 4B were obtained by normalizing the yield of Y_2 for each TMPD treatment. Importantly, the period-four pattern of the B-band was conserved even though the loss of the signal corresponding to Y_2 was removed. These values were used to simulate the oscillation pattern following Joliot-Kok model involving Markov chain matrix calculation [36]. The data presented in Fig. 4C further confirm the changes caused by TMPD as illustrated in Fig. 4B. It was found that the centers stabilized in oxidized Q_B declined with increasing concentrations of TMPD (Fig. 4, inset) in darkness before application of a flash. As a result, the $Q_B:Q_B^-$ ratio from 77:23 was modified to 23:77 with 10 μM TMPD. This strongly decreased the probability to obtain $S_2Q_B^-$ luminescent couples after the first flash (Y_1) compared to its effect observed after two flashes (Y_2) as illustrated in Fig. 4A. This means that the intensity of the B-band in the oscillation pattern was greatly affected by the modified $Q_B:Q_B^-$ ratio at the first flash only. It should be noted that even if the $S_0:S_1$ ratio was varied we could not obtain an appropriate simulation without changing the $Q_B:Q_B^-$ ratio and the data could not be explained by a change in the $S_0:S_1$ ratio.

Figure 5 illustrates the B-band oscillation of the thylakoids exposed to 10 μM TMPD, 0.2 μM CCCP or 25 μM hydroxylamine, respectively and then excited with four consecutive flashes. The oscillation pattern of the TMPD treated thylakoids was analogous to the samples exposed to CCCP (Fig. 5). Importantly, the period-four oscillation of the B-band obtained with thylakoids exposed to hydroxylamine was rather different. This oscillation followed neither TMPD nor CCCP (Fig. 5). In this case, the yield of Y_1 decreased by about 95% if compared with the Y_1 of the untreated thylakoids and the maximal yield was found only at Y_3 . The strong diminution in the amplitude of Y_1 was mainly related to the reduction of the Mn cluster from its high valence state to a low valence

state by NH_2OH [6,12,14,37,38]. Indeed, it was reported that with low concentration (μM range) of NH_2OH , the multiline EPR signal due to the S_2 -state appears only after the third flash [39].

Figure 6 shows the changes in the amplitude of Chl fluorescence during the linear warming of thylakoids at the rate $0.5^\circ\text{C}/\text{s}$ from -30°C to 70°C . The amplitude of Chl fluorescence observed at -30°C rapidly declined as the linear warming progressed to 0°C in control thylakoids samples (Fig. 6). However, during the phase of warming from 0°C to $\sim 45^\circ\text{C}$, the magnitude of Chl fluorescence declined much slowly. The simultaneous recording of the TL illustrated the appearance of the major B-band corresponding to the $\text{S}_2\text{Q}_\text{B}^-$ recombination and a shoulder related to $\text{S}_2\text{Q}_\text{A}^-$ recombination (data not shown). Thus, the level of Chl fluorescence signal found in the beginning of the measurement was related to a negligible number of PSII centers in the closed state caused by transient freezing. A sharp increase in the fluorescence level after 45°C (Fig. 6) corresponded to the shift in the electronic equilibrium of $\text{Q}_\text{A} \leftrightarrow \text{Q}_\text{B}^-$ towards the former quinone because of heating [40]. Suppression of the electron transfer beyond Q_A by DCMU paralleled a strong increase in the amplitude of Chl fluorescence at the initial phase of the measurement since the major fraction of PSII centers stabilized in Q_A^- state (Fig. 6). This fluorescence signal rapidly declined from -30°C to 10°C due to Q_A^- reoxidation. A further decline was observed from 10°C to 60°C that was mainly due to recombination between Q_A^- and Y_D . On the other hand, when TMPD ($5 \mu\text{M}$) was added together with DCMU, the decline in Chl fluorescence signal was much slower (Fig. 6). Clearly, this is attributable to a retarded re-oxidation of Q_A^- when recombination with the OEC was inhibited by TMPD in a large fraction of the PSII RC. Further, thylakoids treated with CCCP together with DCMU showed a similar slower decline of the Chl fluorescence signal (Fig. 6) as CCCP strongly accelerated the decay of the higher S-states.

4. Discussion

In dark-adapted PSII centers, the Mn cluster is trapped in a $S_0:S_1$ ratio of 25:75 and the major part of Q_B in its oxidized state. Excitation by a single saturating white flash to initiate charge separation results in the formation of heterogeneous states mainly comprised of $S_1Y_zP680Q_AQ_B$, $S_1Y_zP680Q_AQ_B^-$, $S_2Y_zP680Q_AQ_B$, and $S_2Y_zP680Q_AQ_B^-$ states, respectively. Even though stabilization of other states such as $S_0Q_B^-$ (due to misses) and $S_3Q_B^-$ (owing to double hits) might occur, together they constitute only a minor part. As a whole, the luminescent $S_2Q_B^-$ pairs predominate, while S_1Q_B , $S_1Q_B^-$ and S_2Q_B pairs collectively represent less than 45% of the total population. Taking advantage of the thermoluminescent property of the $S_2Q_B^-$ and $S_3Q_B^-$ charge pairs, we attempted to characterize the mechanism(s) by which the electron transfer processes of PSII are affected by TMPD. To our knowledge this report constitutes the first unambiguous demonstration that low concentration of TMPD strongly interferes with the S-state cycle of the water oxidation process on one hand and affects the electron transport at the Q_B site on the other.

The most important observation is that low concentration of TMPD (μM range) strongly disrupts the back-flow of electrons from Q_B^- and Q_A^- to the S_2 -state of the Mn cluster (Figs. 1 and 3). More than 50% of the B-band emission was lost after exposure of pea thylakoids to 2.5 μM TMPD and then excited with one flash (Fig. 3A). TMPD was shown to be effectively photooxidized with a slow component of 60 ms in the following reaction: $\text{TMPD} + S_2 \rightarrow \text{TMPD}^{\bullet+} + S_1$ [41]. This implies that a fraction of S_2 states generated by the flash was reduced to lower S-states in samples exposed to TMPD in a manner similar to the action of the ADRY agent CCCP (Figs. 1-3). Even S_2Q_B states, that do not contribute for luminescent recombination reaction, are also highly vulnerable for reduction by TMPD. Therefore, a reaction of $\text{TMPD} + S_2Q_B$ would result in the accumulation of S_1Q_B states.

Another aspect of the present work is that TMPD markedly affect the C-band emission (Fig. 1C-D). This effect was seen in thylakoids either excited with single or two consecutive flashes in the absence of forward electron flow beyond Q_A . The contribution of the radiative recombination involving $Y_D^+Q_A^-$ charge pairs declined as a consequence of a rapid loss of the S_2 population and the reduction of Y_D^+ by TMPD. These reactions are similar to those occurring with ADRY agents like FCCP [42]. Notably, the decline in the yield of TL corresponding to the $S_2Q_A^-$ recombination is much higher relative to the loss of $Y_D^+Q_A^-$ charge pairs. This is not surprising because the dark decay kinetics of $Y_D^+Q_A^-$ charge pairs is several times slower when compared to the speed of the $S_2Q_A^-$ decay. Besides, the decay of the former band with a half-time of 10 min at 30°C parallels the suppression of the EPR signal originating from Q_A^- [24]. The above confirms and extends our recent proposal, obtained from fluorescence measurements, that the decay of Q_A^- in the time scale of several seconds in TMPD treated thylakoids does not involve the participation of the S_2 -state [17]. A large increase in the amplitudes of temperature dependent Chl fluorescence emission brought out by TMPD added together with DCMU confirms the above notion. In such samples, the life-time of Q_A^- is increased because of the loss of its recombination partners in the Mn cluster and the absence of its re-oxidation by Q_B (Fig. 6).

The experimental TL glow curves explicitly show that the peaks of B- and Q-bands are shifted to lower temperatures if thylakoids are exposed to TMPD above 2.5-5.0 μ M and then excited with one or two flashes (Fig. 1). With 10 μ M TMPD, the T_m of B-band emission shifted by about 10°C. In the case of thylakoids which were not exposed to TMPD and then excited with a flash, Q-band emission attained its maximum at ~15°C (Fig. 1C, trace 1), whereas the B-band yield at ~35°C (Figs. 1A, trace 1). The temperature gap between the PSII centres which are stabilized in $S_2Q_A^-$ and $S_2Q_B^-$ is thus about 20°C. This difference between the peaking temperatures was not affected by TMPD in spite of their

downshifted respective T_m (Fig. 1A, trace 6 and Fig. 1C, trace 5). The appearance of the B-band manifests the free energy gap between Q_B^- and the S_2 - and S_3 -states of the Mn cluster. On the other hand, the T_m of the Q-band emission is explained by the redox potential difference between Q_A^- and the S_2 -state only. Elimination of the participation of the Q_B/Q_B^- couple in charge recombination by DCMU did not modify the effects of TMPD on $S_2Q_A^-$ back-reaction (Fig. 1C-D). There are several explanations proposed for the shift in the T_m of TL bands either to high or low temperatures [20,22,43-45]. An upshift in the B-band peaking temperature relates to the requirement of higher activation energy as it coincides with a decreased rate constant for radiative recombination. Recently, it was shown that the upshift in the T_m of the B-band emission following a single flash excitation correlates with an enhanced energetic stability of the $S_2Q_B^-$ charge pairs [46]. Conversely, the downshift of the B-band emission was ascribed for the decreased energetic stability of the $S_2Q_B^-$ or $S_3Q_B^-$ pairs [43]. The decomposition of the experimental TL glow curves presented in Fig. 1 (A and B) following equation 1 (see Materials and methods) confirmed the role of E_A to produce such broad differences in the T_m of the B-band emission (data not shown). Thus the PSII centers primarily affected by TMPD were those with higher activation energy requirement for recombination leading to B- and Q-bands. A decline in the T_m observed with increasing concentration of TMPD indicates that PSII centers with charge recombination of lower activation energy were not yet affected by TMPD at the concentration used. In this aspect, it is worth mentioning that at least two populations of PSII exist in different conformational substates. Each population has unique kinetic and thermodynamic properties and therefore contributes for the heterogeneity of the recombination [47]. TMPD might preferentially affect a specific fraction of PSII (spatially segregated in stromal and granal membranes or non- Q_B centers) that participates in the slow process of the heterogenous recombination pathways [47,48].

A significant finding in the present study is the shift of maximal thermoluminescence from Y_1 to Y_2 in the period-four oscillation by treatment with TMPD above 2.5 μM (Fig. 4). Interestingly, the oscillation pattern of the thylakoids treated with 0.2 μM CCCP showed the same trend (Fig. 5). In such samples, illumination by a single turn over flash leads to reduction of oxidized CCCP in the Q_B pocket followed by its replacement by PQ [34]. The upshift in the maximal yield of B-band emission observed with TMPD is attributable to marked changes in the distribution pattern of the $Q_B:Q_B^-$ in the dark prior to application of the flash. This interpretation is strongly supported by simulation of the B-band oscillation pattern using the Joliot-Kok model and Markov chain in matrix formalism (Fig. 4). Simulation of the flash-dependent yields of the B-band clearly revealed a TMPD-dependent decrease in the apparent proportions of Q_B (Fig. 4, inset). Accordingly, the population of PSII centers with Q_B declined from 77% to 37% and 28% with the addition of 5 and 10 μM TMPD, respectively, due to the progressive displacement of the oxidized PQ from the Q_B pocket by oxidized TMPD. The corresponding increase in the calculated population of Q_B^- provides an apparent value that represents the total mixture of PSII centers in the Q_B^- state and PSII centers with a TMPD molecule in the Q_B pocket. In fact, the population of PSII with a TMPD molecule in the Q_B pocket functions in a manner similar to PSII with Q_B^- as one flash is sufficient for the reduction of TMPD and its replacement by an oxidized PQ. Following the second flash, the yield of B-band was maximized in the oscillation pattern as the accumulation of $S_2Q_B^-$ and $S_3Q_B^-$ couples increased upon reduction of Q_B . Thus, the upshift in the maximal yield of the B-band in the period-four oscillation is mainly attributable to the interaction of TMPD with the Q_B binding site. Recent structural data obtained from cyanobacterial PSII at 3.0 \AA resolution has shown that the Q_B pocket has two openings, one facing the membrane domain that should give access to membrane bound PQ, and another directly facing the stromal phase [5]. Assuming that higher plant PSII has a

similar structure, the latter opening must provide an access to the Q_B binding site for more hydrophilic molecules such as TMPD and CCCP.

The flash-dependent yields of the B-band obtained with thylakoids exposed to NH_2OH is markedly different from the samples exposed to TMPD or CCCP. In this case, the yield of TL corresponding to Y_1 found in control thylakoids sample shifted to Y_3 because this agent reduced the Mn cluster in one-electron steps (Fig. 5). In this respect, it should be emphasized that a two-flash shift in the maximal yield of TL in the periodicity of four strictly parallels the two-flash delay in oxygen evolution or S_2 multiline EPR signal formation. Clearly, TMPD (in μM range) does not over-reduce or completely destroy the Mn cluster as NH_2OH does at low concentration [6,10,12,14,37,38]. Our experimental results explicitly reveals that TMPD-dependent decline in the $S_2Q_B^-$ and $S_2Q_A^-$ recombination induced by a flash is analogous to the action of CCCP (Figs. 1-3). The changes in the period-four oscillation brought out by TMPD is remarkably similar to CCCP (Fig. 5). This will necessitate the critical re-examination of the reactivity of the S-states of the Mn cluster to this group of agents since FCCP acts differently [34]. The exact mechanism by which TMPD reduces the Mn cluster is not clear. However, secondary electron carriers of the PSII reaction center complex (Cytochrome b_{559} , β -carotene, and Chl_Z) that are reduced by the quinones of PSII were shown to be reoxidized by $P680^+$ thus completing a slow cyclic electron transport pathway [49]. Such pathway was shown to be involved in photoprotection [50]. $P680^+$ is formed when the OEC fails to provide sufficient reducing equivalents to keep Tyr_Z in the reduced state. This is not the case in the presence of TMPD as the high fluorescence yield demonstrated that Q_A was strongly reduced (Fig. 6). Cytochrome b_{559} , β -carotene, and Chl_Z were all shown from crystallographic data to be located at a too long distance from the Mn cluster to act as direct electron donors [5]. Instead, TMPD might serve as a high potential electron donor to the

higher oxidation states of the Mn cluster being kept in reduced state by one of the reduced secondary electron acceptors. Further experiments will be necessary to verify the influence of TMPD on the redox behavior of the various cofactors of the alternative electron transport chain of PSII.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr. Jean-Marc Ducruet for motivating discussions throughout this study. This research was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and Fonds Québécois de la recherche sur la Nature et les Technologies.

