

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
DAVID JOLY**

**EFFETS DES PLASTOQUINONES
SUR LA DISSIPATION D'ÉNERGIE DES PHOTOSYSTÈMES**

AVRIL 2007

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

J'aimerais remercier l'ensemble des professeurs qui ont contribué à ma formation et à faire de moi un meilleur étudiant-chercheur, en particulièrement mon directeur de recherche, le professeur Robert Carpentier, pour son soutien, ses conseils et sa confiance.

Aussi, ces très nombreuses journées passées au laboratoire auraient été loin d'être autant agréables sans la présence, les sourires et l'amitié de nombreuses personnes, plus particulièrement de Johanne, Alain, Steve et Nancy, Rémy, Sri, Raja, Karine, Geneviève, Caroline, Manon, Vicky, ... sans oublier ma famille... mais en énumérer les prénoms serait trop long !

Je voudrais également prendre quelques lignes pour célébrer l'élégance, la beauté, l'harmonie de la nature et du spectacle de la vie, dont nous sommes quotidiennement les témoins. Tout cela est pour moi source d'inspiration, d'émerveillement, de quiétude, de questionnements, de surprises, de curiosités et de fascination qui sont à la base de mon intérêt pour la science et d'une quête continue pour une compréhension un peu meilleure du monde qui nous entoure.

AVANT-PROPOS

Ce mémoire comporte trois articles scientifiques. L'ensemble des travaux présentés ont été effectués sous la supervision de mon directeur de recherche, le Professeur Robert Carpentier. Dans le cadre de l'article intitulé « Kinetic analyses of the OJIP chlorophyll fluorescence rise in thylakoid membranes » (Chapitre III), Caroline Bigras a contribué à faire une partie des expériences présentées, Johanne Harnois a fait certaines extractions du matériel biologique utilisé, tandis que Sridharan Govindachary a participé à 50% de la rédaction de l'article. Pour ma part, j'ai effectué la majorité des mesures présentées et participé à la rédaction de l'article à 50%.

Pour les deux autres articles (Chapitres IV et V), j'ai effectué la totalité des expériences de ces projets et rédigé également la totalité des deux articles sous la supervision du Professeur Robert Carpentier.

RÉSUMÉ

Les plastoquinones (PQ) jouent le rôle d'intermédiaires dans le transport photosynthétique linéaire d'électrons en acceptant les électrons du photosystème II (PSII), puis en les léguant au cytochrome b_6f (cyt b_6f) où ils pourront ensuite être transportés vers le photosystème I (PSI). Les PQ sont aussi connues comme étant des atténuateurs efficaces de la fluorescence des chlorophylles (Chl) et comme éléments importants dans l'activation de nombreux mécanismes de contrôle de la dissipation d'énergie du PSII. Cependant, l'importance des PQ sur la cinétique de fluorescence des PSII sous éclairage intense, appelée induction de fluorescence (IF), fait encore l'objet de débats. Quant au PSI, la régulation de sa dissipation d'énergie est rarement discutée dans la littérature.

Ce projet de recherche a donc été réalisé dans le but d'éclaircir le rôle des plastoquinones dans l'induction de fluorescence des PSII et dans la dissipation d'énergie du PSI.

Afin d'atteindre ces objectifs, l'IF de membranes de thylakoïdes a été mesurée dans une variété de conditions où les cinétiques de réduction du pool de PQ par le PSII et d'oxydation par le cyt b_6f ont été affectées. Pour vérifier les effets des PQ sur le PSI, le spectre de fluorescence de fractions membranaires enrichies en PSI, leurs cinétiques de photooxydation du P700 et la dissipation thermique des PSI ont été mesurés en présence de PQ oxydées ajoutées.

L'ajout d'accepteurs d'électrons du PSII au site Q_B pour diminuer la vitesse de réduction du pool de PQ, tels le *N,N,N',N'*-tetraméthyl-*p*-phénylènediamine (TMPD) et des benzoquinones substituées de chlore (Cl-BQ), a eu comme principal effet de causer un retard important la phase I-P de l'IF. Par contre, l'ajout de molécules oxydant le pool de PQ, telles certaines benzoquinones substituées de méthyles (CH_3 -BQ), ou d'accepteurs d'électrons du PSI pour stimuler l'oxydation du pool de PQ a fortement

diminué l'amplitude de la phase I-P. Ces résultats montrent que c'est bel et bien la cinétique d'oxydation/réduction du pool de PQ qui contrôle la phase I-P de l'IF.

L'ajout de PQ oxydées a fortement atténué le spectre de fluorescence de membranes enrichies en PSI, en plus de retarder la photooxydation du P700 mesurée dans des conditions où l'intensité lumineuse est limitante. La mesure du dégagement de chaleur par spectroscopie photoacoustique a permis de voir que les PQ oxydées ont augmenté la dissipation thermique et diminué la capacité photochimique du PSI. Ces PQ agiraient comme atténuateurs efficaces des états excités des Chl des antennes du PSI. La réduction du pool endogène de PQ de membranes entières de thylakoïdes a finalement causé une importante augmentation de fluorescence du PSII et du PSI, suggérant ainsi que les PQ influencent la dissipation d'énergie des deux photosystèmes. Les résultats montrent donc que l'état rédox du pool de PQ peut réguler la dissipation d'énergie du PSI.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
AVANT-PROPOS	iii
RÉSUMÉ.....	iv
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES TABLEAUX.....	xiv
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xv
CHAPITRE I INTRODUCTION	1
1.1 Entre ciel et terre, le végétal.....	1
1.2 La photosynthèse : définition et bilan	1
1.3 Photosynthèse : Phase sombre vs phase lumineuse	2
1.4 Chloroplastes	3
1.5 Appareillage photosynthétique de la phase lumineuse	3
1.5.1 Pigments et antennes.....	4
1.5.2 Structure et fonction du Photosystème II.....	5
1.5.3 Structure et fonction du Photosystème I	7
1.5.4 Structure et fonction du Cytochrome b ₆ f	8
1.5.5 Schéma en Z du transport d'électron	10
1.5.6 Transport cyclique d'électrons autour du PSI.....	10
1.5.7 Absorption et dissipation d'énergie	12
1.5.8 Transfert d'excitation.....	13
1.6 Mécanismes de contrôle de dissipation d'énergie du PSII.....	14
1.6.1 Principaux mécanismes de quenching non-photochimique	15
1.6.2 Quenching des excitations du PSII par les PQ.....	16
1.6.3 Mécanismes de contrôle de dissipation d'énergie du PSI.....	16
1.7 Problématique et objectifs du projet.....	17
CHAPITRE II ÉLÉMENTS THÉORIQUES DE SPECTROSCOPIE.....	19
2.1 Généralités sur la spectroscopie de fluorescence	19

2.1.1	Introduction.....	19
2.1.2	Fluorescence des chlorophylles.....	19
2.1.3	Fluorescence des membranes photosynthétiques.....	21
2.1.4	Cinétique d'induction de la fluorescence chlorophyllienne.....	21
2.2	Généralités sur le quenching de fluorescence	23
2.2.1	Introduction.....	23
2.2.2	Équation de Stern-Volmer.....	23
2.2.3	Équation de Stern-Volmer modifiée	24
2.3	Généralités sur le changement d'absorption à 800-850 nm	25
2.4	Généralité sur la spectroscopie photoacoustique	26
2.4.1	Introduction.....	26
2.4.2	Stockage d'énergie.....	27
2.4.3	Analogie avec les cinétiques enzymatiques	28
CHAPITRE III MÉTHODES EXPÉRIMENTALES.....		31
3.1	Matériel végétal utilisé.....	31
3.2	Isolation des membranes de thylakoïdes de pois	31
3.3	Isolation des membranes enrichies en PSI (lamelles du stroma)	31
3.4	Mesures d'induction de fluorescence.....	32
3.5	Analyse des courbes d'induction de fluorescence.....	32
3.6	Mesures des spectres de fluorescence	33
3.7	Mesures des changements d'absorption à 830 nm	33
3.8	Mesures de spectroscopie photoacoustique.....	34
3.9	Mesures effectuées en conditions anaérobiques.....	34
CHAPITRE IV KINETIC ANALYSES OF THE OJIP CHLOROPHYLL		
FLUORESCENCE RISE IN THYLAKOID MEMBRANES		35
4.1	Résumé.....	36
4.2	Abstract	38
4.3	Introduction	38
4.4	Materials and methods	40

4.4.1 Isolation of thylakoids and Chl <i>a</i> fluorescence induction measurements.....	40
4.5 Results and discussion.....	41
4.6 Acknowledgments.....	44
4.7 References	44
4.8 Figure legends	46
CHAPITRE V THE OXIDATION/REDUCTION KINETICS OF THE PLASTOQUINONE POOL CONTROLS THE APPEARANCE OF THE I-PEAK IN THE O-J-I-P CHLOROPHYLL FLUORESCENCE RISE: EFFECTS OF VARIOUS ELECTRON ACCEPTORS.....	49
5.1 Résumé.....	50
5.2 Abstract	52
5.3 Introduction	52
5.4 Materials and methods	54
5.4.1 Isolation of thylakoids and Chl <i>a</i> fluorescence induction measurements.....	54
5.4.2 Data analysis	55
5.5 Results	55
5.6 Discussion	58
5.7 Acknowledgments.....	62
5.8 References	62
5.9 Figure legends	69
CHAPITRE VI REGULATION OF ENERGY DISSIPATION IN PHOTOSYSTEM I BY THE REDOX STATE OF THE PLASTOQUINONE POOL.....	77
6.1 Résumé.....	78
6.2 Abstract	80
6.3 Introduction	80
6.4 Materials and Methods.....	82

6.4.1 Isolation of photosynthetic materials and sample preparation.....	82
6.4.2 Fluorescence measurements.....	83
6.4.3 Absorbance changes at 830 nm (ΔA_{830}).....	83
6.4.4 Photoacoustic spectroscopy	84
6.5 Results	84
6.6 Discussion	89
6.7 Acknowledgments	93
6.8 References	93
6.9 Figure Legends.....	101
CHAPITRE VII DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS	109
7.1 Oxydation/réduction du pool de PQ et induction de fluorescence des PSII.....	109
7.2 Dissipation d'énergie du PSI en lien avec l'état rédox du pool de PQ ...	114
7.3 Perspectives de recherche.....	120
BIBLIOGRAPHIE.....	123

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1: Modèle (A) et photo en microscopie électronique (B) de la structure des chloroplastes. G, Granum; T, membrane des thylakoïdes; S, Stroma. Adapté de Horton <i>et al.</i> (11).....	4
Figure 1.2: Modèle de la structure des thylakoïdes et de la distribution des principales protéines dans ceux-ci. (a) Vue latérale d'un grana et d'une lamelle du stroma. (b) Secteur du disque du grana, vue du dessus. (c) Nombres approximés de PSI, PSII, et Cytochrome b_6f dans le grana, la marge du grana, et la lamelle du stroma. Tiré de Albertsson (9).	5
Figure 1.3 : Modèle de la structure tridimensionnelle du squelette protéique d'un monomère de LHCII et de ses pigments à partir des données de cristallographie à rayons X obtenus par Liu <i>et al.</i> (17). Sphères vertes, atome de Mg des Chl; rouge, lutéine; orange, xanthophylles. Le fichier de structure PDB utilisé est 1RWT.	6
Figure 1.4: Représentation schématique de la structure du PSII et de ses principaux cofacteurs.	7
Figure 1.5 : Représentation schématique de la structure du PSI et de ses principaux cofacteurs.	9
Figure 1.6: Modèle de structure tridimensionnelle du Cyt b_6f et des voies de transferts d'électrons et de protons entre ses cofacteurs rédox. Adapté de Kurisu <i>et al.</i> (29)	9
Figure 1.7: Schéma en Z de la chaîne de transport d'électrons dans les thylakoïdes.	11
Figure 1.8: Diagramme de Jablonski simplifié de l'absorption d'énergie et des principales voies de dissipation en photosynthèse.	13
Figure 2.1 : Spectres d'absorption (gauche) et de fluorescence (droite) de la Chl <i>a</i> dans le diéthyl éther. Adapté de Blankenship (5)	20
Figure 2.2: Courbe typique d'induction de fluorescence dans les feuilles	22

- Figure 4.1 : Original traces of Chl fluorescence: (A) in intact leaves (1) and in thylakoids without additive (2) or in the presence of 20 μ M (3) or 100 μ M (4) of TMPD, respectively, and (B) in thylakoids without additive (1) or in the presence of 1mM ascorbate (2), 100 μ M TMPD (3), or 100 μ M TMPD reduced by 1 mM ascorbate (4), respectively.47
- Figure 4.2 : Original traces of Chl fluorescence: (A) in thylakoids without additive (1) or in the presence of 0.2 μ M DBMIB (2), 100 μ M TMPD (3), or 0.2 μ M DBMIB and 100 μ M TMPD (4), respectively, and (B) in thylakoids without additive (1) or in the presence of 150 μ M MV (2), 150 μ M MV and 0.2 μ M DBMIB (3), 150 μ M MV and 100 μ M TMPD (4), and 150 μ M MV, 100 μ M TMPD, and 0.2 μ M DBMIB (5), respectively.....48
- Figure 5.1: Original traces of Chl *a* fluorescence rise of isolated thylakoids (A) without additive (1) or in the presence of 2.5 μ M (2), 25 μ M (3), 50 μ M (4), or 100 μ M (5) of TMPD and quantitative analysis of the effects of TMPD on the amplitudes (B) and relative half-times (C) of O-J (circles), J-I (triangles), and I-P phases (squares). Half-times of TMPD-treated thylakoids are relative to half-times of untreated thylakoids. Amplitudes and half-times are means $\pm$ S.D. (n=5)71
- Figure 5.2: Original traces of Chl *a* fluorescence rise obtained without additive (1) or in the presence of 1 mM Asc (2), 100 μ M TMPD (3), or 100 μ M TMPD and 1 mM Asc (4).72
- Figure 5.3: Amplitudes and half-times of O-J, J-I, and I-P phases measured with various concentrations of TMPD without (light gray bars) or with 1 mM Asc (dark gray bars). Results are means $\pm$ S.D. (n=5)73
- Figure 5.4: Original traces of Chl *a* fluorescence rise obtained without additive (1) or in the presence of 40 μ M SiMo (2), 10 μ M DCBQ (3), 10 μ M phe-BQ (4), or 1 μ M DQ (5).74
- Figure 5.5: Amplitudes and half-times of O-J, J-I, and I-P measured without additive (Ctrl) or in the presence of 40 μ M SiMo, 10 μ M DCBQ, 10

μM phe-BQ, or $1\ \mu\text{M}$ DQ, respectively. Results are means $\pm$ S.D. ($n=3$).....	75
Figure 5.6: Original traces of Chl a fluorescence rise obtained without additive (1) or in the presence of $500\ \mu\text{M}$ NADP^+ and $1\ \mu\text{M}$ Fd (2), $500\ \mu\text{M}$ NADP^+ and $2\ \mu\text{M}$ Fd (3), or $2\ \text{mM}$ NADP^+ and $4\ \mu\text{M}$ Fd (4).....	76
Figure 6.1: Chemical structures of dPQ and PQ-n. Endogenous type of PQ corresponds to PQ-9.	103
Figure 6.2: Fluorescence emission spectra measured in isolated PSI submembrane fractions at room temperature with the addition of dPQ (A) or PQ-2 (B) at a concentration of 0 (1), 0.2 (2), 0.7 (3), 1.5 (4), 5 (5) and $15\ \mu\text{M}$ (6). (C) Modified Stern-Volmer plots of Chl fluorescence quenching by dPQ (circles) or PQ-2 (triangles). Chl fluorescence was integrated from 640 to 800 nm using the emission spectra. For other details, see Materials and Methods.	104
Figure 6.3: Original traces of light-induced increase in absorbance at 830 nm measured in isolated PSI submembrane fractions (A) with the addition of 0 (1), 15 (2), 30 (3), and $300\ \mu\text{M}$ (4) of dPQ or (B) with the addition of $30\ \mu\text{M}$ of different types of PQ molecules. The upward arrow indicates actinic light turned on. Insert: Dependency of the photooxidation rate constant (k) on the concentration of added dPQ. Traces of light-induced increase in ΔA_{830} were fitted with first-order kinetics and calculated values of k were normalized with the rate found for the control ($k_0 = 0.009\ \text{ms}^{-1}$).	105
Figure 6.4: Dependency of the energy storage yield (A) and the reciprocal of the energy storage yield (B) on the modulated light intensity for PSI submembrane fractions in the absence (open circles) or in the presence of $150\ \mu\text{M}$ of dPQ_{ex}. Insert: Photoacoustic signal from PSI submembrane fractions aspired on a nitrocellulose filter. Upward triangle indicates modulated light on. Upward and downward arrows indicate strong white light on and off, respectively.	106