References

- [1]. T.Wydrzynski, K.Satoh, Photosystem II: *The Light-Driven Water-Plastoquinone-Oxidoreductase*, in: T.Wydrzynski and K.Satoh (Eds.), *Advances in photosynthesis and Respiration*, Springer-Verlag, 2006.
- [2]. J.P. Dekker, R. van Grondelle, Primary charge separation in Photosystem II, *Photosyn. Res.* 63 (2000) 195-208.
- [3]. B.A. Diner, G.T. Babcock, Structure, Dynamics, and Energy Conversion Efficiency in Photosystem II, in: D.R. Ort, C.F. Yocum (Eds.), *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1996, pp. 213-247.
- [4]. J. Bowes, A.R. Crofts, Binary oscillations in the rate of re-oxidation of the primary acceptor of photosystem II, *Biochim Biophys Acta* 590 (1980) 373-384.
- [5]. B. Loll, J. Kern, W. Saenger, A. Zouni, J. Biesiadka, Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 angstrom resolution structure of photosystem II, *Nature* 438 (2005) 1040-1044.
- [6]. A.W. Rutherford, A. Boussac, P. Faller, The stable tyrosyl radical in Photosystem II: why D?, *Biochim. Biophys. Acta* 1655 (2004) 222-230.
- [7]. P. Faller, R.J. Debus, K. Brettel, M. Sugiura, A.W. Rutherford, A. Boussac, Rapid formation of the stable tyrosyl radical in photosystem II, *PNAS* 98 (2001) 14368-14373.

- [8]. G. Renger, Photosynthetic water oxidation to molecular oxygen: apparatus and mechanism, *Biochim. Biophys. Acta* 1503 (2001) 210-228.
- [9]. J.P. Dekker, J.J. Plijter, L. Ouwehand, H.J. van Gorkom, Kinetics of manganese redox transitions in the oxygen-evolving apparatus of photosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta* 767 (1984) 176-179.
- [10]. B. Bouges, Action de faibles concentrations d'hydroxylamine sur l'émission d'oxygène des algues *Chlorella* et des chloroplastes d'épinards, *Biochim Biophys Acta* 234 (1971) 102-112.
- [11]. J. Messinger, G. Renger, The reactivity of hydrazine with photosystem-II strongly depends on the redox state of the water oxidizing system, *FEBS Lett.* 277 (1990) 141-146.
- [12]. J. Messinger, U. Wacker, G. Renger, Unusual low reactivity of the water oxidase in redox state S_3 toward exogenous reductants. Analysis of the NH_2OH -induced and NH_2NH_2 -induced modifications of flash-induced oxygen evolution in isolated spinach thylakoids, *Biochemistry* 30 (1991) 7852-7862.
- [13]. J. Messinger, G. Renger, Generation, oxidation by the oxidized form of the tyrosine of polypeptide D2, and possible electronic configuration of the redox states S_0 , S_{-1} , and S_{-2} of the water oxidase in isolated spinach thylakoids, *Biochemistry* 32 (1993) 9379-9386.

- [14]. J.H.A. Nugent, I.P. Muhiuddin, M.C.W. Evans, Effect of hydroxylamine on photosystem II: Reinvestigation of electron paramagnetic resonance characteristics reveals possible S state intermediates, *Biochemistry* 42 (2003) 5500-5507.
- [15]. N.G. Bukhov, G. Sridharan, E.A. Egorova, R. Carpentier, Interaction of exogenous quinones with membranes of higher plant chloroplasts: modulation of quinone capacities as photochemical and non-photochemical quenchers of energy in Photosystem II during light-dark transitions, *Biochim. Biophys. Acta* 1604 (2003) 115-123.
- [16]. N.G. Bukhov, E.A. Egorova, S. Govindachary, R. Carpentier, Changes in polyphasic chlorophyll *a* fluorescence induction curve upon inhibition of donor or acceptor side of photosystem II in isolated thylakoids, *Biochim. Biophys. Acta* 1657 (2004) 121-130.
- [17]. N.G. Bukhov, S. Govindachary, E.A. Egorova, D. Joly, R. Carpentier, *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine initiates the appearance of a well-resolved I peak in the kinetics of chlorophyll fluorescence rise in isolated thylakoids, *Biochim. Biophys. Acta* 1607 (2003) 91-96.
- [18]. D. Joly, C. Bigras, J. Harnois, S. Govindachary, R. Carpentier, Kinetic analyses of the OJIP chlorophyll fluorescence rise in thylakoid membranes, *Photosyn. Res.* 84 (2005) 107-112.
- [19]. T. Kuntzleman, M. McCarrick, J. Penner-Hahn, C. Yocum, Probing reactive sites within the Photosystem II manganese cluster: Evidence for separate populations of manganese that differ in redox potential, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6 (2004) 4897-4904.

- [20]. J.M. Ducruet, Chlorophyll thermoluminescence of leaf discs: simple instruments and progress in signal interpretation open the way to new ecophysiological indicators, *J. Exp. Bot.* 54 (2003) 2419-2430.
- [21]. Y. Inoue, Photosynthetic Thermoluminescence As a Simple Probe of Photosystem II Electron Transport, in: J. Amesz, A.J. Hoff (Eds.), *Biophysical Techniques in Photosynthesis*, Kluwer Academic, Dordrecht, 1996, pp. 93-107.
- [22]. P.V. Sane, Thermoluminescence: a Technique for Probing Photosystem II, in: R. Carpentier (Ed.), *Photosynthesis Research Protocols*, Humana Press, Totowa, New Jersey, USA, 2004, pp. 229-248.
- [23]. I. Vass, Govindjee, Thermoluminescence from the photosynthetic apparatus, *Photosyn. Res.* 48 (1996) 117-126.
- [24]. G.N. Johnson, A. Boussac, A.W. Rutherford, The Origin of 40-50°C thermoluminescence bands in photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta* 1184 (1994) 85-92.
- [25]. N. Boucher, J. Harnois, R. Carpentier, Heat-Stress stimulation of electron flow in a photosystem-I submembrane fraction, *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cellulaire* 68 (1990) 999-1004.
- [26]. R.J. Porra, W.A. Thompson, P.E. Kriedemann, Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous-equations for assaying chlorophyll-*a* and chlorophyll-*b* extracted with 4 different solvents. Verification of the concentration of

chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta* 975 (1989) 384-394.

[27]. J.M. Ducruet, T. Miranda, Graphical and numerical analysis of thermoluminescence and fluorescence F_0 Emission in photosynthetic material, *Photosyn. Res.* 33 (1992) 15-27.

[28]. J.T. Randall, M.H.F. Wilkins, Phosphorescence and electron traps, *Proc. Royal Soc, London, Series A* 184 (1945) 366-408.

[29]. M.J. Delrieau, Simple explanation of the misses in the cooperation of charges in photosynthetic oxygen evolution, *Photochem Photobiol* 20 (1974) 441-454.

[30]. A.W. Rutherford, A.R. Crofts, Y. Inoue, Thermoluminescence as a probe of photosystem II photochemistry, *Biochim. Biophys. Acta* 682 (1982) 457-465.

[31]. W.F. Beck, C.P. Julio, G.W. Brudvig, Active and resting states of the O_2 -evolving complex of photosystem II, *Biochemistry* 24 (1985) 3035-3043.

[32]. S. Demeter, C. Goussias, G. Bernat, L. Kovacs, V. Petrouleas, Participation of the $G = 1.9$ and $G = 1.82$ EPR forms of the semiquinone-iron complex $Q_A^{\cdot-}.Fe^{2+}$ of Photosystem II in the Generation of the Q and C thermoluminescence bands, respectively, *FEBS Lett.* 336 (1993) 352-356.

- [33]. G. Renger, The action of 2-anilinothiophenes as accelerators of the deactivation reactions in the watersplitting enzyme system of photosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta* 256 (1972) 428-439.
- [34]. R. de Wijn, H.J. van Gorkom, Kinetics of electron transfer from Q_A to Q_B in photosystem II, *Biochemistry* 40 (2001) 11912-11922.
- [35]. A.W. Rutherford, Y. Inoue, Oscillation of delayed luminescence from PS II. Recombination of $S_2Q_B^-$ and $S_3Q_B^-$, *FEBS Lett.* 165 (1984) 163-170.
- [36]. V.P. Shinkarev, Oxygen evolution in photosynthesis: Simple analytical solution for the Kok model, *Biophys. J.* 85 (2003) 435-441.
- [37]. W.F. Beck, G.W. Brudvig, Reactions of hydroxylamine with the electron-donor side of photosystem II, *Biochemistry* 26 (1987) 8285-8295.
- [38]. P.J. Riggs-Gelasco, R. Mei, C.F. Yocum, J. Penner-Hahn, Reduced derivatives of the Mn cluster in the oxygen-evolving complex of photosystem II: an EXAFS study, *J Am Chem Soc* 118 (1996) 2387-2399.
- [39]. G.W. Brudvig, W.F. Beck, Oxidation-Reduction and Ligand-Substitution Reactions of the Oxygen-Evolving Center of PSII, in: V.L. Pecoraro (Ed.), *Manganese Redox Enzymes*, VCH Publishers, New York, 1992, pp. 119-140.

- [40]. J.M. Ducruet, Relation between the heat-induced increase of F_0 fluorescence and a shift in the electronic equilibrium at the acceptor side of photosystem 2, *Photosynthetica* 37 (1999) 335-338.
- [41]. N. Tamura, R. Radmer, S. Lantz, K. Cammarata, G. Cheniae, Depletion of photosystem II extrinsic proteins. II. Analysis of the PSII/water-oxidizing complex by measurements of *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine oxidation following an actinic flash, *Biochim. Biophys. Acta* 850 (1986) 369-379.
- [42]. J. Messinger, J.H. Robblee, W.O. Yu, K. Sauer, V.K. Yachandra, M.P. Klein, The S_0 state of the oxygen-evolving complex in photosystem II is paramagnetic: Detection of an EPR multiline signal, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 11349-11350.
- [43]. A. Lardans, B. Forster, O. Prasil, P.G. Falkowski, V. Sobolev, M. Edelman, C.B. Osmond, N.W. Gillham, J.E. Boynton, Biophysical, biochemical, and physiological characterization of *Chlamydomonas reinhardtii* mutants with amino acid substitutions at the Ala (251) residue in the D1 protein that result in varying levels of photosynthetic competence, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 11082-11091.
- [44]. J. Minagawa, Y. Narusaka, Y. Inoue, K. Satoh, Electron transfer between Q_A and Q_B in photosystem II is thermodynamically perturbed in phototolerant mutants of *Synechocystis sp.* PCC 6803, *Biochemistry* 38 (1999) 770-775.

- [45]. D.V. Vavilin, W.F.J. Vermaas, Mutations in the CD-loop region of the D2 protein in *Synechocystis sp* PCC 6803 modify charge recombination pathways in photosystem II *in vivo*, *Biochemistry* 39 (2000) 14831-14838.
- [46]. C. Sicora, R. Wiklund, C. Jansson, I. Vass, Charge stabilization and recombination in Photosystem II containing the D1' protein product of the *psbA1* gene in *Synechocystis* 6803, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6 (2004) 4832-4837.
- [47]. J.S. Townsend, A. Kanazawa, D.M. Kramer, Measurements of $S_2Q_B^-$ recombination by delayed thermoluminescence reveal heterogeneity in photosystem II energetics, *Phytochemistry* 47 (1998) 641-649.
- [48]. F. Rappaport, A. Cuni, L. Xiong, R. Sayre, R.M. Lavergne, Charge recombination and thermoluminescence in photosystem II, *Biophys. J.* 88 (2005) 1948-1958.
- [49]. P. Faller, A. Pascal, A.W. Rutherford, β -Carotene redox reactions in photosystem II: Electron transfer pathway, *Biochemistry* 40 (2001) 6431-6440.
- [50]. P. Faller, R.J. Debus, K. Brettel, M. Sugiura, A.W. Rutherford, A. Boussac, Rapid formation of the stable tyrosyl radical in photosystem II, *PNAS* 98 (2001) 14368-14373.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1: Original traces of thermoluminescence showing typical B-band originating from dark-adapted pea thylakoid membranes excited with a single (A) or two flashes (B) in the absence of (1) or incubated with 2.5 (2), 5.0 (3), 7.5 (4), 10 (5), or 15 μM (6) TMPD, respectively. Changes in the TL emission ascribed for charge recombination in $\text{S}_2\text{Q}_\text{A}^-$ (Q-band), and $\text{Y}_\text{D}^+\text{Q}_\text{A}^-$ (C-band) in the presence of 15 μM DCMU without (1) or together with 2.5 (2), 5.0 (3), 7.5 (4) or 10 μM (5) TMPD, respectively and then excited with a single (C) or two flashes (D).

Figure 2: Thermoluminescence glow curves of the dark-adapted thylakoids excited with a single (Panel A) or two flashes (Panel B) without (1) or with 0.025 (2), 0.05 (3), 0.1 (4), 0.2 (5) and 0.4 μM (6) CCCP, respectively.

Figure 3: Comparative analysis of TMPD (A and B) and CCCP (C and D) -dependent decline in the yield of B-band or Q-band emission in dark-adapted thylakoids excited with a single (closed circles) or two flashes (open circles).

Figure 4: Flash-induced oscillation of B-band emission in dark-adapted thylakoids incubated in the absence (1) or exposed to 2.5 (2), 5.0 (3), 7.5 (4) or 10.0 μM (5) TMPD, respectively. Panel A, period-four oscillation pattern depicted using the absolute amplitudes of the B-band emission; B, oscillation pattern derived from normalizing Y_2 to 100% for each TMPD treatment; C, flash-dependent yield of B-band emission simulated using Joliot-Kok model with the data shown in B. Inset: Dependency of Q_B on TMPD calculated from the simulation presented in C.

Figure 5: The flash-dependent yield of B-band emission from dark-adapted thylakoid membranes without additive (control) or in the presence of 0.2 μM CCCP or 10 μM TMPD or 25 μM NH_2OH .

Figure 6 : Chl fluorescence emission induced by a weak blue LED light applied during linear warming of thylakoids from -30°C to 70°C without additive (control) or in the presence of DCMU alone, 5 μM TMPD with DCMU or 0.2 μM CCCP with DCMU. Heating rate: $0.5^\circ\text{C}/\text{s}$; Sampling rate: 1/s. Each trace is the average of three independent measurements.