Figure 7.1 : Schéma simplifié du transport linéaire d'électrons dans une membrane de thylakoïdes (flèches noires) avec les inhibitions (flèches rouges) et activations (flèches bleues) par les molécules utilisées dans les travaux présentés. A : Accepteurs d'électrons du PSII compétitionnant avec PQ pour le site Q_B (TMPD, SiMo, MCBQ, DCBQ, phe-BQ); B : Accepteurs d'électrons à partir du pool de PQ (*p*-BQ, MBQ, DQ); C : blocage de la réoxydation des PQH_2 au Cyt b_6f par la compétition pour le site Q_0 (DBMIB); D : accepteurs « naturels » d'électrons du PSI (Fd, NADPH); E : accepteur artificiel d'électron du PSI (MV). A retarde la réduction du pool de PQ et la phase I-P; B, D, et E stimulent la réoxydation du pool de PQ et diminuent l'amplitude de I-P; C inhibe l'effet de D et E. 114

LISTE DES TABLEAUX

Table 5.1: Quantitative analysis of FI in pea thylakoids.....	70
---	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A_0	Accepteur primaire d'électrons du photosystème I
A_1	Accepteur secondaire d'électrons du photosystème I
BQ	Benzoquinone
CÉO	Complexe d'évolution d'oxygène
CH ₃ -BQ	Benzoquinone substituée avec des méthyles
Chl	Chlorophylle
Cl-BQ	Benzoquinone substituée avec du chlore
CR	Centre réactionnel
Cyt b ₆ f	Cytochrome b ₆ f
ΔA_λ	Changement d'absorption à une longueur d'onde λ
ΔpH	Gradient de protons transmembranaire
DBMIB	Dibromothymoquinone
DCBQ	2,5-dichloro- <i>p</i> -benzoquinone
DCMU	(ou diuron) 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée
dPQ	Décyl-plastoquinone
DQ	Duroquinone
ϕ_l	Rendement du stockage d'énergie
ϕ_m	Rendement maximal de stockage d'énergie
F_o	(ou O) Niveau minimal (initial) de fluorescence
f_a	Fraction de fluorescence accessible à l'atténuateur
F_A	Complexe Fer-Soufre accepteur secondaire du photosystème I
F_B	Complexe Fer-Soufre accepteur tertiaire du photosystème I
F_m	(ou P) Niveau maximal de fluorescence
F_x	Complexe Fer-Soufre accepteur primaire du photosystème I
Fd	Ferrédoxine
FNR	Ferrédoxine-NADP ⁺ réductase
FQR	Ferrédoxine-quinone réductase
FRET	« Fluorescence resonance energy transfer »
i_{50}	Intensité lumineuse de demie-saturation du stockage d'énergie

IF	Induction de fluorescence
K_{SV}	Constante de Stern-Volmer
LHC	Antenne photocollectrice de lumière
MBQ	Méthyl-benzoquinone
MCBQ	Monochloro-benzoquinone
MV	Méthyl viologène
NPQ	Quenching non-photochimique
P680	Donneur primaire d'électrons du photosystème II
P700	Donneur primaire d'électrons du photosystème I
PA	Photoacoustique
<i>p</i> BQ	<i>p</i> -benzoquinone
PC	Plastocyanine
phe-BQ	phenyl- <i>p</i> -benzoquinone
PQ	Plastoquinone
PQ _{ex}	Plastoquinone exogène
PQH ₂	Plastoquinone réduite (plastoquinol)
PSI	Photosystème I
PSII	Photosystème II
Q ₀	Site d'oxydation des plastoquinones au cytochrome b ₆ f
Q _A	Quinone acceptrice primaire du photosystème II
Q _B	Quinone acceptrice secondaire du photosystème II
Q _R	Site de réduction des plastoquinones au cytochrome b ₆ f
qE	Quenching de haute énergie
qI	Quenching de photoinhibition
qT	Quenching dû à la transition d'états
ROS	Espèces réactives d'oxygène
SiMo	Silicomolybdate
TCE	Transport cyclique d'électrons
TMPD	<i>N,N,N',N'</i> -tetraméthyl- <i>p</i> -phénylènediamine
Y _Z	(ou Tyr _Z) Donneur d'électron principal du P680

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Entre ciel et terre, le végétal

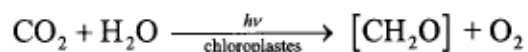
Depuis qu'ils existent, les humains, curieux de nature, se posent mille et une questions en regardant leur environnement, tout autour d'eux. Les interrogations les plus profondes ont probablement souvent été à propos de l'origine de la vie à partir de matière inanimée, en regardant le sol, inerte, ou encore à propos de ce qu'il y a au-dessus de nos têtes, où l'on est, en observant les lumières scintillantes de la nuit et l'astre nous réchauffant durant le jour. Il s'agit de questions entourant l'infiniment petit et l'infiniment grand, qui ont toujours taquiné l'esprit humain. Pourtant, il ne suffit bien souvent que de regarder à l'horizon pour voir un des plus importants liens entre ces deux énigmes, entre ces deux mondes : les végétaux.

Les végétaux sont des organismes photosynthétiques généralement autotrophes qui ont des caractéristiques bien spéciales : ils se servent du soleil comme source d'énergie pour synthétiser les molécules organiques nécessaires à leur vie à partir des minéraux et de la matière inorganique de leur environnement. Ces molécules organiques ainsi produites servent souvent de nutriments de base aux autres vivants qui doivent s'en nourrir pour survivre. C'est pour cette raison que les végétaux sont une base essentielle de la chaîne alimentaire de nombreux écosystèmes de la planète. C'est donc le monde végétal qui, en assemblant la matière inerte à l'aide de l'énergie du rayonnement quasi-illimité d'un astre lointain, fait un des liens entre l'infiniment grand et l'infiniment petit, avec comme résultat la vie telle qu'on la connaît.

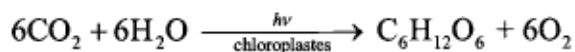
1.2 La photosynthèse : définition et bilan

La photosynthèse consiste essentiellement à la conversion d'énergie solaire en énergie chimique. Plusieurs organismes peuvent effectuer ce type de réactions, dont les algues (1) ainsi que certaines bactéries (2) et cyanobactéries (3). Nous nous attarderons cependant aux végétaux (4).

Le bilan principal de la photosynthèse, tel que découvert par Hill, consiste en une réaction d'oxydoréduction impliquant la réduction du CO_2 et l'oxydation de molécules d'eau, tel que décrit par l'équation suivante (5) :



où $[\text{CH}_2\text{O}]$ représente un hydrate de carbone. Un exemple typique d'hydrate de carbone est le glucose, ce qui donnerait l'équation balancée suivante :



Le glucose est généralement stocké sous forme de polymère (en amidon) dans la plante et sert de réserve énergétique (6). La photosynthèse constitue donc globalement une réaction de conversion de l'énergie solaire en énergie chimique.

1.3 Photosynthèse : Phase sombre vs phase lumineuse

Alors qu'une partie des réactions impliquées dans la photosynthèse dépend directement de la lumière, une autre partie peut se produire dans l'obscurité. On sépare donc les réactions de la photosynthèse en deux groupes : la phase lumineuse et la phase sombre.

La phase lumineuse consiste principalement en l'absorption de la lumière générant un transport d'électron et la production de NADPH et d'ATP. Le dégagement d'oxygène par les plantes lors de la photosynthèse se produit également durant cette phase.

La phase sombre, quant à elle, inclue principalement la fixation du CO_2 par un enzyme appelé Rubisco (ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase). Il s'agit d'ailleurs de la protéine la plus abondante de la planète (7)... probablement aussi parce qu'il s'agit

d'une des enzymes les plus lentes (8) ! La production des hydrates de carbone par le cycle de Calvin fait aussi partie de la phase sombre.

L'ensemble de ces réactions se produisent, pour les végétaux, dans un organelle appelée chloroplaste, similaire aux mitochondries.

1.4 Chloroplastes

Les chloroplastes sont des organelles composés d'une double-membrane lipidique qui servent de siège de la photosynthèse. La membrane interne des chloroplastes forme des invaginations, des repliements et empilements (Figure 1.1). Cette membrane interne repliée est ce qu'on appelle la membrane des thylakoïdes. Les thylakoïdes contiennent l'ensemble des enzymes servant à la phase lumineuse de la photosynthèse. Le milieu aqueux des chloroplastes dans lequel baignent les thylakoïdes est appelé stroma, tandis que le milieu aqueux à l'intérieur des repliements et empilements est le lumen. À certains endroits à l'intérieur des chloroplastes, les thylakoïdes forment des empilements appelés grana, tandis que les bouts de membranes formant des lamelles entre les granas forment les lamelles du stroma.

C'est dans le stroma que se retrouvent les enzymes servant à la phase sombre de la photosynthèse. Comme la présente étude traite plutôt d'événements se produisant dans la phase lumineuse, attardons-nous plus particulièrement à ce qui se passe dans les thylakoïdes.

1.5 Appareillage photosynthétique de la phase lumineuse

Durant la phase lumineuse de la photosynthèse, la lumière absorbée engendre un transport d'électrons entre les différents enzymes situées dans les thylakoïdes. Les principaux complexes enzymatiques en question sont : les photosystèmes (PS) I et II, le cytochrome b_6f (cyt b_6f) et l'ATP synthase. Leur distribution dans la membrane est hétérogène (Figure 1.2) : alors que les PSII se retrouvent principalement dans le grana, les PSI sont majoritairement dans les marges du grana et dans les lamelles du stroma (9).

Le cyt b_6f et l'ATP synthase sont, quant à eux, distribués d'une façon beaucoup plus uniforme dans les thylakoïdes.

Tout comme pour le transport d'électrons dans la mitochondrie, le transport photosynthétique d'électrons est couplé à un transport vectoriel de protons, du stroma vers le lumen. Ce gradient de protons (ΔpH) est utilisé par l'ATP synthase pour produire l'ATP nécessaire à la fixation du carbone dans le cycle de Calvin (10). Voyons maintenant plus en détail les structures et fonctions des principaux enzymes intervenant dans la phase lumineuse.

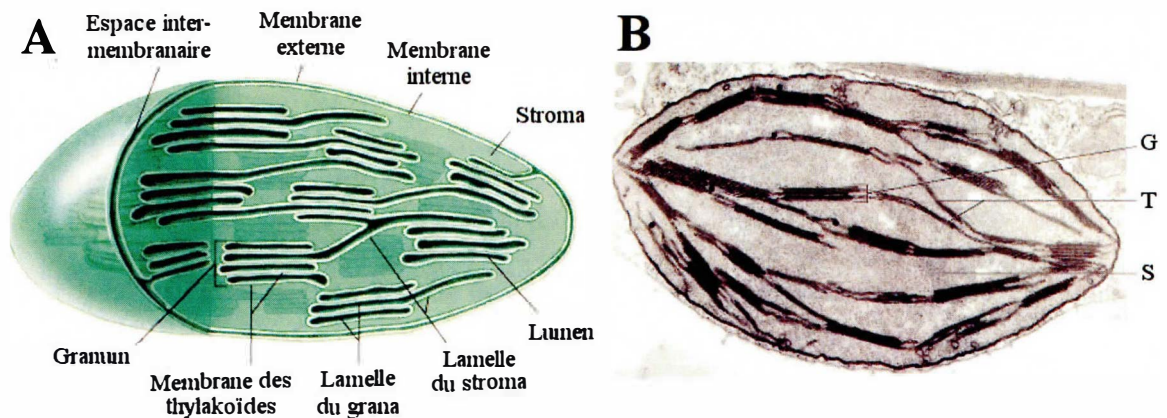


Figure 1.1: Modèle (A) et photo en microscopie électronique (B) de la structure des chloroplastes. G, Granum; T, membrane des thylakoïdes; S, Stroma. Adapté de Horton *et al.* (11).

1.5.1 Pigments et antennes

Les complexes protéiques responsables de la captation de la lumière sont appelés des antennes photocollectrices de lumière (LHC; Light Harvesting Complex) (12). Les LHC sont attachés aux PSI et PSII, auxquels ils acheminent l'énergie lumineuse absorbée pour engendrer le transport d'électrons. L'absorption de la lumière dans les LHC se fait par de nombreux pigments, mais principalement par des chlorophylles (Chl) *a* et *b* et quelques caroténoïdes.

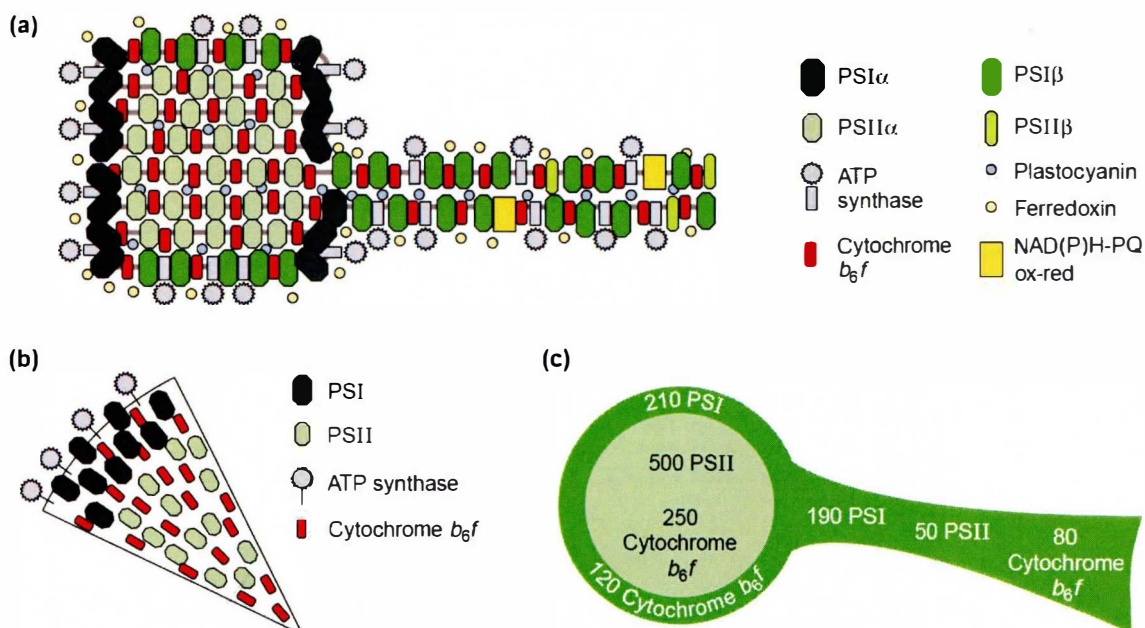


Figure 1.2: Modèle de la structure des thylakoïdes et de la distribution des principales protéines dans ceux-ci. (a) Vue latérale d'un grana et d'une lamelle du stroma. (b) Secteur du disque du grana, vue du dessus. (c) Nombres approximatifs de PSI, PSII, et Cytochrome b_6f dans le grana, la marge du grana, et la lamelle du stroma. Tiré de Albertsson (9).