Figure 1, Gauthier et al. 2006

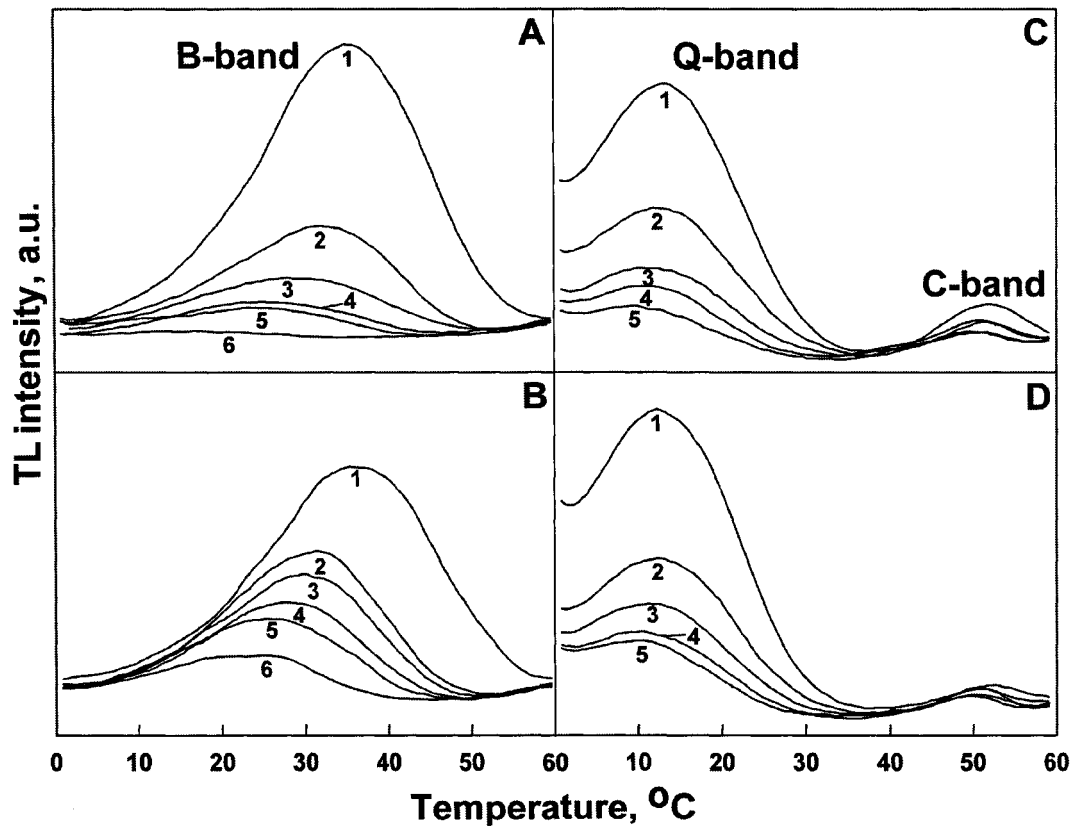


Figure 2, Gauthier et al. 2006

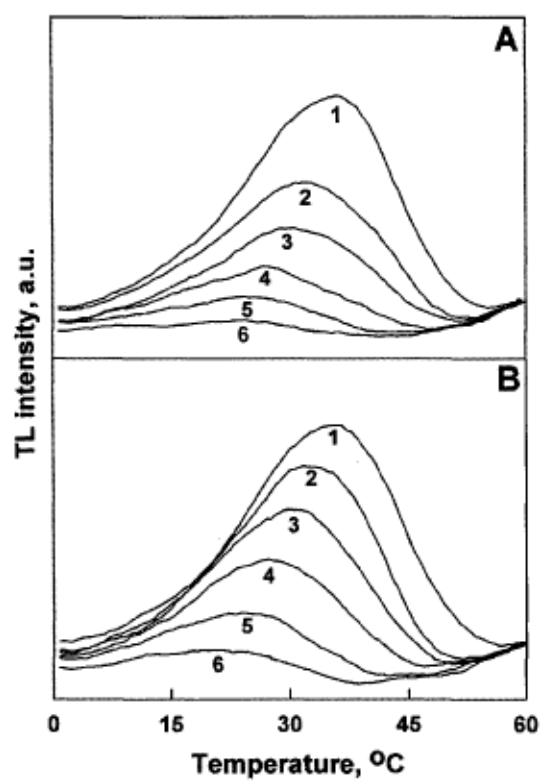


Figure 3, Gauthier et al. 2006

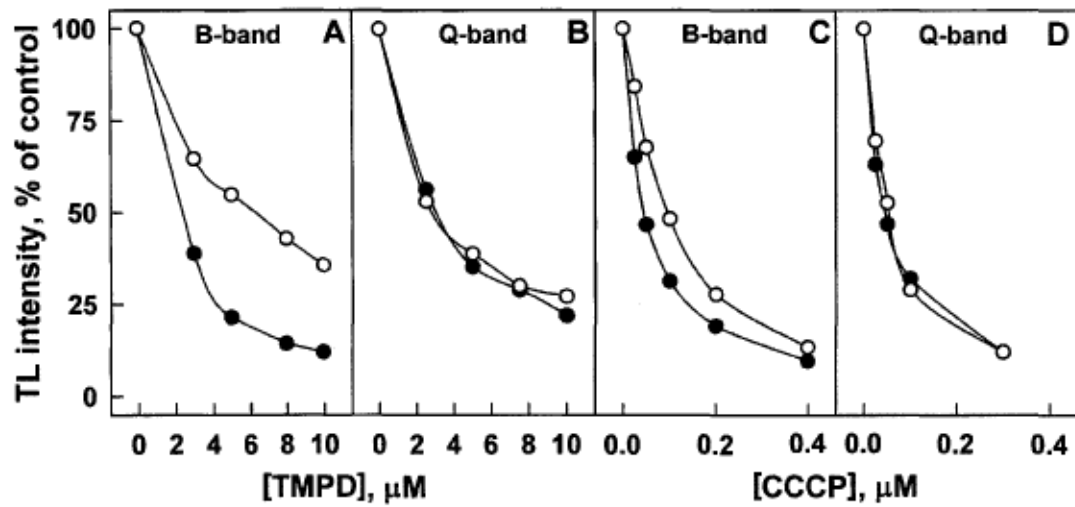


Figure 4, Gauthier et al. 2006

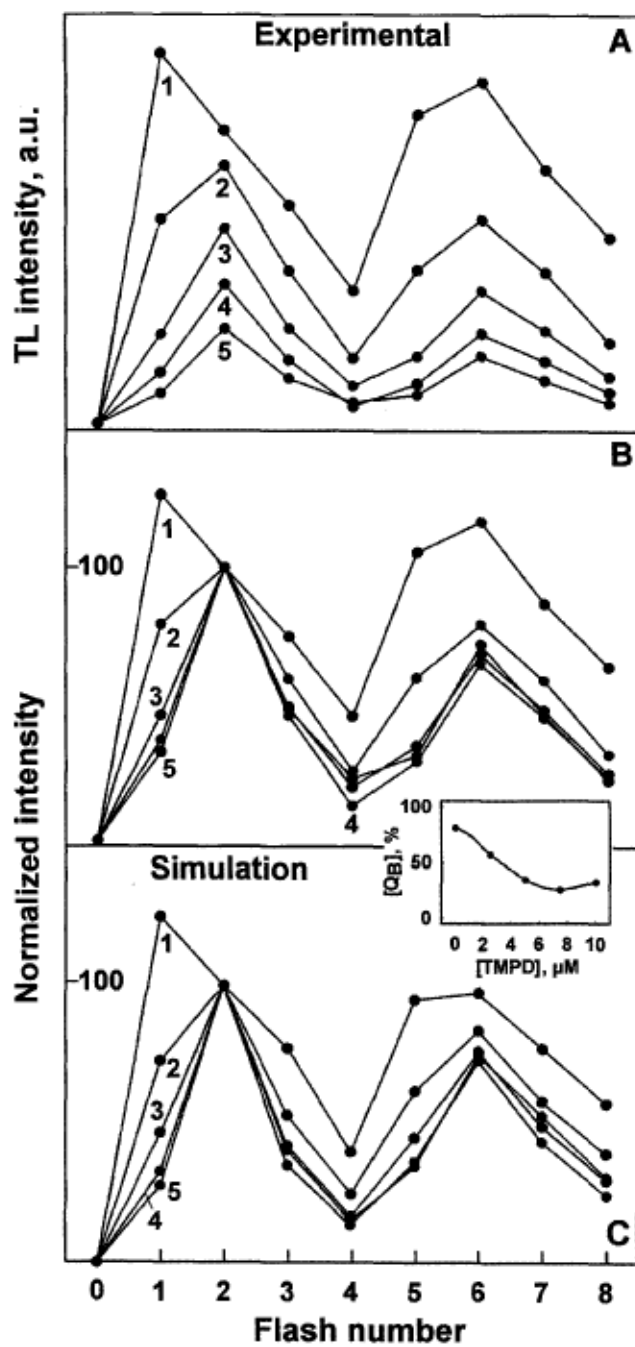


Figure 5, Gauthier et al. 2006

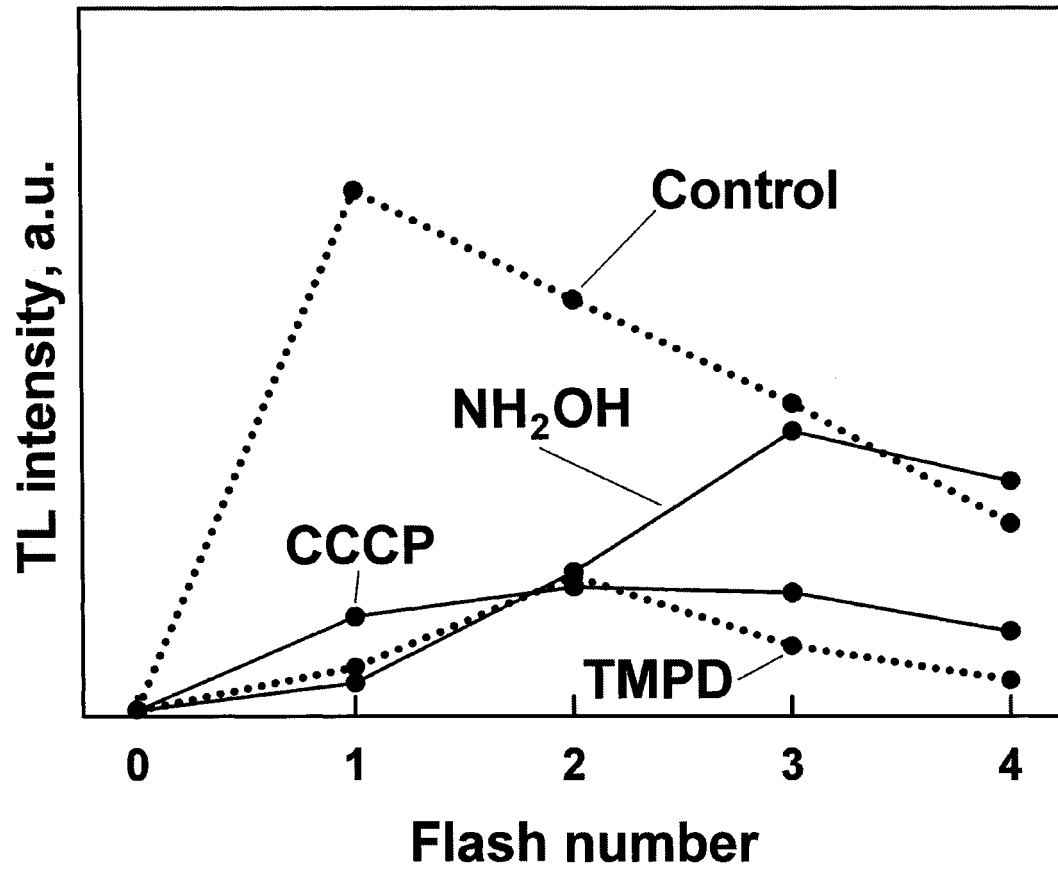
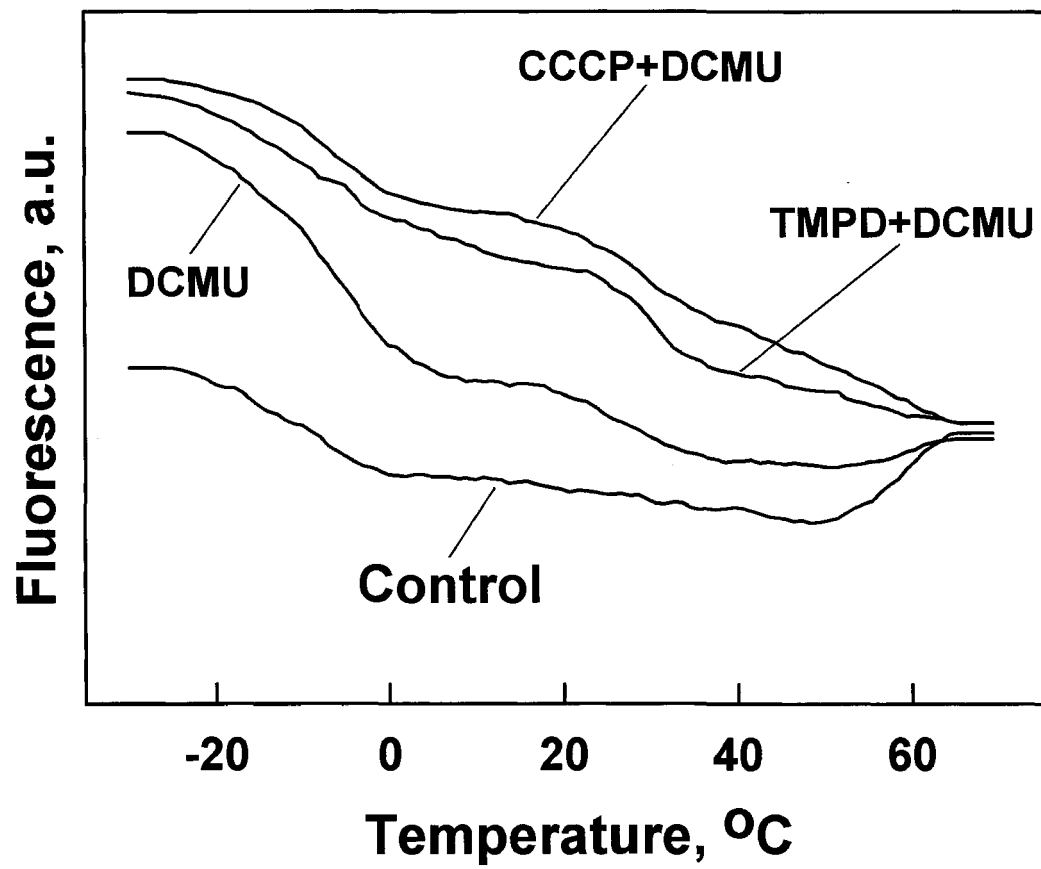


Figure 6, Gauthier et al. 2006



DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS

Même si la plupart des résultats ont été présentés dans l'article, nous présentons ici quelques résultats supplémentaires non publiés pour compléter notre discussion. De plus, le contenu théorique est mieux détaillé que dans l'article afin d'amener le lecteur à une meilleure compréhension des implications de l'ensemble du projet.

Nous avons effectué des mesures de TL avec un éclair et deux éclairs sur des échantillons de thylacoïdes traités avec le TMPD en présence ou non de DCMU. Rappelons qu'un seul éclair amène la majorité des centres réactionnels luminescents dans l'état $S_2Q_B^-$. Et avec deux éclairs, les centres réactionnels luminescents se retrouvent pour la plupart dans l'état $S_3Q_B^-$, suivi de $S_2Q_B^-$ (*voir ANNEXE 4*).

Les résultats du TPMD en l'absence du DCMU sont résumés dans le tableau suivant :

[TPMD] μM	1 ^{er} éclair				2 ^{ème} éclair			
	Intensité relative	% du contrôle	Temp (°C)	Δ°C du contrôle	Intensité relative	% du contrôle	Temp (°C)	Δ°C du contrôle
Contrôle	5642	100	34.9	0.0	4393	100	34.9	0.0
2.5	2144	38	31.3	3.6	2884	66	31.8	3.1
5.0	1149	20	28.1	6.8	2427	55	30.2	4.7
7.5	742	13	24.9	10.0	1880	43	27.6	7.3
10.0	608	11	23.9	11.0	1622	37	25.5	9.4

Tableau 4. Diminution de l'intensité et décalage de la température du maximum de la bande B d'échantillons de thylacoïdes en fonction de la concentration du TMPD pour un et deux éclairs (Référence : Figure 1 de l'article, panneaux A et B, page 91).

Analyse des résultats du *tableau 4*

Comme le tableau le montre, à partir de 2.5 μM TMPD, les différences entre l'intensité de la bande B après (1) éclair et après deux (2) éclairs commencent à être appréciables. L'intensité de la bande B n'est plus que 38% de l'intensité du contrôle contrairement à deux éclairs où le signal de la bande B est encore à 66% du contrôle. À ce stade ci, nous pouvons simplement dire que le signal de la bande B décline plus rapidement avec un éclair qu'avec deux éclairs. Le décalage du maximum de la bande B vers les basses températures est plus important avec un éclair, environ 11.0°C avec 10 μM TMPD comparativement à 9.4°C pour deux éclairs. On remarque que le signal de TL devient plus grand avec deux éclairs à partir de 2.5 μM TMPD. L'intensité de la bande B passe de 5642 (contrôle) à 2144 (2.5 μM) avec un éclair et de 4393 (contrôle) à 2884 (2.5 μM) pour deux éclairs.

Pour déterminer quel côté du PSII (donneur ou accepteur) est responsable du décalage de la température du maximum de la bande B, nous avons répété la même expérience mais cette fois-ci en présence du DCMU.

[TPMD] μM	1 ^{er} éclair				2 ^{ème} éclair			
	Intensité relative	% du contrôle	Temp (°C)	$\Delta^\circ\text{C}$ du contrôle	Intensité relative	% du contrôle	Temp (°C)	$\Delta^\circ\text{C}$ du contrôle
Contrôle	6456	100	13.3	0.0	7241	100	13.3	0.0
2.5	3545	55	11.8	1.5	3748	52	12.3	1.0
5.0	2145	33	10.7	2.6	2690	37	11.2	2.1
7.5	1721	27	10.1	3.2	2036	28	10.2	3.1
10.0	1266	20	9.6	3.7	1825	25	9.6	3.7

Tableau 5. Diminution de l'intensité et décalage de la température du maximum de la bande Q d'échantillons de thylacoïdes en fonction de la concentration du TMPD pour un et deux éclairs (Référence : Figure 1 de l'article, panneaux C et D, page 91).

Analyse des résultats du *tableau 5*

Puisque le transport d'électrons est bloqué à Q_A , il est normal que les résultats pour deux éclairs soient sensiblement pareils à ceux avec un éclair. On remarque par contre une augmentation de l'intensité de la bande Q avec deux éclairs comparativement à un éclair. Cette augmentation est due au fait que le pourcentage de raté est environ 10%. Ainsi, au premier éclair donné à un échantillon traité avec le DCMU, nous avons environ 90% des centres réactionnels qui génèrent la séparation de charge $S_2Q_A^-$. Si on fait le calcul en divisant l'intensité du contrôle avec un éclair par celui avec deux éclairs, on obtient justement $\sim 89\%$.

Ce qui est intéressant avec les résultats obtenus en présence de DCMU, c'est que l'intensité de la bande Q diminue plus lentement que celle de la bande B en fonction de la concentration du TMPD. Par ailleurs, le décalage de la température du maximum est plus faible que celui de la bande B. Il est d'environ 11°C pour la bande B et de 4°C pour la bande Q pour les échantillons traités avec $10\ \mu\text{M}$ de TMPD.

Notre première possibilité pour expliquer les résultats du *tableau 5* est que le TMPD affecterait davantage l'équilibre du couple Q_B/Q_B^- que celui du couple S_1/S_2 . L'énergie nécessaire (E_a) à la recombinaison des charges $S_2Q_B^-$ diminuerait avec la concentration du TMPD parce que ce dernier modifie la dynamique du couple Q_B/Q_B^- en réduisant l'énergie libre pour le transfert d'électrons $Q_B \rightarrow Q_B^-$, et donc la réaction inverse $Q_B \leftarrow Q_B^-$. Même si l'intensité de la bande Q ne diminue pas aussi fortement que la bande B en fonction de la concentration du TMPD, ce dernier affecterait le site Q_B sans pour autant empêcher la recombinaison de charges du côté accepteur. Mais il faut quand même poser la question suivante : serait-il possible pour le TMPD d'affecter la recombinaison de charges sur Q_A comme sur le site Q_B ? Autrement dit, est-ce que le TMPD accepterait des électrons à Q_A , diminuant le signal de TL ? En occupant le site Q_B , le TMPD diminuerait le signal de TL en empêchant les PQs du bassin d'accepter un électron du côté donneur et de se recombinaison par la suite. Cette hypothèse possède l'avantage d'expliquer simplement pourquoi les

courbes d'induction de fluorescence ne sont pas modifiées aux mêmes concentrations où le signal de TL disparaît complètement (15 μM , *figure 1 de l'article à la page 91*). Pour cela, nous devons supposer que le TMPD a une affinité plus grande que le DCMU pour le site Q_B . La réponse, selon des études antérieures, est non. L'affinité du TMPD pour le site Q_B est bien moindre que le DCMU. Toutefois, sans bloquer le transport d'électrons entre Q_A et Q_B , le TMPD affecte le déclin de fluorescence des PSII (*voir ANNEXE 1*).

Notre seconde possibilité pour expliquer la différence des résultats entre les bandes B et Q est qu'en bloquant le site Q_B , le DCMU ralentit la réduction du bassin de PQs donc il y a moins de TMPD qui donnent leur électron au PSI. Lorsque le PSI accepte un électron du TMPD, ce dernier se concentre alors dans le lumen créant un gradient de TMPD qui peut affecter le transport d'électrons. C'est le côté donneur du PSII (près du lumen) qui serait plus affecté par le gradient de TMPD, résultant en une diminution du ΔG du couple S_1/S_2 . Mais cette explication ne tient pas la route à la lumière des résultats obtenus avec des BBY décrits au paragraphe suivant.

Des expériences ont été réalisées avec des membranes enrichies en PSII (BBY) et les résultats sont semblables à ceux obtenus avec les thylacoïdes (*voir figure 17*). Par contre, le signal de TL diminue plus lentement avec la concentration de TMPD et le décalage du maximum vers les basses températures est moindre. Mais ces résultats sont tout à fait attendus parce que le nombre de CR des PSII est deux fois plus grand que le nombre de CR des thylacoïdes pour la même concentration de Chl. C'est comme si le TMPD était deux fois plus concentré avec les thylacoïdes qu'avec les BBY. En tenant compte de cela, la perte de signal de TL est à peu près la même pour les BBY et les thylacoïdes. À la différence des thylacoïdes, les membranes enrichies de PSII produisent un signal de TL qui est composé d'une large bande à 20°C. Cette pseudo bande est en fait le mélange d'une bande B et d'une bande Q. Cette situation provient de la procédure d'isolation des BBY qui réduit considérablement le bassin de PQs. On se retrouve avec l'équivalent de thylacoïdes soumis à une concentration de DCMU qui ne bloque pas tous les centres réactionnels.

Notre troisième possibilité pour expliquer la différence des résultats entre les bandes B et Q nous provient d'une simulation numérique des bandes B et Q nous montrant que la diminution de l'énergie d'activation requise à 10 μM de TMPD est la même pour les deux bandes, soit ~ 30 mV. Ce qui veut dire que cette valeur correspond à la diminution du ΔG du couple S_1/S_2 et seulement ce couple.

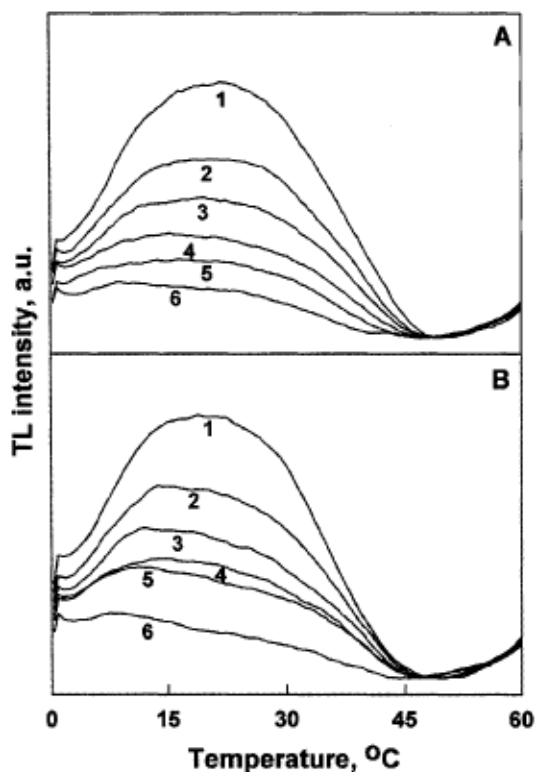


Figure 17. Diminution de l'intensité de la bande B d'échantillons de membranes enrichies en PSII (BBY) pour un et deux éclairs exposés à 0.0 (1), 2.5 (2), 5.0 (3), 7.5 (4), 10.0 (5) et 15.0 μM (6) de TMPD.

Hétérogénéité des PSII : conformation et recombinaison

Depuis très longtemps, plusieurs auteurs parlent de l'existence d'une hétérogénéité de conformation entre les PSII. Ces conformations proviendraient de différences au niveau de la taille des antennes, de la présence/absence de certaines protéines extrinsèques ou de la présence/absence de certains co-facteurs (Andrée et al. 1998; Mamedov et al. 2000;

Tomek et al. 2003), ce qui affecterait le processus de recombinaison (Townsend et al. 1997). Le décalage du maximum des bandes B et Q pourraient être expliqué grâce à la notion d'hétérogénéité. Le TMPD affecterait davantage les CR ayant besoin d'une plus grande E_a pour recombinaison les paires de charges puisque les bandes de TL décalent vers la gauche. À mesure que la concentration du TMPD augmente, le signal provenant des CR requérant une plus grande E_a disparaîtrait tandis que le signal des CR requérant une plus faible E_a pour se recombinaison persisterait.

Fluorescence chlorophyllienne en présence de DCMU

À la lumière des résultats obtenus en TL avec le TMPD et le DCMU, nous avons effectué des mesures simultanées de TL et de fluorescence chlorophyllienne (F_{Chl}) avec des échantillons traités avec le TPMD en l'absence ou non de DCMU. En résumé, la F_{Chl} en présence de DCMU (bloque le transport d'électrons entre Q_A et Q_B en occupant le site Q_B) nous informe sur la capacité du côté donneur à se recombinaison avec Q_A^- (Ducruet et al. 1992). Quand Q_A porte un électron, on dit que le centre réactionnel est fermé et la F_{Chl} est à son maximum (en faisant fi de l'effet des d'atténuateurs non photochimiques de F_{Chl}). Lorsque la charge n'est plus sur Q_A , on dit que le centre réactionnel est ouvert et la F_{Chl} est à son plus bas. Ainsi, en augmentant la température graduellement, on observe la recombinaison de la charge portée par Q_A avec des partenaires situés du côté donneur du PSII. Il est possible de relier le signal de F_{Chl} au pourcentage (ou concentration de Q_A^- , $[Q_A^-]$) de centres réactionnels qui sont fermés. Cette relation entre $[Q_A^-]$ et F_{Chl} n'est toutefois pas linéaire (*voir ANNEXE 5*), à moins d'utiliser des éclairs de faible intensité.

Les mesures de F_{Chl} faites avec un chauffage linéaire dans les mêmes conditions utilisées pour les mesures de TL sont importantes pour vérifier si le TMPD accepte bel et bien des électrons en présence de DCMU. Nous avons effectué des mesures avec le CCCP pour le comparer avec le TMPD. Le CCCP est connu comme étant un désactivateur des états S_2 et S_3 en plus de découpler le transport d'électrons et la translocation de protons. Nous pourrions aussi découvrir avec la fluorescence F_{Chl} si le TMPD accélère ou ralentit le processus général de recombinaison de Q_A^- avec le côté donneur.

Recombinaisons radiatives et non radiatives

Lorsque le DCMU bloque le transport d'électrons entre Q_A et Q_B , il existe plusieurs possibilités pour que la charge portée par Q_A (provenant d'une séparation de charge) se recombine avec un partenaire du côté donneur du PSII. Les recombinaisons non radiatives sont majoritaires à environ 97% (Rappaport et al. 2002). Ces recombinaisons ne produisent pas de luminescence. Et parmi ces recombinaisons, il y a les recombinaisons directes avec P_{680} et les recombinaisons indirectes. Il y a aussi l'effet tunnel direct et indirect (physique quantique). Quant à elles, les recombinaisons radiatives (ou excitoniques) dont font partie les recombinaisons luminescentes de la TL représentent 3% du total des recombinaisons de Q_A . Par contre, le taux de recombinaison de la TL est directement relié au taux du processus général (Rappaport et al. 2005). Ce qui veut dire que si le processus général de recombinaison est affecté par un composé comme le TMPD, il en sera de même pour la TL.

Les résultats de F_{Chl} obtenus avec des échantillons de thylacoïdes traités au TMPD en présence ou non de DCMU sont présentés dans la *figure 6 de l'article à la page 95*.

Analyse des différents tracés de la figure 6 de l'article à la page 95

Tracé 1 (Control)

En absence de DCMU, le transport d'électrons n'est pas bloqué à Q_A et les PQs du bassin peuvent se lier au site Q_B et accepter des électrons provenant du côté donneur à la suite de l'application d'un ou plusieurs éclairs. Si tous les centres réactionnels étaient intacts, le signal F_{Chl} devrait toujours être faible puisque ceux-ci demeurent ouverts, du moins jusqu'à environ 50°C. Le tracé 1 (Control) montre un signal de F_{Chl} qui diminue avec la température jusqu'à ~50°C. Par la suite, le signal augmente jusqu'à la fin du chauffage linéaire. Nous connaissons deux explications pour décrire la première partie du tracé :

- Une portion des centres réactionnels n'est pas capable de réduire les PQs du bassin,

- Amener les échantillons à des températures inférieures à 0°C endommage certains centres réactionnels, malgré la présence d'un cryoprotecteur (glycérol 25% v/v) dans le tampon.