Les antennes les plus abondantes sont les LHCII. Ces complexes pigments/protéines se retrouvent généralement en périphérie du PSII sous forme de trimère et lient environ la moitié des chlorophylles présentes dans les thylakoïdes (13). Chaque monomère de LHCII lie de 13 à 15 Chl a et b au total, ainsi que 3 à 4 caroténoïdes. Le polypeptide de 232 acides aminés qui le compose contient principalement 3 hélices alpha transmembranaires (Figure 1.3).

1.5.2 Structure et fonction du Photosystème II

Le PSII est un complexe protéique d'une masse imposante de 320 kDa pour un monomère. Il est composé de plus de 16 à 17 sous-unités transmembranaires, 3 sous-unités hydrophiles et près de 80 cofacteurs (14-16), dont les Chl, caroténoïdes, des plastoquinones (PQ), des atomes de manganèse (Mn) et de fer (Fe). Un aperçu de la disposition des sous-unités et des principaux cofacteurs redox est donné à la Figure 1.4.

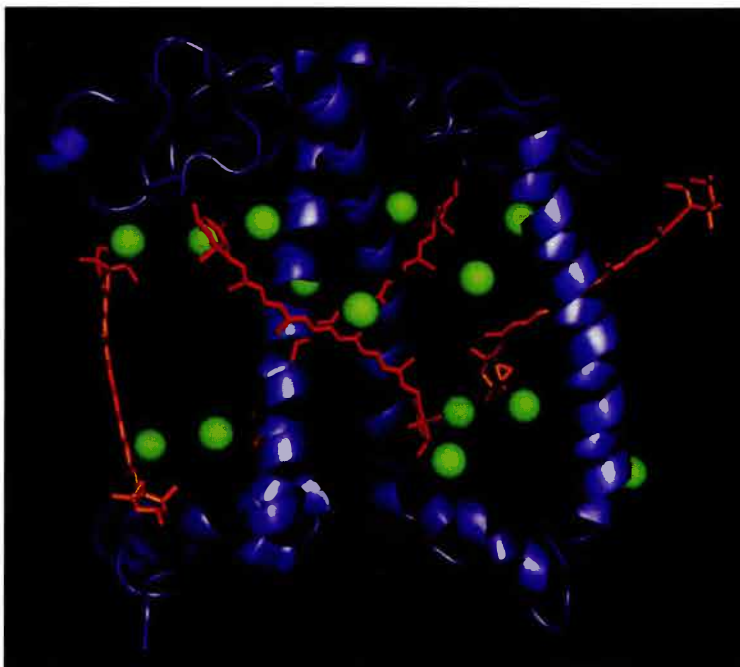


Figure 1.3 : Modèle de la structure tridimensionnelle du squelette protéique d'un monomère de LHCII et de ses pigments à partir des données de cristallographie à rayons X obtenus par Liu *et al.* (13). Sphères vertes, atome de Mg des Chl; rouge, lutéine; orange, xanthophylles. Le fichier de structure PDB utilisé est 1RWT.

Le PSII contient une paire spéciale de chlorophylles qui, lorsqu'elle recevra une excitation lumineuse en provenance des antennes, perdra son électron excité (17). Cette paire de chlorophylles, appelé P680 à cause de son pic d'absorption à 680 nm, est donc photooxydable. L'électron perdu transite par une molécule de phéophytine située sur la sous-unité D1 avant d'aller réduire une molécule de PQ fixe sur D1, appelée Q_A . L'électron pourra ensuite passer de Q_A à une seconde PQ située dans un site de liaison sur D2 appelé Q_B (18). Ces intermédiaires forment ce que l'on appelle le côté accepteur du PSII.

Pour que le PSII soit de nouveau fonctionnel, le P680 oxydé ($P680^+$) devra regagner un électron. C'est la tyrosine 161 de la sous-unité D1, appelé Tyr_Z ou Y_Z, qui se chargera de cette tâche. Y_Z sera réduit à son tour par un complexe de 4 atomes de Mn, qui puise ses électrons à même les molécules d'eau du lumen (19). La réaction d'oxydation de l'eau provoque le largage de protons (H^+) dans le lumen et la formation d'oxygène moléculaire ($O_{2(g)}$). Les sous-unités qui sont le siège de cette réaction

d'oxydation de l'eau forment donc le complexe d'évolution d'oxygène (CÉO). Ces intermédiaires qui ont pour rôle la réduction du $P680^+$ forment alors ce qu'on appelle le côté donneur du PSII.

Après une seconde excitation, l'accepteur Q_B se retrouvera dans un état doublement réduit (Q_B^{2-}), ce qui provoquera sa protonation et sa libération du site Q_B , au profit d'une autre molécule de PQ oxydé (20, 21).

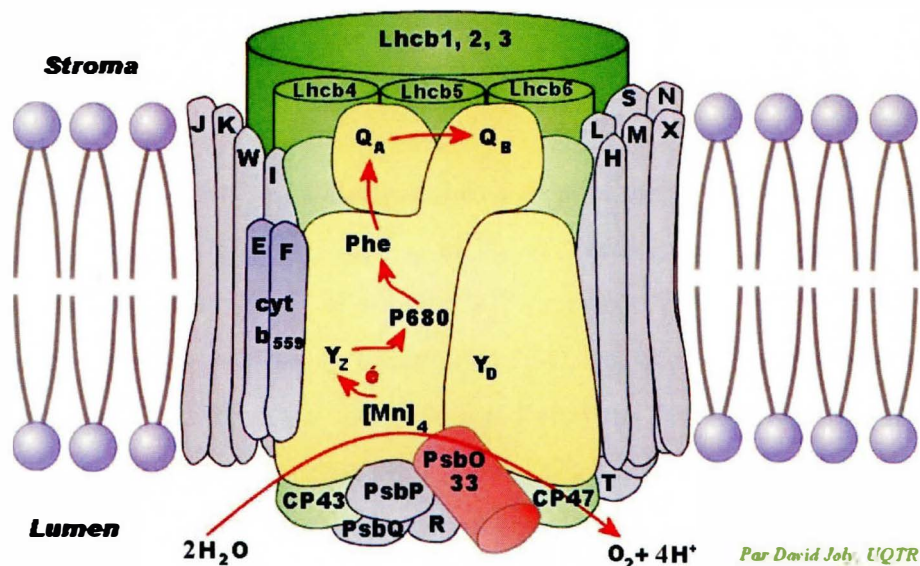


Figure 1.4: Représentation schématique de la structure du PSII et de ses principaux cofacteurs.

1.5.3 Structure et fonction du Photosystème I

Le PSI est composé d'un centre réactionnel (CR) de 12 sous-unités entouré de deux dimères d'antennes LHCI spécifiques aux PSI (Lhca1-Lhca4 et Lhca2-Lhca3), pour une masse totale du complexe d'environ 525 kDa (22). Chaque PSI contient plus de 200 molécules de Chl a/b. La lumière qu'elles captent est transmise jusqu'à une paire de Chl spéciales du centre réactionnel, le P700 (23). Comme pour le P680 du PSII, le P700 a la particularité de perdre un électron lorsqu'il est excité. La photooxydation du P700 engendre donc un transport d'électron dans le PSI. Un schéma de la structure du PSI est présenté à la Figure 1.5.

L'accepteur primaire d'électron est une Chl située sur la sous-unité PsaA appelée A_0 , qui transférera l'électron sur une molécule de phylloquinone nommée A_1 (24). L'obtention de la structure 3D du PSI de pois par cristallographie rayons X a permis de trouver un intermédiaire possible dans le transfert d'électron entre le P700 et A_0 : il s'agit d'une Chl appelée A (22). Notons également une importante symétrie dans la structure du PSI entre les deux sous-unités principales, PsaA et PsaB, qui se traduit par une symétrie entre les cofacteurs rédox du transport d'électrons : il y a effectivement deux branches possibles de transport d'électrons (A et B). L'utilisation de l'une ou des deux branches de transferts d'électrons dans le PSI fait encore l'objet de débats (24, 25).

Après avoir atteint A_1 , l'électron sera transféré tour à tour sur une série de trois complexes Fer-Soufre (Fe_4S_4), F_x , F_A , et F_B , respectivement, ces deux derniers étant situés sur la sous-unité PsaC, elle-même à l'interface PSI-stroma (26). F_B réduira un transporteur protéique soluble, la ferrédoxine (Fd), qui elle-même ira réduire le $NADP^+$ en NADPH dans une réaction catalysée par l'enzyme Ferrédoxine- $NADP^+$ Réductase (FNR) arrimée au PSI sur la sous-unité PsaE (27). Le NADPH pourra entre autre être utilisé dans la phase sombre de la photosynthèse.

Après avoir été photooxydé, le P700 sera quant à lui réduit par un transporteur soluble du côté lumen, la plastocyanine (PC).

1.5.4 Structure et fonction du Cytochrome b_6f

Dans la chaîne de transport photosynthétique d'électron, c'est le cytochrome b_6f qui assure le relais entre le côté accepteur du PSII et le côté donneur du PSI. Il s'agit d'un enzyme se présentant sous la forme d'un dimère de 217 kD. Chaque monomère est composé de 4 grosses sous-unités (18 à 32 kD), soit le cyt f, le cyt b_6 , le protéine FeS Rieske, et la sous-unité IV, ainsi que de quatre petites sous-unités hydrophobiques : PetG, PetL, PetM et PetN (28). Sa structure est présentée à la Figure 1.6. Il a également été montré dernièrement que les plantes auraient en plus une FNR liée au cyt b_6f (29).

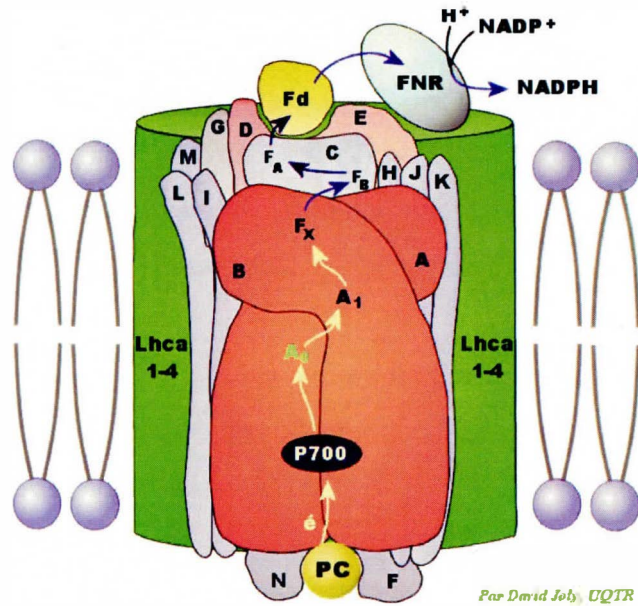


Figure 1.5 : Représentation schématique de la structure du PSI et de ses principaux cofacteurs.

Le Cyt b_6f contient deux sites de liaison pour les molécules de PQ : un site d'oxydation (nommé Q_0 , Q_p , ou Q_z) près du lumen et un site de réduction (nommé Q_R , Q_n , Q_i , ou Q_C) près du stroma. Les PQ réduites par le PSII seront donc oxydées au site Q_0 , ce qui implique la perte de deux électrons : un électron sera dirigé via le cyt b_6 vers le site Q_R , tandis que l'autre sera dirigé vers le centre FeS de la protéine Rieske, puis vers une PC liée au cyt f (28).

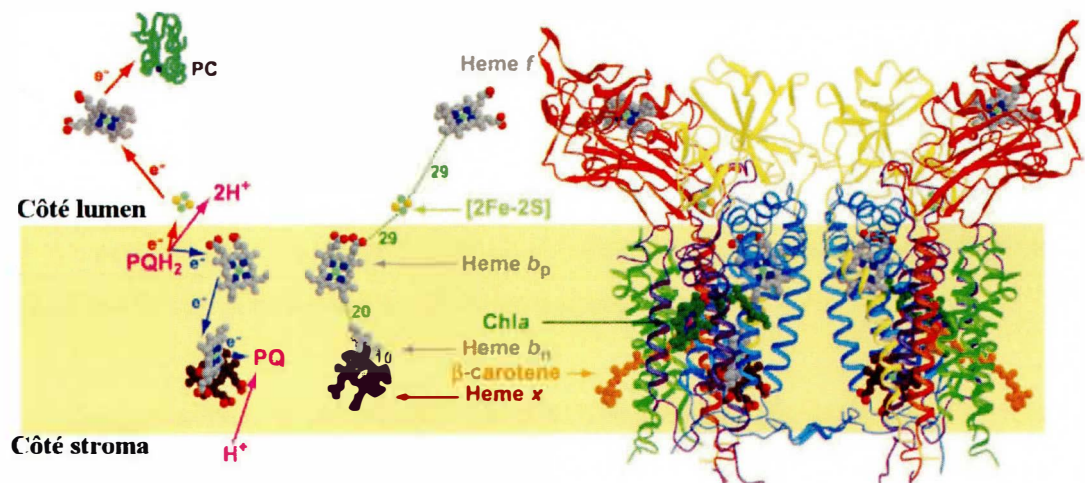


Figure 1.6: Modèle de structure tridimensionnelle du Cyt b_6f et des voies de transferts d'électrons et de protons entre ses cofacteurs redox. Adapté de Kurisu *et al.* (28)

1.5.5 Schéma en Z du transport d'électron

La chaîne de transport photosynthétique d'électrons entre les différents cofacteurs redox de la membrane des thylakoïdes est couplée à un transport vectoriel de protons d'un côté à l'autre de la membrane (du stroma vers le lumen) (30). Ce ΔpH ainsi créé est alors récupéré par une ATP synthase pour la production d'ATP.

L'énergie lumineuse fournie aux chlorophylles est donc utilisée pour faire un travail de création d'un potentiel électrochimique transmembranaire, et indirectement convertie en énergie chimique dans l'ATP.

Pour pouvoir « soutirer » un maximum d'énergie sous forme de potentiel de travail d'une réaction globale, il importe que cette réaction se produise le plus près possible de l'équilibre et de l'état de réversibilité. D'un point de vue pratique, cette réaction globale doit être divisée en un maximum de petites étapes. Le passage d'un électron d'un état de réducteur fort (ex. : $P680^*$) vers un oxydant fort (ex. : $P700^+$) doit donc se faire en de nombreuses étapes modifiant peu à peu le potentiel redox de l'électron pour pouvoir y extraire un maximum de travail sous forme de gradient de protons. La liste des étapes du transport d'électrons est d'ailleurs schématisée à la Figure 1.7 en fonction du potentiel redox des cofacteurs.

1.5.6 Transport cyclique d'électrons autour du PSI

La fixation du CO_2 lors du cycle de Calvin nécessite l'apport d'ATP et de NADPH dans un ratio 3:2. Toutefois, le transport photosynthétique linéaire d'électrons du PSII au PSI ne produit pas l'ATP et le NADPH selon cette stœchiométrie. Examinons la production de ces deux molécules dans les chloroplastes.

Chaque réduction de $NADP^+$ en NADPH par la FNR nécessite l'apport de 2 électrons, donc 4 électrons sont nécessaires pour la production de 2 molécules de NADPH. Le transport de ces 4 électrons du côté donneur du PSII jusqu'au côté accepteur du PSI entraîne quant à lui la translocation de 12 protons (H^+) du côté stroma

de la membrane des thylakoïdes vers le côté lumen (31). La sous-unité CF_o , qui agit comme rotor de l'ATP synthase, aura besoin de 14 protons pour effectuer une rotation complète de 360° , qui entraîne la production de 3 molécules d'ATP (32). Les 12 protons accumulés par le transport des 4 électrons entraîneront donc la production en moyenne de 2.57 molécules d'ATP. Le ratio ATP:NADPH produit par le transport linéaire d'électron est donc d'environ 1.29, ce qui est insuffisant pour optimiser les réactions de fixation du carbone (31).