La deuxième partie du tracé qui présente une augmentation du signal jusqu'à la fin du chauffage est explicable par un changement d'équilibre entre Q_A et Q_B à partir de 50°C, faisant en sorte que la charge se stabilise sur Q_A . Cela correspondrait aussi à une perte d'intégrité des membranes des thylacoïdes et la destruction des PSII.

Tracé 2 (DCMU)

Ce tracé est obtenu quand le DCMU est ajouté à un échantillon de thylacoïdes. Le niveau de F_{Chl} est à son maximum au départ du chauffage et diminue jusqu'à environ 50°C. Tout comme le premier tracé analysé, la fluorescence F_{Chl} augmente à partir de 50°C pour les raisons expliquées précédemment. Mais le niveau de F_{Chl} est plus élevé que le tracé 2 (Control) parce que les centres réactionnels sont dès le premier éclair à peu près tous fermés. Avec le chauffage, les recombinaisons entre le côté donneur et accepteur s'accroissent. Pendant que des paires de charges se recombinaient sans générer de la luminescence (~97%), la paire luminescente $S_2Q_A^-$ (maximum à 10°C) se recombine suivi de la recombinaison de la paire $Y_D^+Q_A^-$ (maximum à 55°C).

Tracé 3 (TMPD+DCMU)

Le tracé obtenu pour l'échantillon traité avec le TPMD en présence de DCMU est très important. Avec ce tracé, nous obtenons des informations qui permettent de savoir si le TMPD agit principalement sur le côté donneur ou sur le côté accepteur du PSII. Nous pouvons observer dans le tracé qu'il y a un retard de la perte du signal de la fluorescence comparativement au tracé 2 (DCMU). Ce retard nous indique clairement qu'il y a un ralentissement du processus général de recombinaison. Le partenaire principal du côté donneur S_2 manque donc à l'appel tandis que le donneur auxiliaire Y_D^+ prend la relève (à partir de ~50°C). En plus, le décalage vers les basses températures et la perte du signal de la

bande B présentés dans le *tableau 1* ne sont pas dues à une accélération du taux général de recombinaison puisque nous observons un ralentissement (Rappaport et al. 2005).

Les révélations de la tyrosine D (Y_D)

Quand des thylacoïdes sont traités avec du DCMU, une partie des PSII qui ont une semiquinone sur le site Q_B (Q_B^-) se retrouvent avec leur électron déplacé de Q_B vers Q_A par le DCMU. Ces PSII sont ainsi déjà fermés (Q_A^-) avant l'application d'un éclair et ne génèrent pas l'avancement des états $S_0 \rightarrow S_1$ et $S_1 \rightarrow S_2$. Mais malgré cela, il peut y avoir recombinaison de Q_A^- avec Y_D^+ (bande C) parce qu'un certain nombre de PSII possède une Y_D^+ . La bande C ($\sim 55^\circ\text{C}$) accompagne généralement la bande Q pour la raison précédente. Alors, la modulation du signal de la bande C et de la bande Q nous donne quelques précisions sur la possibilité d'une modification du ratio de la population initiale $S_0:S_1$ en présence du TMPD. Une façon de visualiser la modulation de la bande C et Q est de présenter graphiquement le ratio des bandes C/Q en fonction de la concentration du TMPD.

Nous avons calculé le ratio de la bande C/Q pour des échantillons de thylacoïdes et les résultats sont présentés dans la figure qui suit :

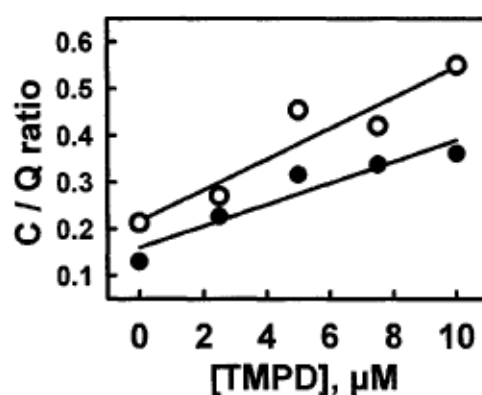


Figure 18. Ratio de l'intensité de la bande C sur la bande Q en fonction de la concentration du TMPD (cercles noirs, 1 éclair; cercles blancs, 2 éclairs).

Le fait que le signal de la bande C diminue moins vite que le signal de la bande Q indique que le partenaire commun de recombinaison, Q_A^- , n'est pas la cause principale de la perte de signal de la bande Q. Y_D^+ est un partenaire de recombinaison auxiliaire quand le partenaire principal S_2 est perdu, que ce soit avant ou après l'application d'un éclair.

Photoactivation (photoassemblage) du noyau de Mn dans les PSII inactifs

Nous avons découvert qu'il fallait se méfier du signal d'une courbe de TL induite avec un seul éclair saturant de lumière intense parce qu'une portion des centres réactionnels adaptés à la noirceur n'est pas complètement assemblée (Mamedov et al. 2000). Ces centres réactionnels dits inactifs se retrouvent surtout dans la marges des grana. Nos échantillons de thylacoïdes, suivant notre protocole d'isolation des membranes de thylacoïdes utilisé, contiennent des PSII provenant des grana, des stroma et des marges. Les grana sont riches en PSII tandis que les stroma sont plutôt riches en PSI (Andrée et al. 1998; Mamedov et al. 2000). Il faut un minimum d'un éclair pour activer ces centres réactionnels inactifs dans les marges. Sans rendre caduque nos résultats obtenus avec un éclair, la comparaison de ceux-ci avec les résultats obtenus avec deux éclairs doit être quelque peu révisée. Donc le signal de TL avec un éclair apparaît plus faible qu'il ne devrait l'être. Cet état de fait, en apparence un problème, nous amène à réfléchir sur l'influence de l'état initial des PSII sur le signal de TL.

Pour évaluer quel est le nombre de PSII non assemblés avant l'application d'un éclair, il faut exposer des échantillons de thylacoïdes à plusieurs éclairs (1 à 8), tracer le motif d'oscillation de la bande B et par la suite simuler le motif sans tenir compte du premier éclair. La simulation d'une dizaine de motifs d'oscillation nous a permis d'évaluer que sur 100 centres réactionnels capables de réduire le bassin de PQs, 16 ont été photoactivés par l'application du premier éclair. Par contre, il est plutôt difficile d'évaluer l'effet du TMPD sur la photoactivation des PSII.

Population initiale et simulation de TL

Le changement du ratio des populations initiales $S_0:S_1$ et $Q_B^-:Q_B$ a comme effet de modifier le motif d'oscillation, surtout pour les premiers éclairs (8). Donc pour évaluer l'effet du TMPD sur le côté donneur et/ou accepteur, il faut tout d'abord vérifier si les populations initiales ont été modifiées.

La *figure 15 à la page 37* nous montre comment le ratio de la population initiale $Q_B^-:Q_B$ peut changer l'allure d'un motif d'oscillation de la bande B en fonction du nombre d'éclairs. Le panneau A montre le motif obtenu avec un échantillon de thylacoïdes adapté dans le noir pendant une courte période de temps. Dans ce type d'échantillon, le ratio de la population $Q_B^-:Q_B$ est environ 1:1. Dans le panneau B, nous voyons un échantillon de thylacoïdes longuement adapté à la noirceur. Dans ce type d'échantillon, le ratio $Q_B^-:Q_B$ est d'environ 1:3.

Motif d'oscillation de la bande de TL produite par plusieurs éclairs (1 à 8)

En soumettant des échantillons de thylacoïdes à plusieurs éclairs, nous pouvons construire un motif d'oscillation de la bande B. À partir de ce motif, nous pouvons comprendre un peu plus les effets d'un composé comme le TMPD sur la chaîne de transport d'électrons du PSII.

Voici la description des trois plus importantes modifications qu'un motif d'oscillation peut subir :

- Un décalage du motif vers la droite; ce type de modification du motif indique que le noyau de Mn est sur-réduit, les premiers éclairs étant utilisés pour ramener le noyau à l'état S_0 ,
- Une perte de signal générale mais conservation du motif; perte d'un partenaire de recombinaison (côté donneur ou accepteur) avant l'application du premier éclair,
- Des changements du motif plus subtiles; modification du ratio des populations initiales $S_0:S_1$ et/ou $Q_B^-:Q_B$.

L'hydroxylamine (NH_2OH) est un composé reconnu pour sa capacité à induire les états S_{-1} , S_{-2} et S_{-3} dans le noyau de Mn (Foster et al. 1985). Nous avons obtenu le motif d'oscillation du NH_2OH jusqu'à 4 éclairs et l'avons comparé à ceux obtenus avec un contrôle, le CCCP et le TMPD. Le comparatif est reproduit dans la **figure 5 de l'article à la page 94**.

Le TMPD a un effet sur le motif d'oscillation semblable à celui du CCCP. Par contre, le NH_2OH , par son effet de sur-réduction, déplace le maximum au troisième éclair (normalement, la maximum apparaît au premier éclair). Ce résultat est cohérent avec ce que nous savons du NH_2OH ; celui-ci peut générer les états S_{-1} , S_{-2} et S_{-3} . Cela implique que plusieurs éclairs devront être nécessaire pour atteindre les états stables S_0 et S_1 .

Des variations dans le pourcentage de raté, de touché et de double touché modifient aussi l'allure du motif (**voir ANNEXE 4**). D'ailleurs, c'est à cause de ces paramètres qu'il y a une atténuation normale du motif. L'amplitude à chaque éclair devient à peu près semblable à partir du 20^{ième} éclair (randomization), le pourcentage des populations S_0 , S_1 , S_2 , S_3 et Q_B^- , Q_B s'approchant de 25, 25, 25, 25 et 50, 50. Pour différentes concentrations de TMPD, nous avons obtenus des motifs d'oscillation qui ont été présentés à la **figure 4 de l'article à la page 93**.

Analyse des résultats de la figure 4 de l'article de la page 93

Comme on peut le voir dans le panneau A le signal de la bande B pour chaque éclair diminue avec la concentration du TMPD. On observe aussi dans le panneau A et B l'inversion de l'intensité entre le premier et le deuxième éclair qui a été décrite dans l'analyse des résultats du **tableau 4**.

Les nouveautés obtenues de ces résultats sont résumées dans les points suivants :

- 1) Il n'y a pas de décalage du motif vers la droite (panneau A et B),

- 2) Une oscillation normale est observée (panneau B), malgré la perte générale de signal de la bande B,
- 3) La simulation du motif colle bien aux résultats (panneau C).

Le point 1) nous informe que le TMPD n'induit tout simplement pas de sur-réduction du noyau de Mn (états S_{-1} , S_{-2} ou S_{-3}). Le point 2) est majeur; il nous indique que le TMPD agit avant l'application des éclairs et son effet est durable ou que les centres réactionnels affectés par le TMPD demeurent affectés durant l'application des éclairs et seulement eux. Si le TMPD était mobile, il y aurait atténuation plus grande du motif, ce qui n'est pas le cas. De plus, le maintien du motif indique que certains centres réactionnels n'ont pas perdu leur partenaire S_2 du côté donneur. Le point 3) est aussi très important. La simulation a été obtenue en faisant varier la population initiale de Q_B^- , Q_B , S_0 et S_1 .

Le **tableau 6** contient les valeurs de Q_B^- et Q_B qui ont été utilisées pour simuler les motifs obtenus aux différentes concentrations de TMPD. Comme on peut voir, la population initiale Q_B est passablement affectée par l'effet TMPD au bénéfice de la population Q_B^- . Pour améliorer la simulation, le calcul à chaque concentration a été fait en ne tenant pas compte du premier éclair, étant donné qu'il y avait photoactivation des PSII rendant caduque le signal de la bande B pour les calculs.

Population initiale (%)				
[TMPD] μ M	S_0	S_1	Q_B^-	Q_B
Contrôle	24	76	21	79
2.5	30	70	44	56
5.0	48	52	68	32
7.5	61	39	78	22
10.0	50	50	70	30

Tableau 6. Valeurs initiales (en pourcentage) des populations S_0 , S_1 , Q_B^- et Q_B qui ont été nécessaires afin de simuler les motifs obtenus à différentes concentrations de TMPD (Référence : Figure 4 de l'article, page 93).

Pour mieux visualiser les modifications faites au motif d'oscillation par la modification du ratio de la population initiale $Q_B^-:Q_B$ et $S_0:S_1$, il est possible de faire une simulation et c'est ce que la **figure 17** présente. Dans cette figure, nous pouvons voir que la modulation de la population initiale $S_0:S_1$ donne un motif d'oscillation qui ne colle pas avec les résultats expérimentaux. Par contre, avec la modulation de la population initiale $Q_B^-:Q_B$, la simulation du motif est bien meilleure.

Nous avons aussi évalué que l'importance des variations de la population initiale $S_0:S_1$ en modulant simultanément les populations initiales de $S_0:S_1$ et $Q_B^-:Q_B$ était beaucoup moindre que celle de $Q_B^-:Q_B$. Nous obtenons une variation de 7% avec la population initiale $S_0:S_1$ contrairement à un variation de 63% pour $Q_B^-:Q_B$. Ce qui signifie que les pourcentages simulés de la population initiale de $Q_B^-:Q_B$ en fonction de la concentration de TMPD sont beaucoup plus significatifs.

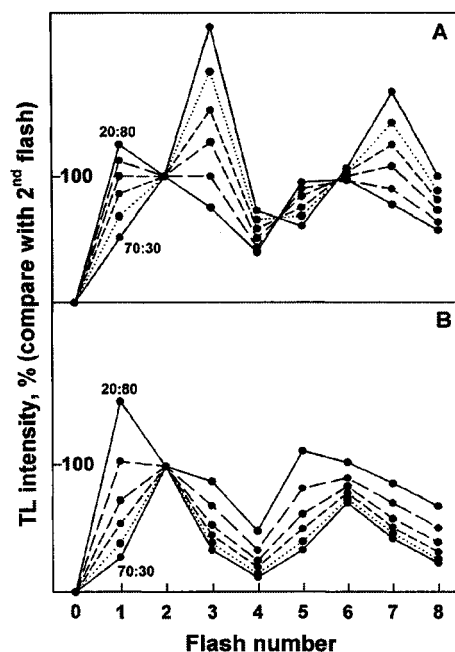


Figure 19. Simulation de motifs d'oscillation de la bande B en faisant varier uniquement la population initiale S_0 et S_1 (panneau A) et la population initiale Q_B^- et Q_B (panneau B).