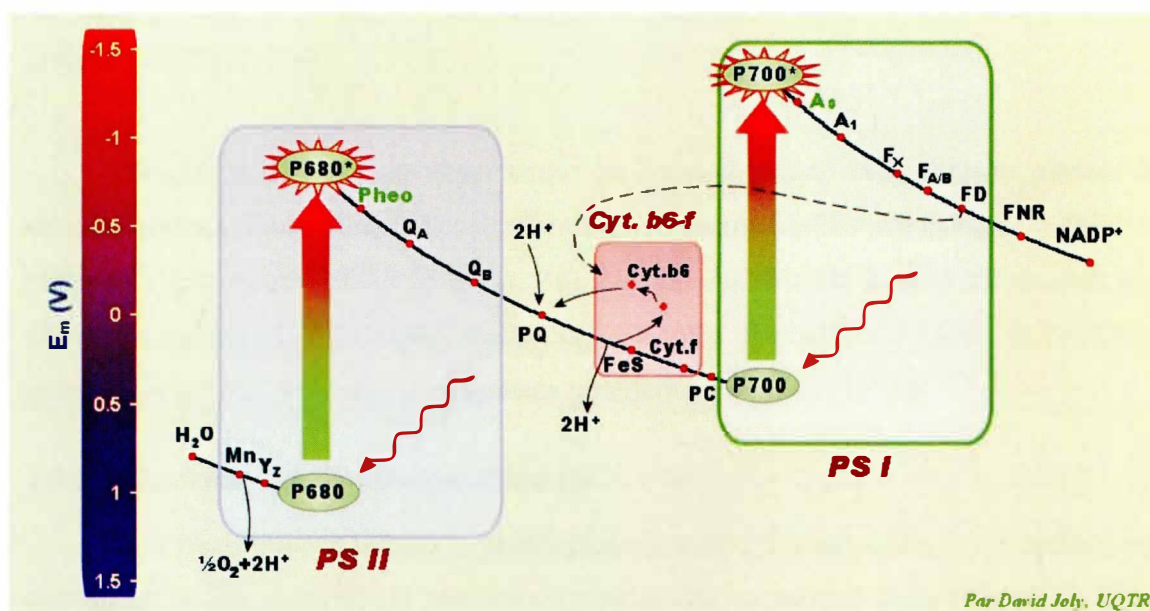


Figure 1.7: Schéma en Z de la chaîne de transport d'électrons dans les thylakoïdes.

Il existe donc un ensemble de voies alternatives de transport d'électron entre le $cyt\ b_6f$ et le PSI permettant de retourner les électrons arrivant au côté accepteur du PSI vers le pool de PQ (33). Ces voies alternatives forment ce qu'on appelle le transport cyclique d'électrons (TCE) autour du PSI. Cela permet d'augmenter le ΔpH membranaire et ainsi la production d'ATP sans génération de NADPH, donc d'augmenter le ratio ATP:NADPH (33-35).

Il y a principalement deux voies possibles de TCE. La première nécessite la présence de ferrédoxine (Fd) comme intermédiaire. Les Fd réduites servent alors de donneurs d'électrons pour réduire le pool de plastoquinones via une enzyme encore mal

connue, qui pourrait être la FNR, ou encore une ferrédoxine-quinone réductase (FQR). Cette voie de transport d'électrons peut être inhibée par l'Antimycine A ou par certains inhibiteurs de la FNR, comme l'héparine (33).

La deuxième principale voie de transport cyclique autour du PSI se sert plutôt du NADPH ou du NADH comme donneur d'électrons pour le pool de PQ (33). Pour faire ce travail, une enzyme similaire au complexe I des mitochondries a été découverte dans les chloroplastes : la NAD(P)H déhydrogénase. Celle-ci peut être inhibée notamment en présence de HgCl_2 (36).

Bien que le transport cyclique autour du PSI soit très efficace chez les plantes de morphologie C_4 , l'importance de ce mécanisme (et même parfois son existence) chez les plantes C_3 fait encore l'objet de débat (34). Néanmoins, il a été montré récemment que des plants mutants d'*Arabidopsis thaliana* (qui est une plante C_3) déficients en protéines spécifiques au TCE voient leur croissance grandement inhibée (37, 38).

1.5.7 Absorption et dissipation d'énergie

La lumière utilisée durant la photosynthèse est du domaine de l'UV-visible. Cela correspond à des photons qui peuvent engendrer des transitions électroniques dans les molécules excitables. L'efficacité de l'interaction entre le photon et l'orbitale moléculaire de l'électron, qui a pour résultat l'absorption de la lumière, dépend de deux facteurs. Tout d'abord, l'énergie du photon ($E = h\nu$) doit correspondre exactement à la différence d'énergie entre l'un des états excités de l'électron et l'état fondamental. Ensuite, le moment dipolaire électrique de la transition engendrée doit être non-nul.

Une fois excité, l'électron aura tendance à retourner à son état le plus probable, c'est-à-dire son état le plus stable : son état fondamental S_0 . Pour ce faire, il existe plusieurs voies de déexcitation possibles, en compétition les unes avec les autres (Figure 1.8) (39, 40). L'électron excité peut réémettre un photon, dans un laps de temps de l'ordre de la nanoseconde : il s'agit de la fluorescence. L'électron excité peut aussi être utilisé dans la photosynthèse pour faire des réactions photochimiques efficaces.

Finalement, le dégagement de chaleur est une autre voie dissipative importante et d'intérêt dans la photosynthèse.

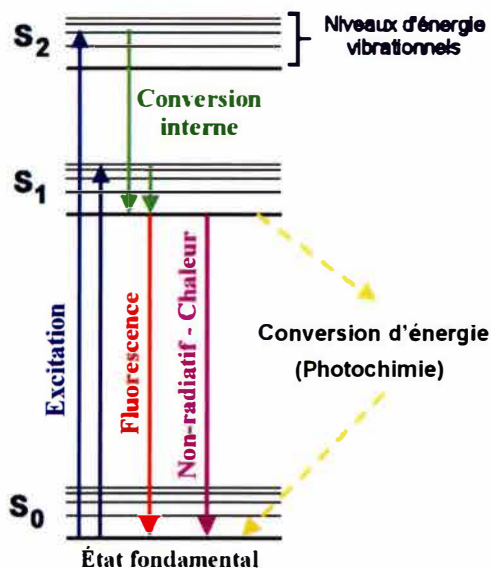


Figure 1.8: Diagramme de Jablonski simplifié de l'absorption d'énergie et des principales voies de dissipation en photosynthèse.

1.5.8 Transfert d'excitation

Une excitation peut être transférée de molécules en molécules lorsque celles-ci sont semblables et situées près les unes des autres, comme c'est le cas pour les chlorophylles dans les antennes des photosystèmes. Une telle excitation mobile est appelée un exciton (12, 17). Les lois de la mécanique quantique et son principe d'incertitude disent qu'il n'est pas possible de déterminer avec précision sur quelle molécule du groupe se trouve l'excitation à un moment donné. L'excitation est donc partagée ou distribuée entre plusieurs molécules du groupe (on parle alors de couplage d'excitons).

La situation pourrait être comparée à celle des liaisons doubles du benzène. Plutôt que d'adopter une conformation « pure » où les doubles liaisons sont à des endroits fixes dans la molécule, le benzène adopte un état mixte qui correspond au mélange entre ses différents états purs, grâce à la stabilisation de l'aromatique par résonance. Il en résulte un état mixte plus stable que les différents états purs possibles.

D'une façon similaire, il y a une résonnance de l'excitation parmi les Chl des antennes. Ce transfert d'énergie par résonnance nécessite une transition couplée entre deux molécules, où l'énergie perdue par le donneur doit correspondre à l'énergie gagnée par l'accepteur. Cela signifie que les différentes super-structures de résonnances sont équivalentes d'un point de vue énergétique. Ce processus est appelé « fluorescence resonance energy transfer » (FRET), bien qu'il n'implique pas d'émission et de réabsorption de photons, comme pourrait le laisser croire son nom (12).

Les interactions électroniques qui gèrent ce type de résonnance sont les dipôles des excitons. Les différentes lois qui régissent le transfert d'exciton par FRET ont été initialement décrites par Förster. La probabilité d'interaction entre excitons dépend entre autre des orientations respectives des dipôles et de la distance qui les sépare, ainsi que l'intégrale de recouvrement entre le spectre de fluorescence du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur (12).

1.6 Mécanismes de contrôle de dissipation d'énergie du PSII

Étant donné la grande variété des conditions environnementales où une même plante est exposée, les mécanismes photosynthétiques doivent être en mesure de s'adapter à toutes sortes de stress, de maximiser l'efficacité photosynthétique sous un ciel nuageux du matin où l'intensité lumineuse est faible, tout en étant capable de s'adapter à l'intensité lumineuse sur-saturante et au surplus d'excitation potentiellement nuisible du plein soleil du midi (41-43). Dans certaines conditions où l'influx lumineux est trop grand par rapport à la vitesse de la chaîne de transport photosynthétique, les Chl demeureront excités plus longtemps et auront une probabilité beaucoup plus importante de passer à un état triplet excité, qui réagira rapidement avec l'oxygène ambiant pour former des espèces réactives d'oxygène (ROS) (44). Ces derniers peuvent occasionner des dommages à la machinerie photosynthétique. Une telle inhibition de la photosynthèse, causée par une exposition à la lumière, est appelée photoinhibition.

Pour éviter la photoinhibition tout en maximisant l'utilisation de la radiation disponible sous faible intensité lumineuse, l'appareillage photosynthétique doit posséder

une gamme de mécanismes réversibles lui donnant la flexibilité nécessaire pour s'adapter aux changements de son environnement (42, 45). Les mécanismes en question ont généralement comme conséquence d'affecter la balance entre les principales voies de la dissipation des excitations (photochimie, fluorescence, chaleur). Dans la plupart des cas, la photochimie et la fluorescence seront diminués au profit de la dissipation thermique. On parle donc de quenching non-photochimique (« non-photochemical quenching », NPQ) de la fluorescence des Chl, puisque la diminution de la fluorescence n'est pas due à une augmentation de la photochimie (44).

1.6.1 Principaux mécanismes de quenching non-photochimique

Le NPQ comprend de nombreux mécanismes, mais est principalement divisé en trois catégories : le quenching de haute énergie (qE), comprenant entre autre le cycle des xanthophylles, le quenching dû à la transition d'états (qT) et le quenching dû à la photoinhibition (qI).

Le cycle des xanthophylles est engendré par un bas pH dans le lumen (46). Cela est obtenu suite à une activité accrue du PSII et/ou du TCE autour du PSI, ce qui entraîne un déplacement important de protons du stroma vers le lumen par la réduction des PQ suivie de leur oxydation par le Cyt b_6f . Le bas pH entraîne alors la protonation des LHCII, l'activation d'une déépoxidase qui convertira la violaxanthine des LHCII en zéaxanthine, induisant un changement de conformation des antennes. La conséquence est alors une augmentation de la dissipation thermique de l'énergie absorbée.

D'autre part, certaines kinases présentes dans les membranes des thylakoïdes sont activées lorsque le pool de PQ se maintient dans un état fortement réduit. Ces kinases phosphorylent les LHCII, qui perdent alors leur affinité pour le PSII et s'y détachent, pour migrer vers le PSI et ainsi augmenter sa capacité à absorber la lumière (« état 2 »). Lorsque le pool de PQ se retrouvera dans un état oxydé, des LHCII-phosphorylases seront à leur tour activées, entraînant le retour des LHCII vers le PSII (« état 1 »). C'est le phénomène appelé « transition d'états » (47).

Dans le cas d'une exposition persistante à un éclairage trop intense par rapport à la capacité photochimique de l'appareillage photosynthétique, les ROS engendrés entraînent des dommages importants : les Chl peuvent être dégradées de même que des protéines tant du PSII que du PSI (48, 49). Des centres réactionnels endommagés peuvent alors avoir une fluorescence plus faible (42). Ce type d'atténuation de fluorescence est le quenching de photoinhibition (50).

1.6.2 Quenching des excitations du PSII par les PQ

Les quinones et PQ oxydées sont connues comme étant d'efficaces atténuateurs des états excités des Chl du PSII (51-53). Cependant, leur forme réduite n'a pas cette propriété (54-56). Le niveau de fluorescence des PSII est donc fortement dépendant de l'état rédox du pool de PQ, de Q_A et de Q_B (53, 57, 58).

Il a également été montré que l'ajout des quinones oxydées de différents types (benzoquinones, naphthoquinones, plastoquinones, etc.) à des thylakoïdes ou des membranes enrichies en PSII atténue la fluorescence du PSII (51, 59). Cette diminution augmente avec la concentration et l'efficacité à atténuer la fluorescence varie d'une quinone à l'autre.

1.6.3 Mécanismes de contrôle de dissipation d'énergie du PSI

La plupart des mécanismes connus de contrôle de la dissipation d'énergie agissent sur les PSII. Il est proposé que la dissipation d'énergie du PSI et son niveau d'activité sont contrôlés indirectement par les mécanismes de NPQ du PSII (45). De plus, la fluorescence du PSI est considérée comme non-variable (60). L'information sur le quenching des états excités des Chl du PSI est donc principalement limitée à la vision du $P700^+$ comme un atténuateur non-photochimique efficace (61).

Récemment, il a également été proposé que le PSI subit des changements de conformation réversibles qui dépendent de l'état rédox du pool de $NADP^+$ (62). Dans une étude faite sur des membranes enrichies en PSI (en absence de PSII), l'ajout de

NADP⁺ atténua la fluorescence et l'activité du PSI, suite à un changement de conformation. L'effet pouvait cependant être renversé par l'ajout de NADPH.

1.7 Problématique et objectifs du projet

Bien que la capacité des quinones exogènes d'atténuer la fluorescence du PSII est connue, les conséquences de ce phénomène sur la cinétique de dissipation d'énergie du PSII n'est pas bien caractérisée, particulièrement dans le cas des mesures d'induction de fluorescence (IF). L'IF est la mesure de la cinétique triphasique de fluorescence observée lorsqu'un échantillon photosynthétique est soumis à un éclairage continu et intense. Aussi, l'importance du pool endogène de plastoquinone lors de ces mesures ne fait pas l'unanimité (63). Certains croient que l'enlèvement du quenching statique du pool de PQ oxydé, causé par sa réduction par le PSII, est reflété par les deux dernières phases, J-I et I-P, alors que certaines évidences suggèrent que ce serait seulement le cas pour la phase I-P (54, 56). Aussi, certains nient complètement l'effet de l'état rédox du pool de PQ sur la cinétique d'IF (64).

L'importance de l'oxydation du pool de PQ par le Cyt b₆f, pour ensuite fournir ces électrons au PSI, est également un point qui doit être éclairci. Cela est particulièrement pertinent dans des isolations de thylakoïdes où l'activité du PSI est sévèrement limitée, puisque les accepteurs d'électrons du PSI, la Fd et le NADPH, sont hydrosolubles et alors perdus au cours de l'isolation. Il pourrait y avoir des liens entre cela et l'absence de séparation claire entre les phases J-I et I-P pour des thylakoïdes, contrairement aux systèmes intacts comme les feuilles.

De plus, puisque les quinones artificielles ont la capacité d'atténuer les états excités des Chl des antennes du PSII (51-53), il serait logique de penser qu'elles puissent également avoir un effet sur le PSI, dont les antennes présentent une grande similitude avec les antennes des PSII (22, 65). Des travaux de Lee *et al.* (66) et récemment de Rajagopal *et al.* (55) ont confirmé cette hypothèse dans des fractions membranaires enrichies en PSI. Cependant, aucune étude n'a vérifié l'effet de molécules plus semblables aux PQ endogènes (les PQ-9) sur la dissipation d'énergie du PSI, de même

que l'effet du pool endogène lui-même. Si un tel mécanisme existe, il être très important, puisque les mécanismes de contrôle de dissipation d'énergie du PSI sont peu connus.