La conclusion qui peut être tirée de ce dernier résultat est que le TMPD décline fortement la population des centres réactionnels dans les états S_0Q_B et S_1Q_B . Et le point commun entre ces deux états est Q_B . Malgré l'analyse de la *figure 6 de l'article à la page 95*, il est difficile d'expliquer les résultats sans faire intervenir une quelconque action du TMPD du côté accepteur. Mais avant de discuter globalement de tous les résultats obtenus, voici le résumé de nos différentes constatations :

- Déclin du signal de la bande B augmentant avec la concentration de TMPD,
- Signal au 2^{ème} éclair devient plus important que le 1^{er} éclair avec l'ajout de 2.5 μM TMPD,
- Décalage de 11°C du maximum de la bande B vers les basses températures à 10 μM TMPD,
- Déclin du signal de la bande Q augmentant avec la concentration de TMPD,
- Perte du signal de la bande C plus faible que celle de la bande Q,
- Décalage de 4°C du maximum de la bande Q vers les basses températures à 10 μM TMPD,
- Déclin du signal de la bande de TL de BBY augmentant avec la concentration de TMPD comparable à celui de la bande Q (thylacoïdes),
- Retardement de la perte du signal F_{chl} en présence de TMPD,
- Ralentissement général du processus global de recombinaison,
- Pas de décalage du motif d'oscillation vers la droite,
- Oscillation normale malgré la perte du signal à tous les éclairs.

Et les constatations provenant des simulations :

- Diminution de ~30 mV de l'énergie d'activation des paires S_2Q_A et $S_2Q_B^-$ donc modification des couples S_1/S_2 , Q_A/Q_A^- ou Q_B/Q_B^- à 10 μM TMPD,

- Déclin de la population initiale des CR dans l'état Q_B .

Comme nous sommes convaincus que les simulations du motif de la bande B sont valables et que notre interprétation de la *figure 6 de l'article de la page 95* est juste, nous concluons que le TMPD affecte les côtés donneur et accepteur du PSII.

Le TMPD est déjà connu pour être un donneur et un accepteur du PSI et un accepteur du PSII (anciennement utilisé comme accepteur d'électrons du PSII pour des mesures de dégagement d'oxygène). Nous savons que celui-ci, sous sa forme réduite, peut circuler librement à l'intérieur de la membrane et peut se retrouver près du noyau de Mn. Par contre, le TMPD oxydé ne peut pas traverser la membrane. Il doit être réduit à son tour pour traverser la membrane. Nous savons aussi que le TMPD oxydé (stroma) accepte des électrons au site Q_B .

Nous vous présentons ici les résultats de la bande B au 8^{ième} éclair parce que le TMPD est en majorité sous sa forme réduite. Par la simulation des motifs, nous savons que la population $Q_B^-:Q_B$ au 8^{ième} éclair évolue de 47:53 à 53:47 quand la population initiale $Q_B^-:Q_B$ varie de 21:79 à 78:22. En utilisant les résultats du *tableau 6* pour calculer la modification à apporter aux valeurs au 8^{ième} éclair, nous obtenons les valeurs corrigées présentées dans la deuxième colonne du *tableau 7*. Le pourcentage du signal de la bande Q aux différentes concentrations de TMPD est plus élevé que celui de la bande B au 8^{ième} éclair.

Ces derniers résultats sont en accord avec la conclusion précédente sur l'effet du TMPD et s'expliquent comme suit : en présence de DCMU, il y a très peu ou pas de TMPD oxydés qui se lient au site Q_B pour être réduit. En absence de DCMU, les molécules de TMPD oxydés ont de forte chance d'être complètement réduits au 8^{ième} éclair. Ce qui a pour effet d'amplifier l'effet du TMPD sur le côté donneur. Grâce aux résultats du *tableau 7*, nous estimons l'amplification à environ 125%. Ceci nous confirme que nos préparations de

TMPD (conservées à la noirceur) contiennent environ quatre (4) molécules sous la forme réduite pour une (1) molécule sous la forme oxydée.

[TMPD] μM	Bande Q	Bande B	Molécules de TMPD / CR
	1 ^{ier} éclair (% du contrôle)	8 ^{ième} éclair (% corrigé)	
Contrôle	100	100	0
2.5	55	48	5
5.0	33	31	9
7.5	27	21	14
10.0	20	14	18

Tableau 7. Valeurs du signal de la bande Q au 1^{ier} éclair et de la bande B au 8^{ième} éclair (en pourcentage) pour différentes concentrations de TMPD. En admettant qu'il y a environ 500 Chl par CR dans un échantillon de thylacoïdes, la concentration de CR est égale à ~555 nM pour un échantillon de 200 μg de Chl par ml.

Ainsi, à la concentration de 2.5 μM de TMPD, au premier éclair et en absence de DCMU, il y a environ 4 molécules réduites de TMPD et une molécule oxydée pour chaque CR. Avec quatre (4) molécules réduites de TMPD par CR nous perdons 45% du signal (bande Q, 2.5 μM TMPD). Avec sept (7) molécules réduites par CR nous perdons 67% du signal (bande Q, 5.0 μM TMPD). À partir des résultats obtenus et présentés au **tableau 6**, nous avons calculé qu'avec une (1) molécule oxydée de TMPD par CR nous perdons 31% des CR qui étaient dans l'état Q_B (bande B, 2.5 μM TMPD). Avec deux (2) molécules oxydées par CR nous perdons 48% des CR qui étaient dans l'état Q_B (bande B, 5.0 μM TMPD).

Nous avons évalué que l'affinité du TMPD (constante d'association) sous la forme oxydée (TMPD^O) pour le site Q_B est environ 3.6 fois plus importante que celle de la forme réduite (TMPD^R) pour son site d'action près du complexe de dégagement d'oxygène du PSII.

$$K^{TMPD^O} = \frac{[TMPD^O \cdot CR]}{[TMPD^O \text{ libre}][CR \text{ libre}]} \quad \text{et} \quad K^{TMPD^R} = \frac{[TMPD^R \cdot CR]}{[TMPD^R \text{ libre}][CR \text{ libre}]}$$

PERSPECTIVES

La complexité de l'effet du TMPD sur le transport d'électrons du PSII révélée par nos résultats ne nous permet pas de décrire précisément son mode d'action. Pour cette raison, nous désirons utiliser la technique du dégagement d'oxygène généré par des éclairs pour étudier davantage le TMPD. Avec cette technique, il sera facile de vérifier que le TMPD affecte l'avancement des états S du noyau de Mn. Il serait aussi important de vérifier l'implication du cytochrome b_{559} dans un éventuel transport cyclique (McCauley et al. 1987) dans le PSII induit par la présence du TMPD près du CDO.

Les résultats obtenus au sujet de la photoactivation du noyau de Mn nous amènent à vouloir vérifier des résultats précédents publiés par d'autres équipes qui ne tenaient pas compte de la photoactivation du premier éclair. Nous désirons aussi utiliser le motif d'oscillation de la bande B comme outils d'analyse pour les cas suivants :

- Isolation de membranes du stroma lemellae, marges et grana pour mieux comprendre les phénomènes de photoactivation des PSII (over-reduced Mn) et aussi étudier l'hétérogénéité des PSII (non-reducing Q_B). Le contenu en PSII des thylacoïdes diffère d'une région à une autre. Il est possible en isolant les différentes régions d'étudier leur constitution et l'état des PSII présents.
- Études de d'autres ADRY comme le ANT 2p (ADRY) et FCCP. Nous désirons approfondir nos connaissances sur cette classe de composés qui a été largement étudiée dans le passé pour vérifier si l'hypothèse d'un transport cyclique autour du PSII et leur mobilité autour du PSII tient toujours la route.

Avec la technique du dégagement d'oxygène généré par des éclairs, il sera possible d'utiliser de particules BBY (membranes enrichies en PSII et pauvres en PSI) en présence de dPQs (dodecyl-PQs) pour obtenir des motifs d'oscillation du dégagement d'oxygène. La raison pour laquelle nous désirons ajouter des dPQs est que la technique d'isolation des

BBY fait en sorte que le bassin de PQs est presque totalement perdu. De plus, cette façon de faire permettrait d'annuler presque complètement l'action d'un composé sur le PSI et du même coup l'effet de ce dernier. Il est impossible d'utiliser la TL en ajoutant des dPQs car le signal de TL est malheureusement fortement atténué.

BIBLIOGRAPHIE

Allen FA, Bennet J, Steinback KE, Arntzen CJ (1981), Chloroplast protein phosphorylation couples plastoquinone redox state to distribution of excitation energy between photosystems, *Nature*, 291, 25-29.

Andrée S, Weis E, Krieger A (1998) Heterogeneity and photoinhibition of photosystem II studied with thermoluminescence, *Plant Physiol.*, 116: 1053-1061

Arnold WA, Azzi JR (1968) Chlorophyll energy levels and electron flow in photosynthesis, *Proc Natl Acad Sci USA*, 61: 29-35

Arnold WA (1991) Experiments, *Photosyn. Res.*, 27: 73-82

Asami T, Koike H, Inoue Y, Takahashi N, Yoshida S (1988) Structure-activity relationships and physiological aspects of new photosynthetic electron transport inhibitors, 3-alkylamino-alkyliden-2H-pyran-2,4(3H)-diones (APs), *Z Naturforsch*, 43c: 857-861

Berthold DA, Babcock J, Yocum CF (1981) A highly resolved oxygen-evolving Photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes, *FEBS Letters*, 134: 231-234

Bertsch WF, Azzi JR (1965), A relative maximum in the decay of long-term delayed light emission from the photosynthetic apparatus, *Biochim. Biophys. Acta*, 94, 15-26

Björkman O, Demmig B (1987), Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins, *Planta*, 170, 489-504

Björn LO (1971), Far-red induced, long-lived afterglow from photosynthetic cells. Size of afterglow unit and path of energy accumulation and dissipation, *Photochem. Photobiol.*, 13, 5-20

Bowes JM, Crofts AR (1980), Binary oscillation in the rate of reoxidation of the primary acceptor of photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta*, 590, 373-384

Briantais JM., Vernotte C, Picaud M, Krause GH (1979), A quantitative study of the slow decline of chlorophyll a fluorescence in isolated chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, 548, 128-138

Bukhov NG, Govindachary S, Egorova EA, Joly D, Carpentier R (2003), N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine initiates the appearance of a well-resolved I peak in the kinetics of chlorophyll fluorescence rise in isolated thylakoids, *Biochim. Biophys. Acta*, 1607, 91-96

- Bukhov NG, Egorova EA, Govindachary S, Carpentier R (2004), Changes in polyphasic chlorophyll *a* fluorescence induction curve upon inhibition of donor or acceptor side of photosystem II in isolated thylakoids, *Biochim. Biophys. Acta*, 1657, 121-130
- Burnap RL, Shen J-R, Jursinic PA, Inoue Y, Sherman LA (1992), Oxygen yield and thermoluminescence characteristics of a cyanobacterium lacking the manganese-stabilizing protein of photosystem II, *Biochemistry*, 31, 7404-7410
- Butler WL (1978), Energy-distribution in Photo-chemical apparatus of photosynthesis, *Annual Review in Plan Physiology*, 29, 345-378
- Chapman DJ, Vass I, Barber J (1991), Secondary electron transfer reactions of the isolated photosystem II reaction center after reconstitution with plastoquinone-9 and diacylglycerolipids, *Biochim. Biophys. Acta*, 1057, 391-398
- Cramer WA, Furbacher PN, Szczepaniak A, Tae GS (1991), Electron transport between Photosystem II and Photosystem I, *Curr. Top. Bioenerg.*, 16, 179-222
- Crofts AR, Robinson HH, Snozzi M (1984), Reactions of quinones at catalytic sites, diffusional role in H-transfer, *Advances in Photosynthesis Research* (C. Sybesma, ed.), 1, 461-468, Martinus Nijhoff, Dordrecht
- Dau H (1994), Molecular mechanisms and quantitative models in variable photosystem II fluorescence, *Photochem. Photobiol.*, 60, 1-23
- Demeter S, Vass I, Horvath G, L  ufer A (1984), Charge accumulation and recombination in photosystem II studied by thermoluminescence, II : Oscillation of the C-band induced by flash excitation, *Biochim. Biophys. Acta*, 764, 33-39
- Demeter S, Vass I, Hideg E, Sallai A (1985a), Comparative thermoluminescence study of triazine-resistant and -susceptible biotypes of *Erigeron canadensis* L, *Biochim. Biophys. Acta*, 806, 16-24
- Demeter S, Rozsa Z, Vass I, Hideg E (1985b), Thermoluminescence study of charge recombination in photosystem II at low temperature, II : Oscillatory properties of the Z and A thermoluminescence bands in chloroplasts dark-adapted for various time periods, *Biochim. Biophys. Acta*, 809, 379-387
- Demeter S, Goussias C, Bernet G, Kovacs L, Petrouleas V (1993), Participation of the $g = 1.9$ and $g = 1.82$ EPR forms of the semiquinone-iron complex, $Q_A^-Fe^{2+}$ of photosystem II in the generation of the Q and C thermoluminescence bands, respectively, *FEBS Lett*, 336, 352-356

- Demeter S, Vass I (1984), Charge accumulation and recombination in photosystem II studied by thermoluminescence, I : Participation of the primary acceptor Q and secondary acceptor B in the generation of thermoluminescence in chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, 764, 24-32
- Desai TS, Sane PV, Tatake VG (1975), Thermoluminescence studies on spinach leaves and *Euglena*, *Photochem. Photobiol.*, 21, 345-350
- DeVault D, Govindjee, Arnold WA (1983), Energetics of photosynthetic glow peaks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 983-987
- DeVault D, Govindjee (1990), Photosynthetic glow peaks and their relationship with the free energy changes, *Photosyn. Res.*, 24, 175-181
- Ducruet JM (2003), Chlorophyll thermoluminescence of leaf discs : simple instruments and progress in signal interpretation open the way to new ecophysiological indicators, *J. Exp. Bot.*, 54, 2419-2430
- Ducruet JM, Miranda T (1992), Graphical and numerical analysis of thermoluminescence and fluorescence F_0 emission in photosynthetic material, *Photosyn. Res.*, 33, 15-27
- Ducruet JM, Vavilin D (1999), Chlorophyll High-Temperature Thermoluminescence Emission as an Indicator of Oxidative Stress : Perturbating effects of Oxygen and Leaf Water Content, *Free Rad. Res.*, 31, 187-192
- Duysens L.N.M., Sweers HE (1963), Mechanism of two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence, *Studies on microalgae and photosynthetic bacteria*, 353-372, University of Tokyo Press.
- Etienne AL, Ducruet JM, Ajlani G, Vemotte C (1990), Comparative studies on electron transfer in photosystem II of herbicide-resistant mutants from different organisms, *Biochim. Biophys. Acta*, 1015, 435-440
- Evans MCW, Nugent JHA (1993), In : *The Photosynthetic Reaction Centre*, (J. Deisenhofer & J.R. Norris, eds), 1, 391-415, Academic Press, San Diego
- Forster V, Junge W (1985), Stoichiometry and kinetics of proton release upon photosynthetic water oxidation, *Photochem. Photobiol.*, 41, 183-190.
- Fowler CF (1977), Proton evolution from photosystem II. Stoichiometry and mechanistic considerations, *Biochim. Biophys. Acta*, 462, 414-421
- Genty B, Briantais JM, Baker NR (1989), The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence, *Biochim. Biophys. Acta*, 990, 87-92