La présente étude a donc pour but de mieux caractériser l'importance du pool de PQ sur certains aspects de la dissipation d'énergie en photosynthèse, tant du PSII que du PSI.

Les objectifs spécifiques consistent tout d'abord à vérifier l'effet de l'état rédox du pool de PQ sur l'IF du PSII en altérant sa cinétique de réduction sous la lumière de mesure. Pour ce faire, le pool d'accepteurs d'électrons du PSII sera élargi en ajoutant différentes molécules (par exemple le TMPD, des quinones artificielles, le méthyl viologène) qui peuvent accepter des électrons du site Q_B du PSII, oxyder le pool de PQ, ou augmenter l'activité du PSI.

L'objectif le plus novateur consiste cependant à vérifier l'influence des PQ et de leur état rédox sur la dissipation d'énergie du PSI. Pour y parvenir, la fluorescence, la photooxydation du P700 et la dissipation thermique de membranes enrichies en PSI (donc en absence de PSII) seront mesurées avec ou sans ajout de PQ exogènes (PQ_{ex}) oxydées. Nous utiliserons les décyl-plastoquinones (dPQ), les PQ-2 et les PQ-9. Le pool endogène de PQ de membranes complètes de thylakoïdes sera réduit pour en voir l'impact sur le PSI. Cela demandera donc de mettre à profit et de corréler des mesures obtenues de plusieurs méthodes différentes, comme la mesure des spectres d'émission à température pièce et à 77 K, le changement d'absorption à 830 nm, et la spectroscopie photoacoustique.

CHAPITRE II

ÉLÉMENTS THÉORIQUES DE SPECTROSCOPIE

2.1 Généralités sur la spectroscopie de fluorescence

2.1.1 Introduction

L'une des façons pour une molécule électroniquement excitée de retourner à son état fondamental est de réémettre un photon par fluorescence, qui se fait dans un ordre de temps de ns.

La fluorescence est une technique fréquemment utilisée en sciences de la vie en raison de la facilité et de la sensibilité avec laquelle on peut effectuer ce type de mesure. Plusieurs molécules biologiques ont des propriétés fluorescentes, qui sont parfois même sensibles aux changements dans leur milieu. Le domaine de la photosynthèse ne fait pas exception à cela. La fluorescence est une méthode qui permet d'obtenir une quantité importante d'information tant sur la structure que sur la fonction et l'activité des photosystèmes, ce qui en fait une méthode très répandue.

2.1.2 Fluorescence des chlorophylles

Les chlorophylles sont les pigments les plus nombreux des antennes et des photosystèmes. Ce sont aussi ceux qui fluorescent le plus efficacement. Malgré la présence de Chl *a* et *b*, c'est principalement la fluorescence de la Chl *a* qui est observée. L'explication est simple : en plus du fait qu'il y a plus de Chl *a* que de Chl *b*, la transition électronique $S_1 \rightarrow S_0$ est de plus grande énergie pour la Chl *b* que pour la Chl *a*, ce qui implique que le transfert d'excitations des Chl *b* aux Chl *a* est beaucoup plus favorable énergétiquement et efficace que le transfert d'excitations des Chl *a* aux Chl *b*. La probabilité que les excitations se retrouvent parmi les Chl *a* est donc beaucoup plus importante que parmi les Chl *b*, ce qui fait en sorte que le retour à l'état fondamental non-excité S_0 par fluorescence, plus lent que le transfert d'excitation, est beaucoup plus probable à partir des Chl *a*.

Le spectre d'excitation des Chl *a* libres dans le diéthyl éther présente principalement une bande autour de 430 nm et une seconde vers 660 nm (Figure 2.1) (5). Cette dernière représente une bande Q selon l'axe y de la chlorophylle, correspondant à l'excitation de l'état électronique fondamental S_0 vers le premier état électronique excité (HOMO $\rightarrow$ LUMO). La bande à 430 nm correspond à la bande de Soret, soit l'excitation du niveau S_0 au 2^e niveau électronique excité, S_2 (HOMO $\rightarrow$ LUMO+1) (5).

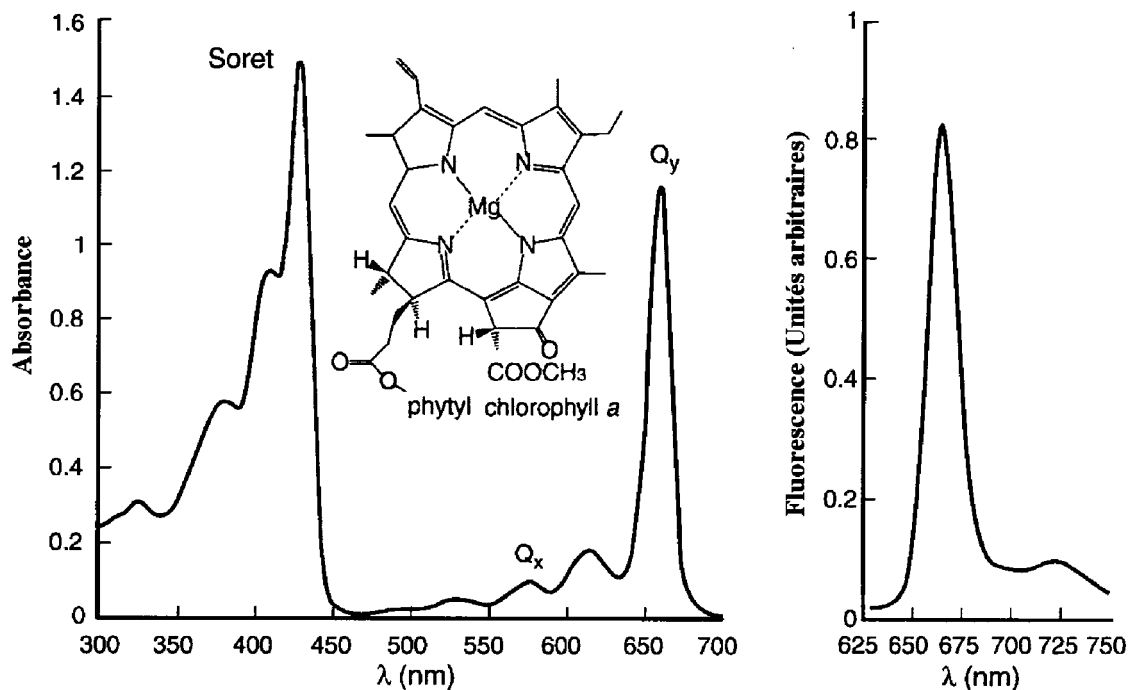


Figure 2.1 : Spectres d'absorption (gauche) et de fluorescence (droite) de la Chl *a* dans le diéthyl éther. Adapté de Blankenship (5)

Les états excités en S_2 sont cependant rapidement et efficacement désexcités par conversion interne vers S_1 , d'où la désexcitation vers l'état fondamental pourra s'effectuer en partie par fluorescence. Cela explique donc que l'excitation de la bande de Soret et de Q_y mènent à un spectre de fluorescence avec une bande principale vers 665-670 nm avec un épaulement vers 725 nm (Figure 2.1).

2.1.3 Fluorescence des membranes photosynthétiques

Dû à l'environnement protéique variable des nombreuses Chl des antennes et à l'efficacité du transfert d'excitation entre Chl, le spectre de fluorescence de membranes photosynthétiques aura certaines propriétés particulières.

Les PSII ont un spectre de fluorescence similaire à celui des Chl *a* avec un léger décalage vers le rouge : le maximum d'émission est donc autour de 684 nm (60, 62). Cependant, les antennes des PSI contiennent quelques Chl dont le pic d'absorption est fortement décalé vers le rouge (690 nm, 705 nm, 715 nm, et 735 nm entre autres) (67, 68). Bien que contribuant à moins de 5% du spectre d'absorption des PSI, elles peuvent représenter plus de 90 % de sa fluorescence totale à la température de la pièce, puisque le transfert d'excitation vers ces Chl « rouges » est fortement favorisé (68). Le spectre de fluorescence des PSI est donc composé d'une bande à 684 nm et d'une bande autour de 720 nm, dont les proportions peuvent dépendre des espèces et de la quantité de détergent utilisé lors de l'extraction des PSI et présent lors de la mesure (55, 68).

Dans des thylakoïdes entiers, le rendement de fluorescence des PSII est beaucoup plus grand que celui des PSI (60, 69). Le spectre résultant est donc similaire à celui des PSII (62).

2.1.4 Cinétique d'induction de la fluorescence chlorophyllienne

La fluorescence chlorophyllienne des échantillons photosynthétiques est connue comme étant variable. Lorsqu'on soumet une feuille, préalablement adaptée à la noirceur, à un éclairage actinique, continu et intense, sa cinétique de fluorescence suivra un patron caractéristique, appelé induction de fluorescence (IF) ou « effet Kautsky » (70): le niveau de fluorescence débutera au niveau basal, F_0 ou O , et augmentera en moins d'une seconde jusqu'au niveau maximal, F_m ou P , en passant par deux points d'inflexions (ou pics), J et I , visibles à environ 1 ms et 30 ms de la période d'illumination, respectivement (Figure 2.2) (71, 72). Puisque la fluorescence du PSI est

considérée comme n'étant pas variable, les variations dans le niveau de fluorescence sont attribuées uniquement à l'état du PSII (63, 71).

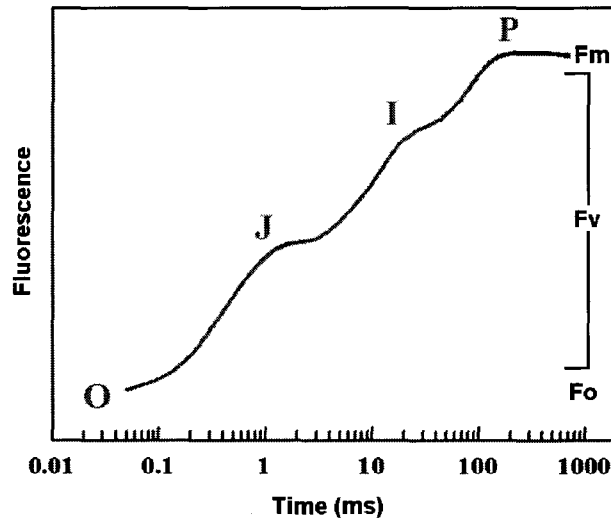


Figure 2.2: Courbe typique d'induction de fluorescence dans les feuilles

Le niveau F_0 est considéré comme représentant la dissipation sous forme de fluorescence des excitons dans les antennes avant qu'ils n'atteignent les centres réactionnels du PSII complètement ouverts (40, 73). Quant à lui, le niveau F_m représente un état complètement fermé des PSII (63). La montée de fluorescence de O à P se ferait donc en parallèle avec le passage graduel des PSII d'un état où ils peuvent recevoir des excitations (ouverts) vers un état où les PSII ont atteint un niveau maximal de réduction de ses accepteurs (fermés) (71, 74). Il est généralement accepté que la réduction photochimique de Q_A se produit durant la phase O-J de l'IF (58). Cependant, l'origine exacte des phases J-I et I-P demeure controversée (71, 75). Le potentiel électrique membranaire (76-78), l'activité du côté donneur du PSII (79), la réduction de la quinone Q_B (57, 75), l'hétérogénéité des PSII dans les thylakoïdes et la réduction de un ou plusieurs pools de PQ (80, 81) sont quelques principaux exemples de différents mécanismes proposés pour expliquer les phases J-I et I-P.

Dans les systèmes isolés, comme des membranes de thylakoïdes ou des membranes enrichies en PSII, l'IF a cependant une allure différente : le pic I n'est plus apparent et on se retrouve en présence de courbes à l'allure biphasique. Cependant,

Pospisil et Dau (76, 82) ont montré par une analyse quantitative que dans les thylakoïdes, contrairement aux PSII, la montée de fluorescence demeurait triphasique. Bukhov *et al.* (83) ont ensuite montré que l'ajout de *N,N,N',N'*-tetraméthyl-*p*-phénylènediamine (TMPD) modifiait de façon importante l'IF des thylakoïdes pour provoquer une séparation claire des phases J-I et I-P, donnant ainsi un tracé similaire à ceux obtenus dans des systèmes intacts comme des feuilles.

2.2 Généralités sur le quenching de fluorescence

2.2.1 Introduction

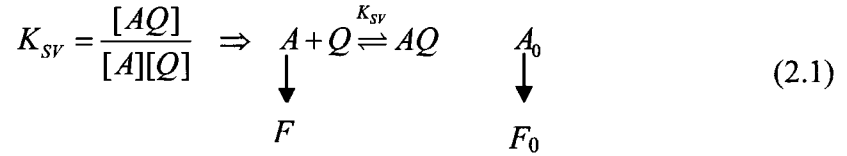
Comme vu précédemment, la fluorescence chlorophyllienne est une méthode simple et sensible qui permet d'obtenir des indications sur la dissipation d'énergie de l'appareillage photosynthétique. Aussi, certaines molécules ont la capacité d'atténuer le rendement de fluorescence de molécules fluorophores.

On distingue principalement deux types d'atténuation (quenching) de fluorescence : le quenching dynamique et le quenching statique (84). Le quenching dynamique origine de la collision entre l'atténuateur et le fluorophore pendant que ce dernier est excité. Le quenching statique, quant à lui, provient entre autre de la formation d'un complexe non-fluorescent entre le fluorophore et l'atténuateur. C'est ce qui se passe avec les PQ endogènes et les quinones artificielles, dont l'effet de quencher statique de la fluorescence du PSII a déjà été étudié (51, 59).

2.2.2 Équation de Stern-Volmer

L'atténuation de fluorescence peut être étudiée par l'analyse de Stern-Volmer. Voyons en quoi elle consiste pour un atténuateur statique de fluorescence.

Posons A , une espèce fluorescente, et Q , un quencher statique de la fluorescence de A . Ils sont reliés par une constante d'équilibre (de formation) K_{SV} de la façon suivante :



Les indices « 0 » indiquent des concentrations/valeurs sans quencher (maximales). Le complexe AQ n'étant pas fluorescent, l'intensité de la fluorescence en présence d'une concentration donnée de quencher (F) sera inférieure à celle en absence de quencher, tel que $F \leq F_0$. L'intensité de la fluorescence est proportionnelle à la quantité d'espèce fluorescente. En posant la constante de proportionnalité z , on a que :

$$F_0 = z[A_0] \quad (2.2)$$

$$F = z[A] \quad (2.3)$$

$$F = F_0 - F_Q \quad (2.4)$$

où F_Q est la quantité de fluorescence quenchée. En développant l'équation (2.4), on obtiendra :

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (2.5)$$

Il s'agit de l'équation de Stern-Volmer pour le quenching statique. Un graphique de F_0/F en fonction de la concentration de l'atténuateur devrait donc donner une relation linéaire dont la pente est K_{SV} (51, 84).