- Ghanotakis DF, Yocum CF (1990), Photosystem II and the oxygen-evolving complex, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 41,225-276
- Glazer AN, Melis A (1987), Photochemical reaction centers; structure, organization and function, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 38, 11-45
- Gleiter H, Ohad N, Hirschberg J, Fromme R, Renger G, Koike H, Inoue Y (1990), An application of thermoluminescence to herbicide studies, *Z Naturbsch*, 45c, 353-358
- Gleiter H, Ohad N, Koike H, Hirschberg J, Renger G, Inoue, Y (1992), Thermoluminescence and flash-induced oxygen yield in herbicide resistant mutants of the D1 protein in *Synechococcus* PCC7942, *Biochim. Biophys. Acta*, 1140, 135-143
- Gleiter H, Haag E, Shen J-R, Eaton-Rye J, Inoue Y, Vermaas WFJ, Renger G (1994), Functional characterization of mutant strains of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 lacking short domain within the large, lumen-exposed loop of the chlorophyll-protein CP47 in photosystem II, *Biochemistry*, 33, 12063-12071
- Hansson O, Wydrzynski T (1990), Current perception of Photosystem II, *Photosyn. Res.*, 23,131-162
- Hagen C, Pascal A, Horton P, Inoue Y (1995), Influence of changes in the photon protective energy dissipation on red light-induced detrapping of the thermoluminescence Z-band, *Photochem. Photobiol.*, 62, 514-521
- Hideg E, Scott RQ, Inaba H (1991), Spectral resolution of long term (0.5-50 s) delayed fluorescence from spinach chloroplasts, *Arch Biochem. Biophys.*, 285, 371-372
- Hideg E, Vass I (1993), The 75°C thermoluminescence band from membrane-chlorophyll interaction, *Photochem. Photobiol.*, 58, 280-283
- Holzwarth AR (1990), The functional organisation of the antenna pigments in higher plants and green algae as studied by time-resolved fluorescence techniques, In *Current research in Photosynthesis* (ed. M. Baltscheffsky), vol 2, 223-230, Kluwer Academic Publishers
- Homann P (1999), Reliability of Photosystem II thermoluminescence measurements after sample freezing : Few artifact with Photosystem II membranes, but gross distortions with certain leaves, *Photosyn. Res.* 62, 219-229
- Hope AB (1993), The chloroplast cytochrome *bf* complex : a critical focus on function, *Biochim. Biophys. Acta*, 1143, 1-22
- Horton P, Bowyer JR (1990), Chlorophyll fluorescence transients, In *Methods in Plant Biochemistry*, vol 4, 259-296

Ichikawa T, Inoue Y, Shibata K (1975), Characteristics of thermoluminescence bands of intact leaves and isolated chloroplasts in relation to the water-splitting activity in photosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, 408, 228-239

Inoue Y (1976), Manganese catalyst as a possible cation carrier in thermoluminescence, *FEBS Letters*, 72, 279-282

Inoue Y (1981), Charging of the A-band of thermoluminescence, dependent on the S₃ state in isolated chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, 634, 309-320

Inoue Y (1983), Recent advances in the studies thermoluminescence of photosystem II, In : Inoue Y, Crofts AR, Govindjee, Murata N, Renger G, Satoh K (eds), *The oxygen Evolving System of Photosynthesis*, pp. 439-450, *Academic Press Japan, Tokyo*

Inoue Y (1995), Photosynthetic thermoluminescence as a simple probe of Photosystem II electron transport. In : Amesz J and Hoff AJ (eds) *Biophysical Techniques in Photosynthesis*, pp 93-107, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands

Inoue Y, Ichikawa T, Shibata K (1976), Development of thermoluminescence bands during greening of wheat leaves under continuous and intermittent illumination, *Photochem. Photobiol.*, 23, 125-130

Inoue Y, Yuashita T, Kobayashi Y, Shibata K (1977), Thermoluminescence changes during inactivation and reactivation of the oxygen-evolving system in isolated chloroplasts, *FEBS Letters*, 82, 303-306

Inoue Y, Shibata K (1977a), Thermoluminescence bands of chloroplasts as characterized by flash excitation, In : Hall DO, Coombs J and Goodwin TW (eds), *Proc Fourth Intl Congr on Photosynthesis*, pp 211-221, The Biochemical Society, London

Inoue Y, Shibata K (1977b), Oscillation of thermoluminescence at medium-low temperature, *FEBS Letters*, 85, 193-197

Johnson GN, Boussac A, Rutherford AW (1994), The origin of 40-50°C thermoluminescence bands in photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta*, 1184, 85-92

Joliot P, Barbieri G, Chabaud R (1969), Un nouveau modèle des centres photochimiques du Système II, *Photochem. Photobiol.*, 10, 309-329

Joly D, Bigras C, Harnois J, Govindachary S, Carpentier R (2005), Kinetic analyses of the OJIP chlorophyll fluorescence rise in thylakoid membranes, *Photosyn. Res.*, 84, 107-112

Junge W, Polle A (1986), Theory of proton flow along appressed thylakoid membranes under non-stationary and stationary conditions, *Biochim. Biophys. Acta*, 848, 265-273

- Koike H, Siderer Y, Ono T, Inoue Y (1986), Assignment of thermoluminescence A band to $S_3Q_B^-$ charge recombination: sequential stabilization of S_3 and Q_B^- by a two-step illumination, *Biochim. Biophys. Acta*, 850, 80-89
- Koike H, Asami T, Yoshida S, T Kahashi N, Inoue Y (1989), A new-type photosystem II inhibitor which blocks electron transport in water-oxidation system, *Z Naturforsch*, 44c, 271-279
- Koike H, Inoue Y (1987), A low temperature sensitive intermediate state between S_2 and S_3 in photosynthetic water oxidation deduced by means of thermoluminescence measurement, *Biochim. Biophys. Acta*, 894, 573-511
- Kok B, Forbush B, McGroin M (1970), Cooperation of charges in photosynthetic oxygen evolution. 1- linear four step mechanism, *Photochem. Photobiol.*, 11, 495-503
- Kramer DM, Roffey RA, Govindjee, Sayre RT (1994), The A_T thermoluminescence band from *Chlamydomonas reinhardtii* and the effects of mutagenesis of histidine residues on the donor side of the photosystem II D1 polypeptide, *Biochim. Biophys. Acta*, 1185, 228-237
- Kramer DM, Crofts AR (1994), Re-examination of the properties and function of the *b* cytochromes of the thylakoid cytochrome *bf* complex, *Biochim. Biophys. Acta*, 1184, 193-201
- Krause GB, Briantais JM, Verrotte C (1982), Photoinduced quenching of chlorophyll fluorescence in intact chloroplasts and algae, *Biochim. Biophys. Acta*, 679, 116-124
- Krause GB, Weiss E (1991), Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: the basis, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42, 313-349
- Krieger A, Weis E, Demeter S (1993), Low-pH-induced Ca^{2+} ion release in the water-splitting system is accompanied by a shift in the midpoint redox potential of the primary quinone acceptor Q_A , *Biochim. Biophys. Acta*, 1144, 411-418
- Krieger A, Rutherford AW, Johnson GN (1995), On the determination of redox midpoint potential on the primary quinone electron acceptor, Q_A , in Photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta*, 1229, 193-201
- Kuntzleman T, McCarrick M, Penner-Hahn J, Yocum C (2004), Probing reactive sites within the Photosystem II manganese cluster: Evidence for separate populations of manganese that differ in redox potential, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 6, 4897-4904
- Läuffer A, Inoue Y, Shibata K (1978), Enhanced charging of thermoluminescence A band by a combination of flash and continuous light excitation, In: Akoyunoglou (ed), *Proc Intl Symp on Chloroplast Development*, pp 379-387, Elsevier, Amsterdam

- Lavergne J, Leci E (1993), Properties of inactive photosystem II centers, *Photosynthesis Res.*, 35, 323-343
- Lavorel J, Etienne AL (1977), In vivo chlorophyll fluorescence, In : *Primary processes of photosynthesis*, Barber J ed., Elsevier, pp 203-268
- Mamedov F, Stefansson H, Albertsson PA, Styring S (2000), Photosystem II in different parts of the thylakoid membrane : a functional comparison between different domains, *Biochemistry*, 39, 10478-10486
- Marder JB, Droppa M, Caspi V, Raskin VI, Horvath G (1998), Light- independent thermoluminescence from greening barley leaves : evidence for involvement of oxygen radicals and free chlorophylls, *Physiol. Plantarum*, 104, 713-719
- McCauley SW, Melis A, Tang GMS, Arnon DI (1987), Protonophores induce plastoquinol oxidation and quench chloroplast fluorescence : Evidence for a cyclic, proton-conducting pathway in oxygenic photosynthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 8424-8428
- Messinger J, Renger G (1990), The reactivity of hydrazine with photosystem II strongly depends on the redox state of the water oxidizing system, *FEBS Letters*, 277, 141-146
- Messinger J, Wacker U, Renger G (1991), Unusual low reactivity of the water oxidase in redox state S₃ toward exogenous reductants. Analysis of the NH₂OH-induced and NH₂NH₂-induced modifications of flash-induced oxygen evolution in isolated spinach thylakoids, *Biochemistry*, 30, 7852-7862
- Messinger J, Renger G (1993), Generation, oxidation by the oxidized form of the tyrosine of polypeptide D2, and possible electronic configuration of the redox states S₀, S₁, and S₂ of the water oxidase in isolated spinach thylakoids, *Biochemistry*, 32, 9379-9386
- Miranda T, Ducruet JM (1995), Characterization of the chlorophyll thermoluminescence afterglow in dark-adapted or far-red-illuminated plant leaves, *Plant Physiol. Biochem.*, 33, 689-699
- Misra AN, Dilnawaz F, Misra M, Biswal AK (2001), Thermoluminescence in chloroplasts as an indicator of alterations in photosystem 2 reaction centre by biotic and abiotic stresses, *Photosynthetica*, 39 (1), 1-9
- Munday JC jr, Govindjee (1969), Light-Induced Changes in the Fluorescence Yield of chlorophyll a in vivo. III. The Dip and the Peak in the Fluorescence Transient of *Chlorella pyrenoidosa*, *Biophysic. J.*, 9, 1-21
- Nixon PJ (1994), *Abstracts BBSRC Second Robert Hill Symposium on Photosynthesis*, p. 8, Imperial College, London

- Noguchi T, Inoue Y, Sonoike K (1992), Thermoluminescence emission at liquid helium temperature from photosynthetic apparatus and purified pigments, *Biochim. Biophys. Acta*, 1141, 18-24
- Ono T, Inoue Y (1985), S-state turnover in the O₂-evolving system of CaCl₂-washed photosystem II particles depleted of three peripheral proteins as measured by thermoluminescence : Removal of 33kDa protein inhibits S₃ to S₄ transition, *Biochim. Biophys. Acta*, 806, 331-340
- Ono T, Inoue Y (1989), Removal of Ca by pH 3.0 treatment inhibits S₂ to S₃ transition in photosynthetic oxygen evolution system, *Biochim. Biophys. Acta*, 973, 443-449
- Ono T, Inoue Y (1990), Abnormal redox reactions in photosynthetic O₂-evolving centers in NaCl / EDTA-washed PSII. A dark-stable EPR multiline signal and a new unknown positive charge accumulator, *Biochim. Biophys. Acta*, 1020, 269-277
- Ono T, Inoue Y (1991a), Biochemical evidence for histidine oxidation in photosystem II depleted of the Mn-cluster for O₂-evolution, *FEBS Letters*, 278, 183-186
- Ono T, Inoue Y (1991b), A possible role of redox active histidine in photoligation of Mn into photosynthetic O₂-evolving enzyme, *Biochemistry*, 30, 6183-6188
- Owens TG (1996), Processing of excitation energy by antenna pigments, In : *Photosynthesis and the Environment*, Baker NR ed, Kluwer, pp 1-23
- Randall JT, Wilkins MHF (1945), Phosphorescence and electron traps, *Proc. Royal Soc, London, Series A*, 184, 366-408
- Rappaport F, Guergova-Kuras M, Nixon PJ, Diner BA, Lavergne J. (2002), Kinetics and pathways of charge recombination in photosystem II, *Biochemistry*, 41(26):8518-27
- Rappaport F, Cuni A, Xiong L, Sayre R, Lavergne J (2005), Charge Recombination and Thermoluminescence in Photosystem II, *Biophysical Journal*, 88, 1948-1958
- Rich PR, Madgwick SA, Brown S, von Jagow G, Brandt U (1992), A new tool for investigation of the reactions of the chloroplast cytochrome *bf* complex, *Photosynth. Res.*, 34, 465-477
- Rozsa Z, Demeter S (1982), Effect of inactivation of the oxygen evolving system on the thermoluminescence of isolated chloroplasts, *Photochem. Photobiol.*, 36, 705-708
- Ruban AV, Horton P (1995), Regulation of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in plants, *Aust. J. Plant Physiol.*, 22, 221-230
- Rubin AD, Venediktov PS (1969), Storage of the light energy by photosynthesizing organisms at low temperature, *Biofizika*, 14, 105-100

Rutherford AW, Mullet JE, Crofts AR (1981), Measurement of the midpoint potential of the pheophytin acceptor of photosystem II, *FEBS Letters*, 123, 235- 237

Rutherford AW, Crofts AR, Inoue Y (1982), Thermoluminescence as a probe of photosystem II photochemistry. The origin of the flash-induced glow peaks, *Biochim. Biophys. Acta*, 682, 457-465

Rutherford AW, Govindjee, Inoue Y (1984), Charge accumulation and photochemistry in leaves studied by thermoluminescence and delayed light emission, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 1107-1111

Rutherford AW, Renger G, Koike H, Inoue Y (1985), Thermoluminescence as a probe of PSII : The redox and protonation state of the secondary acceptor quinone and the O₂ evolving enzyme, *Biochim. Biophys. Acta*, 767, 548-556

Rutherford AW, Zimmerman JL, Boussac A (1992), Oxygen evolution, In *The Photosystems : Structure, Function, and Molecular Biology, Topics in Photosynthesis*, vol II (Barber J, ed.), pp. 141-167, Cambridge University Press

Sane PV (2004), Thermoluminescence : a Technique for Probing Photosystem II, In : Carpentier R (ed.), *Photosynthesis Research Protocols*, Humana Press, Totova, New Jersey, USA, 2004, pp. 229-248