2.2.3 Équation de Stern-Volmer modifiée

Les résultats obtenus pour l'analyse de Stern-Volmer ne montrent pas toujours une telle relation linéaire. On peut parfois y voir approximativement une combinaison de deux relations linéaires. Cela signifie qu'il y a deux populations distinctes d'espèces fluorescentes et que l'une d'entre elles n'est pas accessible par l'atténuateur (ou qu'à partir d'une certaine concentration, l'atténuateur ne peut plus « accéder » à l'espèce fluorescente) (51, 85, 86). La fluorescence initiale F_0 (sans quencher) est donc séparée en deux contributions : la partie de la fluorescence que l'on peut atténuer (elle est

accessible), $F_{0,a}$, et la partie de la fluorescence que l'on ne peut pas atténuer (inaccessible), $F_{0,i}$. On a donc :

$$F_0 = F_{0,a} + F_{0,i} \quad (2.6)$$

On définit également la fraction de fluorescence accessible au quencher comme étant :

$$f_a = \frac{F_{0,a}}{F_0} \quad (2.7)$$

La variation de fluorescence en présence de quencher sera définie comme étant :

$$\Delta F = F_0 - F \quad (2.8)$$

En tenant compte de la fraction de fluorophores inaccessibles, on réécrit l'équation de Stern-Volmer :

$$F = \frac{F_{0,a}}{1 + K_{SV}[Q]} + F_{0,i} \quad (2.9)$$

Il est évidemment un peu difficile de travailler avec cette équation. Il serait beaucoup plus facile d'avoir une fonction de la forme $y = m[Q] + b$ ou $y = m[Q]^{-1} + b$ dans laquelle y contient tous les paramètres expérimentaux de fluorescence, et m ou b contenant K_{SV} . De cette façon, il serait facile de trouver graphiquement K_{SV} . En travaillant la dernière équation, on pourra obtenir que :

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{1}{f_a K_{SV}[Q]} + \frac{1}{f_a} \quad (2.10)$$

En traçant $F_0/\Delta F$ en fonction de $[Q]^{-1}$, on obtiendra une droite avec une ordonnée à l'origine valant f_a^{-1} et on pourra ensuite extraire K_{SV} de la valeur de la pente. L'objectif est donc atteint par cette équation, qui s'appelle l'équation de Stern-Volmer modifiée (85, 86).

2.3 Généralités sur le changement d'absorption à 800-850 nm

Contrairement au cas des PSII, dont la fluorescence variable est une méthode qui peut donner des informations sur l'état ouvert/fermé du centre réactionnel et sur son efficacité photochimique, le faible niveau de fluorescence des PSI n'est pas sensible à

l'état fonctionnel de son centre réactionnel. D'autres méthodes sensibles ont alors été élaborées.

L'une de ces méthodes met à profit le fait que le P700, qui est la paire de Chl spéciale du PSI, n'absorbe pas uniquement à 700 nm; sa photooxydation entraîne une augmentation de l'intensité de l'absorption dans la région 800-850 nm (87).

Le point intéressant de cette technique est que la lumière absorbée dans la région 800-850 nm n'est pas actinique : on peut donc utiliser des sources de hautes intensités pour effectuer des mesures d'absorption, comme des diodes émettrices de lumière (DEL). On mesure donc les changements de l'état rédox du P700 par le changement d'absorption (ΔA) dans cette région.

2.4 Généralité sur la spectroscopie photoacoustique

2.4.1 Introduction

L'effet photoacoustique consiste en la conversion de la lumière en onde acoustique suite à l'absorption de la lumière et à sa dissipation sous forme thermique. Cet effet a été découvert en 1880 par Alexander Graham Bell alors qu'il a inventé le photophone, un appareil qui lui a permis de « transporter » avec succès les signaux sonores en utilisant des rayons du soleil réfléchis par un mince miroir dont la concavité/convexité était modulée par la voix (88). En travaillant sur son photophone, il s'est aperçu qu'une onde sonore était produite d'un matériel solide si la lumière solaire incidente était interrompue à des fréquences de l'ordre du kHz à l'aide d'un modulateur mécanique.

C'est cet effet qui est mis à profit dans la spectroscopie photoacoustique. L'échantillon est placé dans une petite cellule, où il y a une mince couche d'air au-dessus, le tout étant scellé. Si on soumet l'échantillon à un éclairage et qu'il peut absorber cette lumière, une partie de l'énergie absorbée sera dissipée sous forme thermique, ce qui provoquera une augmentation de la température dans la mince couche

d'air au-dessus de l'échantillon. Cette augmentation de température entraînera une augmentation de la pression.

Cependant, si on éclaire l'échantillon avec une lumière modulée, le dégagement de chaleur et l'augmentation de la pression seront également modulés. Cette variation de pression, qui est en fait un son, pourra alors être détectée par un microphone très sensible et pourra agir comme une sonde du dégagement de chaleur par l'échantillon.

En photosynthèse, la spectroscopie photoacoustique peut donc être utilisée pour mesurer la dissipation d'énergie sous forme thermique pour différentes conditions d'éclairage. Les chloroplastes étant le lieu d'échanges gazeux (O_2 , CO_2), les mesures en spectroscopie photoacoustique sur des systèmes intacts pourront donner lieu à des composantes photobariques (89), puisque l'absorption ou le dégagement de gaz affecte également la pression dans la cellule de mesure. Cependant, un aspect très intéressant de cette technique est qu'elle permet indirectement de mesurer le stockage d'énergie par l'appareillage photosynthétique.

2.4.2 Stockage d'énergie

Pour un échantillon photochimiquement actif (photosystèmes ouverts), la partie de l'énergie lumineuse absorbée qui n'est pas utilisée en réaction photosynthétique efficace est dissipée en fluorescence ou sous forme de chaleur, cette dernière étant détectée par le signal photoacoustique. Ce signal sera alors maximal pour un échantillon photochimiquement inactif (photosystèmes fermés).

D'autre part, à la température de la pièce, le rendement de luminescence est faible en comparaison à la dissipation thermique. Cela signifie que l'on peut négliger l'effet de la fluorescence (90). Ainsi, on peut approximer la quantité d'énergie stockée par les réactions photochimiques comme étant la différence entre le signal photoacoustique obtenu d'un échantillon inactif (Q_m) et celui d'un échantillon actif (Q_c). Le rendement du stockage photochimique d'énergie est donc défini par l'équation (91, 92) :

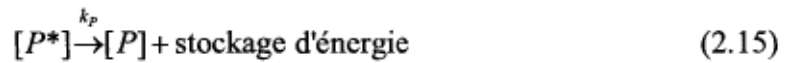
$$\phi_I = \frac{Q_m - Q_c}{Q_m} \quad (2.11)$$

Pour obtenir un échantillon inactif, la méthode consiste simplement à ajouter un éclairage continu saturant à la lumière de mesure modulée. Cela aura pour effet d'entraîner l'accumulation des photosystèmes dans un état fermé.

2.4.3 Analogie avec les cinétiques enzymatiques

Pour analyser les résultats expérimentaux de la spectroscopie photoacoustique et de tirer le maximum de potentiel de la technique, le développement des équations des cinétiques en jeu est primordial.

Posons tout d'abord les équations de vitesses des réactions d'excitation des photosystèmes et de leurs différents mécanismes de dissipation de l'excitation :



où $[P]$ et $[P^*]$ sont les concentrations de photosystèmes dans leur état non excité et dans leur état excité, respectivement, I est l'intensité lumineuse, et k_e , k_h , k_F et k_P sont les constantes de vitesses de chacune des réactions. À partir de ces équations, le taux de formation de l'espèce P^* est exprimé par :

$$\frac{d[P^*]}{dt} = k_e I[P] - k_h[P^*] - k_F[P^*] - k_P[P^*] \quad (2.16)$$

Lors d'une mesure à une intensité lumineuse donnée, la réaction atteint un état stationnaire. On aura donc que :

$$\frac{d[P^*]}{dt} = k_e I[P] - k_h[P^*] - k_F[P^*] - k_P[P^*] = 0 \quad (2.17)$$

Définissons $[P_0]$ comme la concentration totale de photosystèmes :

$$[P_0] = P + P^* \quad (2.18)$$

En combinant les équations (2.17) et (2.18), on obtiendra que :

$$[P^*] = \frac{[P_0]I}{\frac{k_h + k_F + k_P}{k_e} + I} \quad (2.19)$$

Considérons maintenant l'expression du taux de transport d'électrons (R) :

$$R = k_P[P^*] \quad (2.20)$$

$$R = \frac{k_P[P_0]I}{\frac{k_h + k_F + k_P}{k_e} + I} \quad (2.21)$$

Le taux maximal de transport d'électrons (R_m) et le rapport des constantes de vitesse (i_{50}) sont définis par :

$$R_m = k_P[P_0] \quad (2.22)$$

$$i_{50} = \frac{k_h + k_F + k_P}{k_e} \quad (2.23)$$

On aura alors :

$$R = \frac{R_m I}{i_{50} + I} \quad (2.24)$$

Le résultat est une équation qui ressemble particulièrement aux équations de cinétiques enzymatiques (93), particulièrement celle de Michaelis Menten :

$$v = \frac{V_m[S]}{K_m + [S]} \quad (2.25)$$

Il s'agit évidemment d'une fonction croissante avec I , c'est-à-dire que plus l'intensité lumineuse est élevée, plus le taux de transport d'électrons sera élevé.

Cependant, il manque encore quelques étapes avant d'arriver à une expression qui puisse avoir une utilité directe avec les mesures expérimentales de photoacoustique de stockage d'énergie.

Pour une intensité lumineuse donnée, nous définissons le rendement du stockage d'énergie (ϕ_I) en fonction du rendement maximal de stockage d'énergie (ϕ_m) tel que :

$$\phi_I = \phi_m \left(\frac{R_m - R}{R_m} \right) \quad (2.26)$$

En remplaçant R dans cette équation par son expression trouvée précédemment, on obtiendra :

$$\phi_I = \frac{\phi_m}{\frac{I}{i_{50}} + 1} \quad (2.27)$$

Expérimentalement, on a accès aux mesures de stockage d'énergie (ϕ_I) à différentes intensités lumineuses. Voyons comment ces mesures peuvent être utilisées pour trouver le pourcentage maximal de stockage d'énergie (ϕ_m) et la valeur de i_{50} .

En inversant la dernière équation, on obtiendra une relation linéaire entre ϕ_I^{-1} et I :

$$\frac{1}{\phi_I} = \frac{1}{\phi_m} \left(\frac{I}{i_{50}} + 1 \right) \quad (2.28)$$

Le graphique de ϕ_I^{-1} en fonction de I donnera une droite dont l'ordonnée à l'origine sera ϕ_m^{-1} et la pente $(i_{50}\phi_m)^{-1}$ (91).

CHAPITRE III

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

3.1 Matériel végétal utilisé

Des plants de pois (*Pisum Sativum*) ont été cultivés dans une chambre de croissance à environnement contrôlé (C.P.Fabien Inc., Montréal, Canada) à une température de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Un éclairage d'une intensité de $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ était fourni par une lampe Ceramalux[®] au sodium et au mercure (Philips Electronics Ltd., Scarborough, Canada) durant 14 heures, suivi de 10 heures d'obscurité.

Les feuilles d'épinards ont été achetées dans un marché local (Trois-Rivières).

3.2 Isolation des membranes de thylakoïdes de pois

Les membranes de thylakoïdes ont été isolées à partir de feuilles de pois vieilles de 10 jours selon la méthode définie par Bukhov *et al.* (59). Le culot contenant les membranes de thylakoïdes a été resuspendu dans un tampon contenant 20 mM Hepes-NaOH (pH 7.5), 10 mM NaCl et 2 mM MgCl_2 . La concentration en Chl de la suspension a été évaluée par la méthode de Porra *et al.* (94).

3.3 Isolation des membranes enrichies en PSI (lamelles du stroma)

Les fractions membranaires enrichies en photosystèmes I ont été isolées à partir d'épinard selon la méthode de Peters *et al.* (95) avec quelques modifications (96). La concentration en chlorophylle a été déterminée selon la méthode de Porra *et al.* (1989). Les thylakoïdes ont été suspendus dans un tampon contenant 20 mM tricine-KOH (pH 7.8), 250 mM sorbitol, 10 mM NaCl, 10 mM KCl et 5 mM MgCl_2 . L'échantillon à une concentration finale de 2 mg Chl/ml a été incubé à la noirceur pendant 30 minutes en présence de digitonine 0.2% (m/v). Les thylakoïdes ainsi traités ont alors été dilués par un facteur 3 dans le tampon de resuspension, puis centrifugés à $42\,000 \times g$ pendant 30

minutes pour précipiter les membranes non-solubilisées dans le détergent. Le surnageant obtenu a alors été centrifugé à 150 000 x g pendant 1 h. Le culot, qui contient les lamelles du stroma, a été resuspendu dans un tampon contenant 20 mM tricine-KOH (pH 7.8), 10 mM NaCl, 10 mM KCl et 5 mM MgCl₂, avant d'être congelé à -80°C jusqu'à son utilisation. Les fractions membranaires obtenues contiennent également le cytochrome b6f et la plastocyanine, mais sont dépourvues de PSII (62, 95).

3.4 Mesures d'induction de fluorescence

Les cinétiques d'induction de fluorescence des thylakoïdes ont été mesurées avec le Plant Efficiency Analyser (Hansatech, King' Lynn, Norfolk, UK). Les thylakoïdes ont été dilués à une concentration finale de 50 µg Chl/ml dans le tampon de resuspension dans une cellule cylindrique contenant un volume total de 4 mL. Les thylakoïdes adaptés à la noirceur ont été excités de façon saturante par une lumière actinique rouge (655 nm) obtenue par une série de diodes émettrices de lumière (DEL), pour une intensité totale de 3000 µE m⁻² s⁻¹. La fluorescence a été détectée par une barrette de photodiodes PIN après être passée par filtre rouge-lointain (« long-pass », 50% de transmission à 720 nm). Puisque le signal de fluorescence mesuré durant les premières 40 µs est dû à des artefacts de mesures causés par le temps de réponse de l'instrument, ces données n'ont pas été incluses dans l'analyse des courbes d'induction de fluorescence.

3.5 Analyse des courbes d'induction de fluorescence

Une analyse quantitative des courbes d'induction de fluorescence a été effectuée en décomposant les tracés en une série de trois cinétiques de premier ordre en utilisant l'algorithme de régression non-linéaire de Sigma Plot (SSI, Richmond, Californie, É-U) avec l'équation suivante :

$$F(t) = F_0 + A_{O-J} (1 - e^{-k_{O-J}t}) + A_{J-I} (1 - e^{-k_{J-I}t}) + A_{I-P} (1 - e^{-k_{I-P}t}) \quad (3.1)$$

où $F(t)$ est la fluorescence au temps t , F_0 est la fluorescence initiale, A_{O-J} , A_{J-I} et A_{I-P} sont les amplitudes, k_{O-J} , k_{J-I} et k_{I-P} sont les constantes de vitesses des phases O-J, J-I et I-P de l'induction de fluorescence.

Cette méthode d'analyse n'est qu'une reconstitution empirique des courbes d'induction de fluorescence qui ne prend pas en compte les événements physiques individuels qui se produisent dans les photosystèmes. Les fondements et utilisations de cette analyse ont été discutés plus en détails par Boisvert *et al.* (54).

3.6 Mesures des spectres de fluorescence

Les spectres d'émission de fluorescence à température de la pièce (298 K) et à basse température (77 K) ont été mesurés avec un spectrofluorimètre Perkin-Elmer LS55 équipé d'un photomultiplicateur R928 sensible à la portion rouge du spectre. La fluorescence chlorophyllienne a été excitée à 436 nm. Les fentes d'excitation et d'émission du fluorimètre étaient réglées à 5 et 2.5 nm, respectivement. Les spectres d'émission ont été corrigés en fonction de la sensibilité du photomultiplicateur en utilisant le spectre de correction fourni par Perkin-Elmer. La concentration finale en chlorophylles des échantillons était de 5 µg/mL. Les spectres à basse température ont été mesurés tel que décrit par Rajagopal *et al.* (97) en présence de 60% glycérol.

3.7 Mesures des changements d'absorption à 830 nm

La photooxydation du P700 a été mesurée par le changement d'absorption à 830 nm (ΔA_{830}) à l'aide d'un fluorimètre PAM (Pulse Amplitude Modulated Chl Fluorimeter de Walz) équipé d'une unité ED-P700DW. Une lumière actinique blanche de 4.6 W/m² pour les mesures avec le PAM a été obtenue d'une source lumineuse Fiber-Lite (Microview, Thornhill, ON, Canada) contrôlée par un obturateur électronique. Les changements d'intensité d'absorption ont été mesurés en utilisant le système d'acquisition de données DA100 de Walz. La concentration de chlorophylles était de 67 µg/mL et la cuvette utilisée avait un parcours optique de 1.065 mm. Toutes les mesures ont été effectuées en présence de l'accepteur d'électrons méthyl viologène à une concentration de 3 mM afin d'éviter la recombinaison du P700⁺ avec le côté accepteur du PSI.

3.8 Mesures de spectroscopie photoacoustique

Pour les mesures de photoacoustique (PA), des membranes enrichies en PSI ont été resuspendues à 250 µg Chl/mL dans le tampon de resuspension en présence de 5 mM ascorbate et 0.3 mM 2,6-dichlorophénolindophénol (DCIP), puis 150 µl ont été déposés sur un filtre de nitrocellulose (Millipore Corp., type AA, taille des pores de 0.8 µm) par une aspiration délicate du tampon. Le filtre a été coupé pour convenir aux dimensions requises pour son introduction dans la cellule de mesure du signal photoacoustique (MTEC Photoacoustic, Ames, Iowa, É.-U.). Les mesures de PA ont été effectuées à partir d'un spectromètre PA construit dans notre laboratoire (98). Pour obtenir une lumière d'excitation d'une longueur d'onde de 680 nm modulée à 35 Hz, le faisceau lumineux d'une lampe au xénon de 150 W (ILC Technology, Sunnyvale, Californie, É.-U.) passant par un monochromateur (Photon Technology International Inc., Brunswick, New Jersey, É.-U.) a été haché avec un modulateur mécanique. L'intensité lumineuse était contrôlée par des filtres de densité neutre. L'éclairage de fond saturant (150 W/m²) d'un projecteur KL 1500 (Walz, Effeltrich, Allemagne) a été utilisé pour oxyder complètement le P700, convertissant alors les centres réactionnels des PSI dans un état inactif.

3.9 Mesures effectuées en conditions anaérobiques

Pour les expériences effectuées dans des conditions anaérobiques, les échantillons ont été incubés 45 minutes à la noirceur en présence de 10 mM de glucose, 50 unités/mL de glucose oxidase et 1000 unités/mL de catalase.

CHAPITRE IV

KINETIC ANALYSES OF THE OJIP CHLOROPHYLL FLUORESCENCE RISE IN THYLAKOID MEMBRANES

Le contenu de ce chapitre fait l'objet d'une publication en 2005 dans le journal *Photosynthesis Research* : Joly, D., Bigras, C., Harnois, J., Govindachary, S. et Carpentier, R., Kinetic analyses of the OJIP chlorophyll fluorescence rise in thylakoid membranes, vol. 84: 107-112

4.1 Résumé

Le *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine (TMPD) a précédemment été utilisé pour étudier la cinétique de la montée de fluorescence OJIP de thylakoïdes. La présente étude a pour but d'élucider l'origine de l'atténuation et du retard de la phase I-P de l'induction de fluorescence induites par le TMPD. Pour y parvenir, nous avons analysé la cinétique de la montée de fluorescence O-J-I-P de thylakoïdes isolés pour lesquels le transport d'électrons a été modifié à l'aide de l'ascorbate, du méthyl viologen (MV), et du 2,5-dibromo-3-méthyl-6-isopropyl-*p*-benzoquinone (DBMIB). En absence de TMPD, la cinétique OJIP de l'induction de fluorescence (IF) n'a pas été altérée par l'ascorbate. Cependant, l'ascorbate a éliminé le retard de la phase I-P causé par les hautes concentrations de TMPD. D'autre part, ni l'ascorbate ni le DBMIB, qui bloque le largage des électrons du PSII au cytochrome b_6/f , n'a pu prévenir le quenching de la phase I-P causé par le TMPD. Dans les thylakoïdes contrôles, le MV a supprimé environ 60% de l'amplitude de la montée I-P de l'IF. Cet effet a été complètement annulé si le transfert d'électrons au MV était bloquée par le DBMIB, sauf si le TMPD était présent. Quand le TMPD a été utilisé pour intercepter le transport linéaire d'électrons en provenance du PSII, la ré-oxidation du TMPD par le photosystème I (PSI) et la réduction du MV a complètement aboli la phase I-P. Cette dernière observation est en accord avec le fait que le TMPD peut agir comme accepteur d'électrons du PSII. En présence de MV, la consommation d'O₂ activée par la lumière durant la réoxidation du TMPD par le PSI a contribué à un déclin rapide de la phase I-P de l'IF.

Kinetic analyses of the OJIP chlorophyll fluorescence rise in thylakoid membranes

David Joly, Caroline Bigras, Johanne Harnois, Sridharan Govindachary & Robert Carpentier*

*Groupe de Recherche en Biologie Végétale (GRBV), Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7; *Author for correspondence (e-mail: Robert.Carpentier@uqtr.ca; fax: +1-819-376-5057)*

Running head: Polyphasic rise of chlorophyll fluorescence in thylakoids

Article Type: Special issue of Photosynthesis Research (Post-Genomic Era)

Key words: Chlorophyll fluorescence, cytochrome *b₆f* complex, methyl viologen, photosystem, plastoquinone

Abbreviations: CCCP, carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone; Chl, chlorophyll; Cyt, cytochrome; DBMIB, 2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-p-benzoquinone; FeCN, ferricyanide; FI, fluorescence induction; MV, methyl viologen; PQ, plastoquinone; PS, photosystem; Q_A and Q_B, primary and secondary quinone acceptors of photosystem II; TMPD, *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine

4.2 Abstract

N,N,N',N'-tetramethyl-*p*-phenylenediamine (TMPD) was previously used to study the kinetics of the OJIP chlorophyll fluorescence rise. The present study is an attempt to elucidate the origin of TMPD-induced delay and quenching of the I-P step of fluorescence rise. For this purpose, we analyzed the kinetics of OJIP rise in thylakoid membranes in which electron transport was modified using ascorbate, methyl viologen (MV), and 2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-*p*-benzoquinone (DBMIB). In the absence of TMPD, the OJIP kinetics of fluorescence induction (FI) was not altered by ascorbate. However, ascorbate eliminated the I-P rise delay caused by high concentrations of TMPD. On the other hand, neither ascorbate nor DBMIB, which blocks the electron release from photosystem (PSII) at the cytochrome *b₆/f* complex, could prevent the quenching of I-P rise by TMPD. In control thylakoids, MV suppressed the I-P rise of FI by about 60%. This latter effect was completely removed if the electron donation to MV was blocked by DBMIB unless TMPD was present. When TMPD intercepted the linear electron flow from PSII, re-oxidation of TMPD by photosystem I (PSI) and reduction of MV fully abolished the I-P rise. The above is in agreement with the fact that TMPD can act as an electron acceptor for PSII. With MV, the active light-driven uptake of O₂ during re-oxidation of TMPD by PSI contributes towards an early decline in the I-P step of the OJIP fluorescence rise.

4.3 Introduction

The most important milestone in the history of photosynthesis research is the discovery of the close correlation between light reactions in photosynthetic tissues and chlorophyll *a* (Chl *a*) fluorescence. Since then, extensive applications of the latter non-invasive technique to study the light-induced electron transfer in the multi-protein pigment complexes led to the development of various functional models of photosystem II (PSII) (For recent reviews, see Schreiber 2002; Lazár 2003). Chl fluorescence yield measured as a function of time in photosynthetic tissues kept under continuous light is referred to as fluorescence induction (FI) (Kautsky and Hirsch 1931). When dark-adapted photosynthetic samples are excited with light, the basal level of fluorescence, *F_o*

(O) that represents the excitation energy emitted as fluorescence before reaching the reaction centers in their open state, rises to its maximum level, Fm (P), that corresponds to the closed state of PSII. This fluorescence rise from O- to P-level passes through two intermediate steps J (I₁) and I (I₂), respectively (Neubauer and Schreiber 1987; Schreiber and Neubauer 1987; Strasser and Govindjee 1992) occurring at specific time points upon excitation with continuous light (Strasser *et al.* 1995). The O-J rise is completed within the first 2 ms after the onset of continuous light, while the J-I rise occurs within 30 ms (Lazár 2003). The P-step of fluorescence rise is seen only after a hundred to several hundred ms depending on the nature of samples and the intensity of excitation light (Strasser *et al.* 1995; Lazár 2003).

Evidence emerged from theoretical simulations of fluorescence transients suggests the accumulation of specific redox states of the intermediate electron carriers of PSII at J-, I-, and P-steps during the reduction of PQ by electrons arriving from the oxygen-evolving complex (OEC) (Lazár 2003). Amongst several explanations offered for the functional correlation of each step, it is explicit that the O-J phase of fluorescence rise corresponds to the photochemical reduction of Q_A (Delosme 1967). On the other, the functional assignment proposed for J-I and I-P kinetic phases remains debatable and still elusive since the forward electron transfer from Q_A to Q_B proceeds with a $t_{1/2}$ of 200–400 μ s and the time constant for the binding of faster reducible PQ at the Q_B pocket is $\sim$ 2–4 ms (Crofts and Wraight 1983; Bukhov *et al.* 2003, and ref. therein).

The OJIP type of fluorescence rise is a unique phenomenon in algae and leaves as shown by in vivo measurements. The fluorescence rise kinetics of isolated thylakoids or PSII membranes is usually biphasic owing to the absence of an apparent I-step rise. Recently it has been shown that this I-step of Chl *a* fluorescence rise in thylakoid membrane preparations can be restored by the addition of *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine (TMPD) (Bukhov *et al.* 2003). Despite TMPD evokes a clear separation of O-J, J-I, and I-P phases respectively, the kinetics of such fluorescence rise is arguably distinct and highly complex (Bukhov *et al.* 2003). Strikingly, higher concentrations of this redox agent strongly quench the rise kinetics of J-I-P phase. In the presence of a low concentration of inhibitors such as diuron or stigmatellin, or

carbonylcyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) that weakly impairs the electron transport beyond Q_A , the J-level fluorescence quenching caused by TMPD is reversed. In such samples, the amplitude of J-level fluorescence yield parallels the I-level rise (Bukhov *et al.* 2004), while a marked decline in the amplitude of I-P rise elicited by TMPD is not changed significantly. We note that in these studies, the influence of photosystem I (PSI) activity on the OJIP kinetics of fluorescence rise was not considered. The above warrants a closer examination of how TMPD affects the I-P step of fluorescence.

This short communication mainly focuses on unraveling the perceptible origin of the TMPD-induced delay and quenching of the I-P rise. For this purpose, we modified the electron transfer reactions using MV, ascorbate, or DBMIB (an inhibitor of the cytochrome *b₆/f* complex). The significance of the changes in the kinetics of fluorescence rise brought out by these agents will be discussed in detail.

4.4 Materials and methods

4.4.1 Isolation of thylakoids and Chl *a* fluorescence induction measurements

Isolation of thylakoid membranes from freshly harvested leaves of pea (*Pisum sativum* L.) plants and the estimation of the chl content were carried out as described in Bukhov *et al.* (2003). Before FI measurements, thylakoids were diluted to 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ in a buffer containing 20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 10 mM NaCl and 2 mM MgCl_2 . DBMIB was dissolved in ethanol (0.8%, v/v). Plant Efficiency Analyser (Hansatech, King' Lynn, Norfolk, UK) was used to measure the fluorescence rise in thylakoids suspended in a total volume of 4 mL in the measurement vial placed inside the sample holder. Then the dark-adapted thylakoids were excited with saturating red actinic light (peaking at >655 nm and intensity of $4000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) provided by light emitting diodes. As the fluorescence signal during the first 40 μs is ascribed for the artifacts due to delay in the response time of the instrument, these data were not included in the analyses of FI curves.

4.5 Results and discussion

Within the framework of the present study, it is essential to mention that perturbations in the electron transfer reactions on the donor or acceptor side of PSII markedly alters the kinetics of fluorescence rise. These pronounced changes in the amplitudes and rates are not limited to a specific phase of FI transient as shown in recent communications from this laboratory (Bukhov *et al.* 2003; Bukhov *et al.* 2004). Therefore, the interpretations of the experimental data discussed below mainly concerns with the quenching of the I-P rise of fluorescence caused by higher concentration of TMPD.

Figure 4.1A shows the FI curves of intact pea leaves (trace 1) and thylakoids (trace 2). The time-course of the fluorescence yield in intact leaves plotted on a logarithmic scale clearly shows the separation of the O-J, J-I, and I-P phases at the time points 1-2, 10-20, and 200-400 ms, respectively, whereas in thylakoids the inflection point at I-step is not observed (Fig. 4.1A, trace 2). The J-level fluorescence yield in dark-adapted intact leaves or thylakoids shown in traces 1 & 2 of Fig. 4.1A is ascribed for a series of complex events involving the faster electron transfer processes at the PSII donor side and/or related quenching mechanisms and the reduction of Q_A . Notably, the fluorescence yield at J-step also depends on the oxidation kinetics of Q_A^- and perhaps the reduction of the fast PQ pool as mentioned earlier. On the other hand, the yield of fluorescence at I-step corresponds to the accumulation of the PSII centers in $Q_A^-Q_B^-$ and also $Q_A^-Q_B^{2-}$ states (Tomek *et al.* 2001). TMPD at a concentration of about 20 μ M, which is only half of that used by Bukhov *et al.* (2003), is sufficient to increase the J-step fluorescence yield and restore the I-peak in such thylakoids (Fig. 4.1A, traces 2 & 3). This effect is solely explained by the retarded reduction of the PQ pool as evident from the enhanced fraction of PSII centers in $Q_A^-Q_B^-$ and $Q_A^-Q_B^{2-}$ states as mentioned below.

The I-P rise shown in Fig. 4.1A (traces 1 and 2) corresponds to the contributions from the complete reduction of the granal and stromal PQ pools. In the case of leaves, the I-P rise of FI was completed much before 400 ms (Fig. 4.1A trace 1). However, in isolated thylakoids, the appearance of P-step rise was delayed by about >200 ms (Fig. 4.1A, trace 2). TMPD at a concentration of 20 μ M retarded further the I-P rise kinetics

by several hundreds of ms (Fig. 4.1A, trace 3) suggesting a stronger disruption in the oxidation/reduction kinetics of PQ and therefore, the oxidation of Q_A^- (Force *et al.* 2003). At higher concentration, TMPD (100 μ M) decreased the amplitude of the I-, and P-steps fluorescence yield (Fig. 4.1A, trace 4).

Fig. 4.1B shows the FI curves of thylakoids incubated with ascorbate (1 mM) in order to keep TMPD in its reduced state. Addition of ascorbate alone did not alter the kinetics of the OJIP rise in control thylakoid samples (Fig. 4.1B, traces 1 & 2). Hence, the redox state of Q_A and PQ is not affected by ascorbate. Interestingly, the dip following the I-step fluorescence rise seen with TMPD alone (Fig 3.1B, trace 3) could be completely eliminated when TMPD was reduced by ascorbate (Fig 3.1B, trace 4). Further, the fluorescence yield corresponding to P-level was reached much before 500 ms following the onset of excitation light (Fig. 4.1B, trace 4) owing to the removal of the I-P rise delay caused by oxidized TMPD. Yet, the quenching of I-P rise was not restored by the reduced state of TMPD.