Sane PV, Rutherford AW (1986), Thermoluminescence in photosynthetic membrane, In : *Light Emission by Plants and Bacteria* (eds. Govindjee, Amesz J and Fork DC), pp. 329-360, Academic Press New York

Saphon S, Crofts AR (1977), Protolytic reactions in photosystem II. A new model for the release of protons accompanying the photooxidation of water, *Z Naturforsch*, 32c, 617-626

Schreiber U, Schliwa U, Bilger W (1986), Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorimeter, *Photosynth. Res.*, 10, 51-62

Sonoike K, Koike H, Enami I, Inoue Y (1991), The emission spectra of thermoluminescence from the photosynthetic apparatus, *Biochim. Biophys. Acta*, 1058, 121-130

Stallaert VM, Ducruet JM, Tavernier E, Blein JP (1995), Lipid peroxydation in tobacco leaves treated with the elicitor cryptogein : evaluation by high- temperature thermoluminescence emission and chlorophyll fluorescence, *Biochim. Biophys. Acta*, 1229, 290-295

- Tomek P, Ilik P, Lazar D, Stroch M, Naus J (2003), On the determination of Q_B -non-reducing photosystem II centers from chlorophyll *a* fluorescence induction, *Plant Science* 164, 665-670
- Townsend JS, Kanazawa A, Kramer DM (1997), Measurements of $S_2Q_B^-$ recombination by delayed thermoluminescence reveal heterogeneity in photosystem II energetics, *Phytochemistry*, vol 47 No 4, 641-649
- Van Gorkom HJ (1985), Electron transfer in photosystem II, *Photosynth. Res.*, 6, 97-1158
- Van Gorkom H.J, Schelvis JPM (1993), Kok's oxygen clock : what makes it tick? The structure of P680 and consequences for its oxidizing power, *Photosynth. Res.*, 38, 297-301
- Van Kooten O, Snel JFH (1990), The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology, *Photosynth. Res.*, 25, 147-150
- Vass I, Horvath G, Herczeg T, Demeter S (1981), Photosynthetic energy conversion investigated by thermoluminescence. Activation energies and half-lives of thermoluminescence bands of chloroplasts determined by mathematical resolution of glow curve, *Biochim. Biophys. Acta*, 682, 496-499
- Vass I, Y. Inoue (1992), Thermoluminescence in the study of photosystem II, In : *The Photosystems : structure, function and molecular biology* (ed. Barber J), pp. 259-294, Elsevier Science Publishers
- Vass I, Ono T, Inoue Y (1987a), Removal of 33 kDa extrinsic protein specifically stabilizes the $S_2Q_A^-$ charge pair in photosystem II, *FEBS Letters*, 211, 71-76
- Vass I, Ono T, Inoue Y (1987b), Stability and oscillation properties of thermoluminescence charge pairs in the O_2 -evolving system depleted of Cl^- or the 33 kDa extrinsic protein, *Biochim. Biophys. Acta*, 892, 224-235
- Vass I, Olapman DJ, Baber J (1989), Thermoluminescence properties of the isolated photosystem two reaction center, *Photosynth. Res.*, 22, 295-301
- Vass I, Demeter S (1982), Classification of photosystem II inhibitors by thermodynamic characterization of the thermoluminescence of inhibitor-treated chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, 682, 496-499
- Vavilin D, Matorin DN, Kafarov AS, Bautina AL (1991), High- Temperature thermoluminescence of chlorophyll in lipid peroxidation, *Biol. Membr. (Moscow)*, 8, 89-98
- Vavilin D, Ducruet JM, Matorin DN, Venediktov PS, Aubin AB (1998), Membrane lipid peroxidation, cell viability and photosystem II activity in the green algae *Chlorella*

pyredoinosa subjected to various stress conditions, *J. Photochem. Photobiol. B*, 42, 233-239

Vavilin D, Ducruet JM (1998), The origin of 115-130°C thermoluminescence bands in chlorophyll containing material, *Photochem. Photobiol.*, 68, 191-198

Venediktov PS, Matorin DN, Kafarov AS (1989), Chemiluminescence of chlorophyll upon lipid photoperoxidation in Thylakoid membranes, *Biofizika*, 34, 241-245

Walters AG, Horton P (1991), Resolution of components of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching in barley leaves, *Photosynth. Res.*, 27, 121- 133

Wydrzynski T, Inoue Y (1987), Modified photosystem II acceptor side properties upon replacement of the quinone at the Q_B site with 2,5-dimethyl-p-benzoquinone and phenyl-p-benzoquinone, *Biochim. Biophys. Acta*, 893, 33-42

ANNEXES

1. Articles à l'origine du présent projet de recherches

Publié dans Biochimica :

N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine initiates the appearance of a well-resolved I peak in the kinetics of chlorophyll fluorescence rise in isolated thylakoids

Nikolai G. Bukhov, Sridharan Govindachary, Elena A. Egorova, David Joly, Robert Carpentier 1607 (2003) 91-96

Publié dans Biophysica Acta :

Changes in polyphasic chlorophyll a fluorescence induction curve upon inhibition of donor or acceptor side of photosystem II in isolated thylakoids

Nikolai G. Bukhov, Sridharan Govindachary, Elena A. Egorova, Robert Carpentier 1657 (2004) 121-130

2. L'équation d'Arrhenius $k = A e^{-E_a/RT}$ (théorie cinétique)

Une manière simple de présenter les états de transition est de supposer qu'il existe une étape limitante de ce type : $A + B \rightleftharpoons AB^\ddagger \rightarrow \text{produits}$

AB^\ddagger est un complexe activé, et nous pouvons écrire $K^\ddagger = [AB^\ddagger] / [A][B]$.

Ce complexe se transforme en produits à un rythme qui est apparenté à la fréquence de vibration ν (ou collisions par seconde). On peut égaliser l'énergie vibrationnelle $h\nu$ à $k_B T$ où k_B est la constante de Boltzmann. Le taux de disparition du réactif A devient alors :

$$-d[A] / dt = \nu [AB^\ddagger] = (k_B T / h) [AB^\ddagger]$$

Le taux constant expérimental est défini par : $-d[A] / dt = k [A][B]$ alors,

$$k = (k_B T / h) ([AB^\ddagger] / [A][B]) = k_B T K^\ddagger / h$$

Nous pouvons relier K^\ddagger à l'énergie libre avec l'équation suivante :

$$\Delta G^\ddagger = -RT \ln(K^\ddagger) \quad \text{ou} \quad K^\ddagger = e^{-\Delta G^\ddagger / RT}$$

ainsi,

$$k = (k_B T / h) e^{-\Delta G^\ddagger / RT}$$

mais, évidemment :

$$G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$$

et alors,

$$k = (k_B T / h) e^{\Delta S^\ddagger / R} e^{-\Delta H^\ddagger / RT}$$

mais puisque,

$$E_a = \Delta H^\ddagger + RT$$

lequel nous amène à :

$$k = (e k_B T / h) e^{\Delta S^\ddagger / R} e^{-E_a / RT} \quad \text{(théorie thermodynamique)}$$

qui est semblable l'équation d'Arrhenius mais qu'on appelle l'équation d'Eyring. Et c'est cette équation théorique qui a été utilisée par le logiciel ThermoLITE pour décomposer les courbes de thermoluminescence obtenues dans le cadre du projet de recherche amenant à la rédaction de l'article et de cette thèse de maîtrise.

3. Description des bandes de TL

Name	T_m standard (°C)	T_m shift	Origin	Comments
A	-15 °C		$Z^+Q_B^- (S_3Q_A^-)$	Damage to Mn oxygen-evolving complex
Q	+5 °C		$S_2Q_A^-$	Damage to secondary Qb quinonic acceptor (induced by diuron or atrazine-like herbicides)
B	+35 °C	+28 °C +22 °C	$S_2Q_B^-$ $S_3Q_B^-$	Typically observed after one flash Typically observed after three flashes
AG	+45 °C	+35 °C	$S_2/S_3Q_B^+e^-$	Typically induced by 720 nm light (sometimes by flashes)
C	+55 °C		$D^+Q_A^-$	Appears when Q_B is blocked by diuron or damaged (D is the non-functional donor to PSII, Z is the functional one)

4. Simulation de l'avancement des états S_n

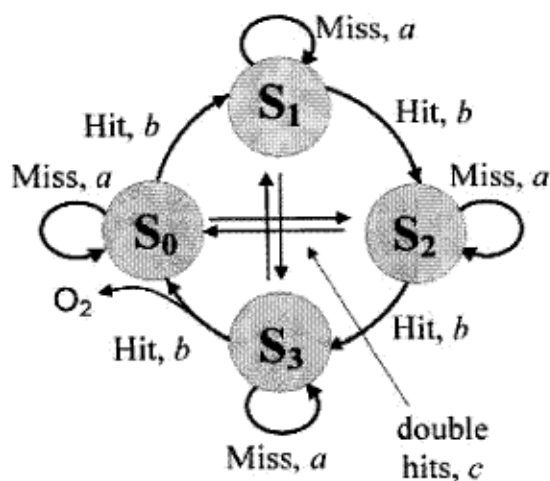
En utilisant les paramètres suivants :

α = raté (miss)

β = touché une fois (single hit)

γ = doublement touché (double hit)

il est possible de simuler l'avancement des états S_n à partir d'une distribution (population) initiale à chaque éclair saturant frappant le PSII.

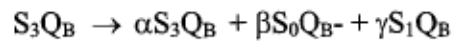
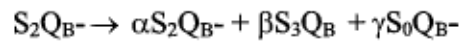
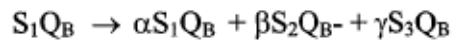
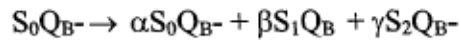


Le total des états S_n initiaux correspond à 100% ($S_0 + S_1 + S_2 + S_3 = 100\%$ côté donneur). C'est la même chose pour la quinone qui est liée au site Q_B , soit Q_B ou Q_B^- ($Q_B + Q_B^- = 100\%$ côté accepteur).

En faisant varier les états S_n initiaux et le ratio $Q_B^-:Q_B$, on estime l'avancement des états S_n en donnant un éclair saturant à plusieurs reprises. Ainsi, nous avons une nouvelle population des états S_n et un nouveau ratio $Q_B^-:Q_B$ à chaque éclair.

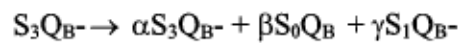
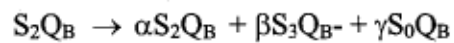
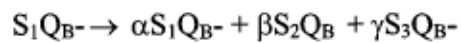
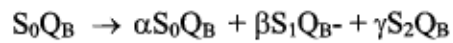
Cycle V

1 éclair

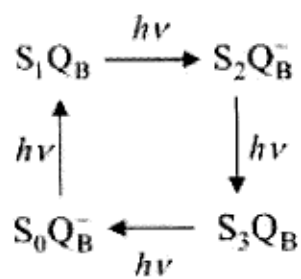


Cycle W

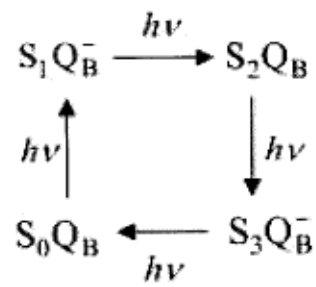
1 éclair



$$S_0Q_B + S_0Q_{B^-} + S_1Q_B + S_1Q_{B^-} + S_2Q_B + S_2Q_{B^-} + S_3Q_B + S_3Q_{B^-} = 100\% \text{ des RCs}$$



V-cycle



W-cycle

5. Probabilité de transfert d'exciton entre centres réactionnels

Si un photon absorbé peut être transféré à plus d'un centre réactionnel, la relation entre la fluorescence variable F_V et $[Q_A^-]$ n'est pas linéaire. Un facteur de correction peut être établi à partir de la probabilité, P , de transfert à un autre centre réactionnel. P a une valeur d'environ 0,55 pour les plantes supérieures.

$$[Q_A^-] = \frac{F_V / F_{\max}}{(1 - P) + (P \cdot (F_V / F_{\max}))}$$

La fluorescence variable F_V est donnée par $F_V = (F_t - F_o) / F_o$, où le F_t est la fluorescence mesurée, et F_o est la fluorescence quand tous les centres réactionnels sont ouverts. F_{\max} est la fluorescence quand tous centres réactionnels sont fermés.

6. Équations développées dans le cadre du projet ThermoLITE

$$-\frac{dn}{dt} = s n_a T \exp\left\{\frac{-E_A}{k_B T}\right\} \text{ alors } I_{TL} = s n_a \exp\left\{\frac{-E_A}{k_B T}\right\} \Delta t \text{ avec } s = \frac{e k_B T}{h} \exp\left\{\frac{\Delta S}{h}\right\}$$

$$-\frac{dn}{dT} = \frac{s}{\beta} n_a T \exp\left\{\frac{-E_A}{k_B T}\right\} \text{ alors } I_{TL} = \frac{s}{\beta} n_a T \exp\left\{\frac{-E_A}{k_B T}\right\} \Delta T$$

$$\beta = \frac{dT}{dt}$$

$$s = \frac{e k_B T}{h} \exp\left\{\frac{\Delta S}{h}\right\} \text{ mais pour nous } s = \frac{e k_B}{h} \exp\left\{\frac{\Delta S}{h}\right\}$$

$$I_{TL} = \frac{n_a}{T_p} \left(\frac{E_A}{k_B T_p} + 1\right) \Delta T \text{ ou } I_{TL} = \frac{n_a}{T_p} \left(\frac{E_A}{k_B T_p} + 1\right) \beta \Delta t$$

En modifiant cette expression, on obtient :

$$E_A = T_p k_B \left(\frac{T_p I_{TP}}{n_a \Delta T} - 1\right) \text{ ou } E_A = T_p k_B \left(\frac{T_p I_{TP}}{n_a \beta \Delta t} - 1\right)$$

$$n_a \approx 0.39 n_0$$

$$\frac{n_a}{T_p} \left(\frac{E_A}{k_B T_p} + 1\right) \Delta T = \frac{s}{\beta} n_a T \exp\left\{\frac{-E_A}{k_B T}\right\} \Delta T \text{ alors,}$$

$$\frac{\beta}{s T_p^2} \left(\frac{E_A}{k_B T_p} + 1\right) = \exp\left\{\frac{-E_A}{k_B T}\right\} \text{ alors } \frac{E_A}{k_B} = -T_p \ln \left[\frac{\beta}{s T_p^2} \left(\frac{E_A}{k_B T_p} + 1\right) \right] \approx -T_p \ln \left[\frac{\beta}{s T_p^3} \frac{E_A}{k_B} \right]$$

La température du signal à ½ de l'intensité maximale correspond à la température suivante :

$$T_{1/2} = \frac{T_p}{1 - T_p \frac{E_A}{k_B}} \text{ où } T_p \text{ est la température du maximum.}$$

8. Saisies d'écran du logiciel ThermoLITE