In order to find a correlation between the redox state of PQ and the appreciable loss in the amplitude of I-P phase, the electron transport beyond Cyt b_6/f complex was blocked with DBMIB. This rationale permits the accumulation of reduced PQ as DBMIB prevents its re-oxidation that proceeds with a half-time of about 20 ms (Schansker *et al.* 2003) and impairs the electron transfer to PSI centers. About 0.2 μ M DBMIB was sufficient to block the re-oxidation of PQ in control thylakoid samples as assessed by a small increase in the J-step fluorescence yield that corresponds to a decreased re-oxidation of Q_A^- (Fig. 4.2A, traces 1 & 2). This low concentration of DBMIB did not quench the I-P rise non-photochemically (data not shown). Importantly, we exercised enough caution to avoid DBMIB elicited redox reactions. The kinetics of I-P step rise in control thylakoid samples was not significantly changed by DBMIB. When DBMIB was used together with 100 μ M TMPD, the J-step fluorescence yield increased slightly compared to TMPD alone (Fig. 4.2A, compare traces 3 & 4). However, the quenching of I-P rise caused by TMPD was not affected by DBMIB. This is attributable to the ability of TMPD to accept electrons from PSII and to donate electrons to PSI bypassing the Cyt b_6/f complex (see Bukhov *et al.* 2003 and ref. therein).

The polyphasic nature of the OJIP fluorescence induction curve is strongly influenced by the oxidation-reduction kinetics of P700, the primary electron donor of PSI. Indeed, a progressive increase in the amplitude of the J-step rise, an indicator of the accumulation of reduced Q_A , was strongly correlated with a gradual decline in the amplitude of the fast phase of P700 reduction (Bukhov *et al.* 2004). Besides, about 85% of the PQ pool reducible within the first 20 ms (the time-scale of the appearance of I-peak) following illumination with a saturating white pulse is readily available for P700⁺ reduction (Schreiber 2002). It is clear from Fig. 4.2B (traces 1 & 2) that MV, which eliminates the PSI acceptor side limitation, strongly decreased the fluorescence yield corresponding to the time-points of I-P step (>20 ms) of FI curve (Neubauer and Schreiber 1987). Notably, MV retarded the kinetics of P-step rise by more than two fold and suppressed the I-P phase by 65% owing to the activation of electron flow. This interpretation is consistent with the observation that DBMIB completely restored the OJIP kinetics as the electron efflux from PSII is curtailed (Fig. 4.2B, trace 3). On the other hand, the amplitude of the I-P phase was strongly diminished if TMPD was added together with MV, (Fig. 4.2B, trace 4). This I-P quenching was only slightly recovered by blocking Cyt *b₆/f* complex with DBMIB (Fig. 4.2B, trace 5). The above strongly suggests an enhanced electron donation to PSI centers mediated by TMPD. Evidently, these findings reinforce our earlier suggestion that the premature decline in the I-P step of fluorescence rise observed with TMPD used in combination with MV (Fig. 4.2B, traces 4 and 5) is related to an enhanced O₂ uptake yield during light-driven oxidation of TMPD and reduction of MV by PSI (Bukhov *et al.* 2003).

The most important finding of the present study is the clear demonstration of a close relationship between the increased PSI electron transport and TMPD induced quenching of the I-P phase of the fluorescence rise. We note that this conclusion is not consistent with the recent model proposed by Vredenberg and Bulychhev (2002), which suggests that the slow phase (I-P rise) of the fluorescence rise parallels the electrogenic events generated by PSI. This is based on the fact that the thylakoid samples used in the present study were not subjected to any additional treatment that could interfere with the functional properties of the photosystems operating in series. The stimulation of PSI activity with MV did not recover the I-P rise. Instead, the amplitude of the I-P phase

declined sharply owing to the light-driven uptake of O₂, which is in agreement with previous observations (Neubauer and Schreiber 1987; Hormann *et al.* 1994).

4.6 Acknowledgements

This work was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

4.7 References

- Bukhov NG, Egorova EA, Govindachary S and 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.
- Bukhov NG, Govindachary S, Egorova EA, Joly D and 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.
- Crofts AR and Wraight CA (1983) The electrochemical domain of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 726: 149-185.
- Delosme R (1967) Étude de l'induction de fluorescence des algues vertes et des chloroplastes au début d'une illumination intense. *Biochim. Biophys. Acta* 143: 108-128.
- Force L, Critchley C and van Rensen JJS (2003) New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants. *Photosynth. Res.* 78: 17-33.
- Hormann H, Neubauer C and Schreiber U (1994) On the relationship between chlorophyll fluorescence quenching and the quantum yield of electron transport in isolated thylakoids. *Photosynth. Res.* 40: 93-106.
- Kautsky H and Hirsch A (1931) Neue versuche zur kohlenfäure-assimilation. *Naturwissenschaften* 19: 964.
- Lazar D (2003) Chlorophyll *a* Fluorescence Rise Induced by High Light Illumination of Dark-adapted Plant Tissue Studied by Means of a Model of Photosystem II and Considering Photosystem II Heterogeneity. *J. Theor. Biol.* 220: 469-503.

- Neubauer C and Schreiber U (1987) The polyphasic rise of chlorophyll fluorescence upon onset of strong continuous illumination. I. Saturation characteristics and partial control by the photosystem II acceptor side. *Z Naturforsch* 42c: 1246-1254.
- Schansker G, Srivastava A, Govindjee and Strasser RJ (2003) Characterization of the 820-nm transmission signal paralleling the chlorophyll a fluorescence rise (OJIP) in pea leaves. *Funct. Plant Biology* 30: 785-796.
- Schreiber U (2002) Assessment of maximal fluorescence yield: Donor-side dependent quenching and QB-Quenching. In: Kooten Ov and Snel JF (eds) *Plant Spectrofluorometry: Applications and Basic Research*, pp 23-47. Rozenberg, Amsterdam
- Schreiber U and Neubauer C (1987) The polyphasic rise of chlorophyll fluorescence upon onset of strong continuous illumination: partial control by the photosystem II donor side and possible ways of interpretation. *Z. Naturforsch.* 42c: 1255-1264.
- Strasser RJ and Govindjee (1992) On the O-J-I-P fluorescence transients in leaves and D1 mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. In: Murata N (ed) *Research in Photosynthesis*, pp 23-32. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Strasser RJ, Srivastava A and Govindjee (1995) Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochem. Photobiol.* 61: 32-42.
- Tomek P, Lazar D, Ilik P and Naus J (2001) On the intermediate steps between the O and P steps in chlorophyll a fluorescence rise measured at different intensities of exciting light. *Aust. J. Plant Physiol.* 28: 1151-1160.
- Vredenberg WJ and Bulychev AA (2002) Photo-electrochemical control of photosystem II chlorophyll fluorescence in vivo. *Bioelectrochemistry* 57: 123-128.

4.8 Figure legends:

Figure 4.1 : Original traces of Chl fluorescence: (A) in intact leaves (1) and in thylakoids without additive (2) or in the presence of 20 μM (3) or 100 μM (4) of TMPD, respectively, and (B) in thylakoids without additive (1) or in the presence of 1mM ascorbate (2), 100 μM TMPD (3), or 100 μM TMPD reduced by 1 mM ascorbate (4), respectively.

Figure 4.2 : Original traces of Chl fluorescence: (A) in thylakoids without additive (1) or in the presence of 0.2 μM DBMIB (2), 100 μM TMPD (3), or 0.2 μM DBMIB and 100 μM TMPD (4), respectively, and (B) in thylakoids without additive (1) or in the presence of 150 μM MV (2), 150 μM MV and 0.2 μM DBMIB (3), 150 μM MV and 100 μM TMPD (4), and 150 μM MV, 100 μM TMPD, and 0.2 μM DBMIB (5), respectively.

Figure 4.1

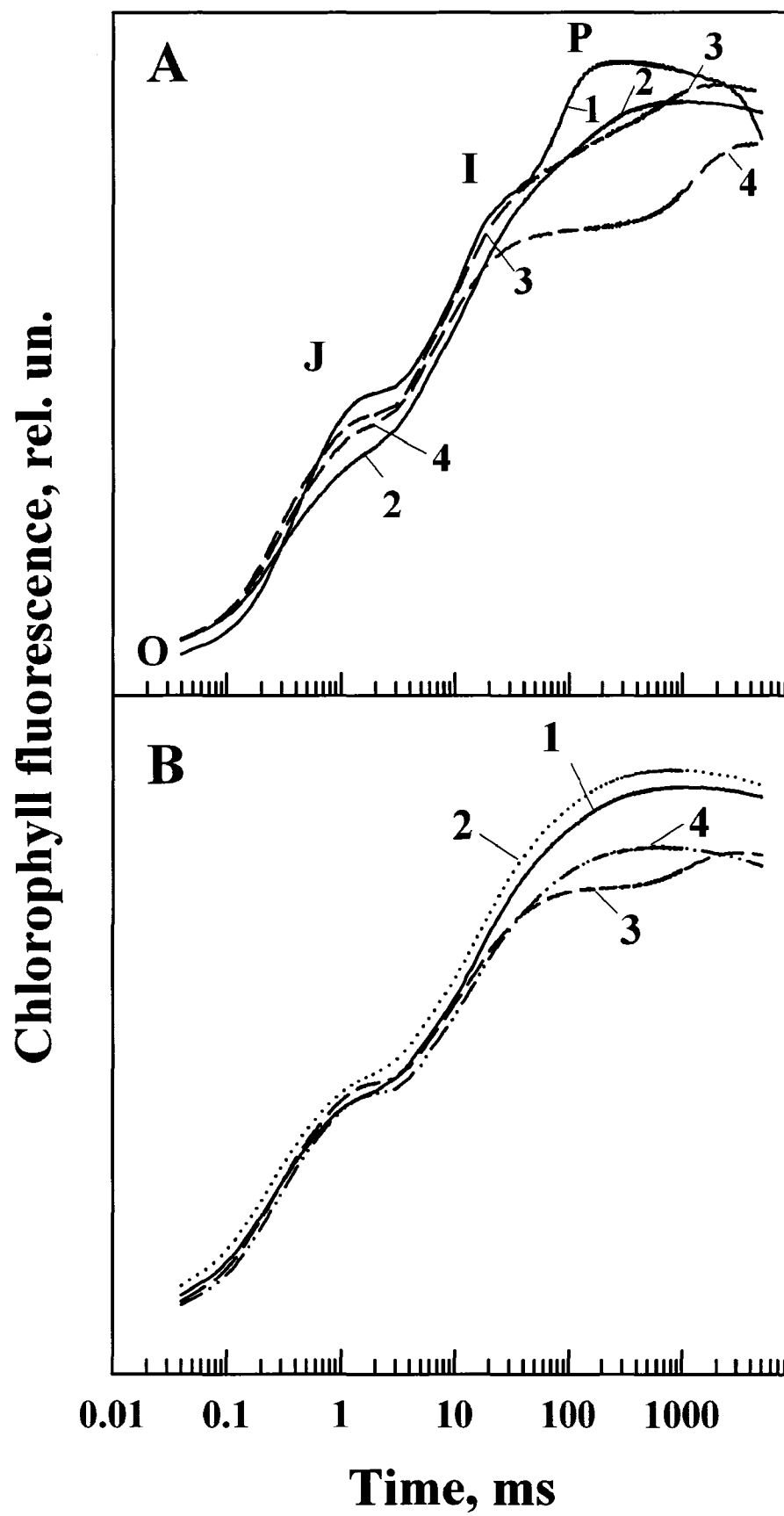
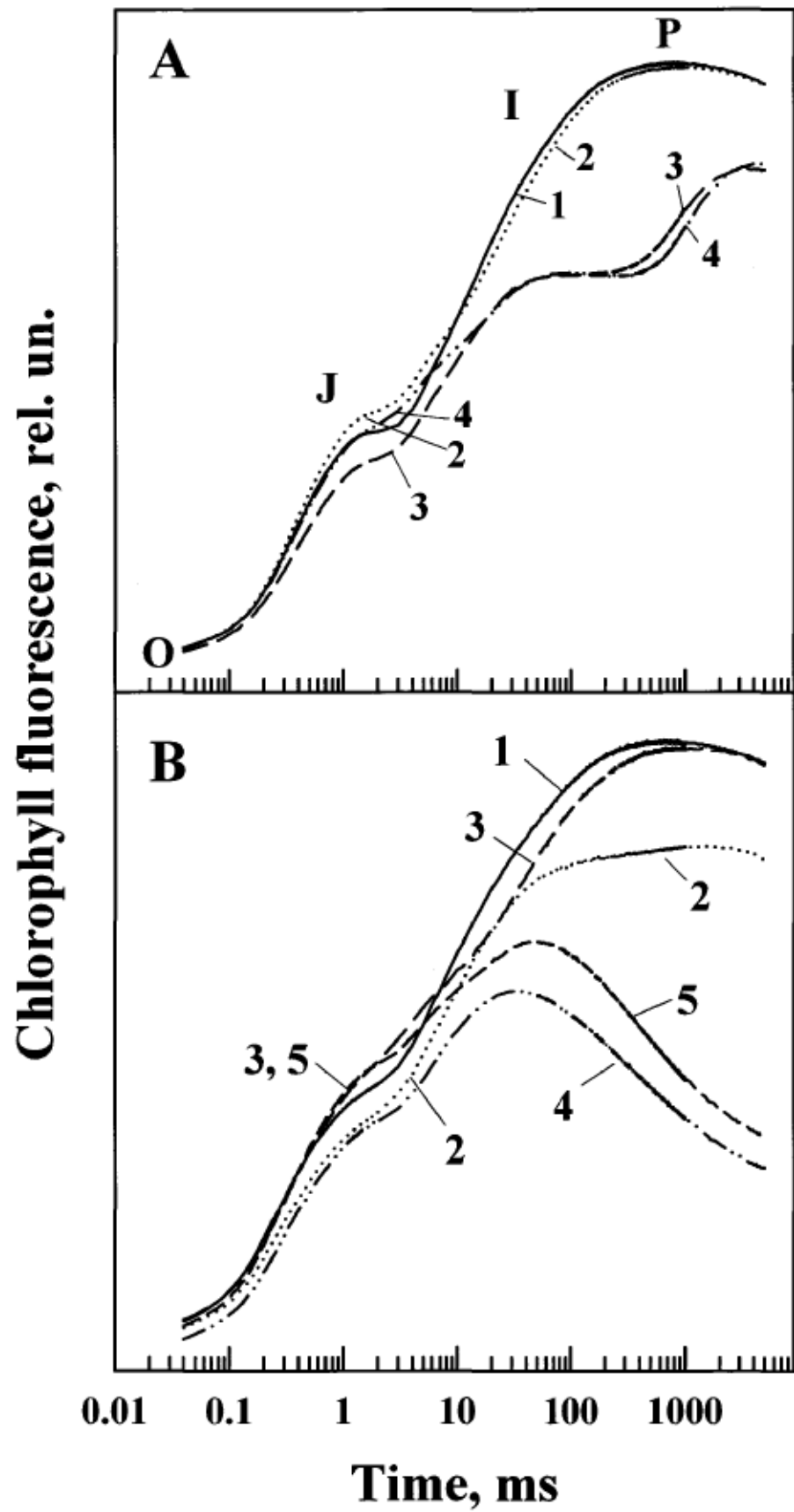


Figure 4.2



CHAPITRE V

**THE OXIDATION/REDUCTION KINETICS OF THE
PLASTOQUINONE POOL CONTROLS THE APPEARANCE OF
THE I-PEAK IN THE O-J-I-P CHLOROPHYLL FLUORESCENCE
RISE: EFFECTS OF VARIOUS ELECTRON ACCEPTORS**

Le contenu de ce chapitre a été soumis pour publication en 2006 au journal *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* : Joly, D. et Carpentier, R., The oxidation/reduction kinetics of the plastoquinone pool controls the appearance of the I-peak in the O-J-I-P chlorophyll fluorescence rise: effects of various electron acceptors.

5.1 Résumé

Une analyse quantitative de l'induction de fluorescence (IF) a été utilisée dans la présente étude pour élucider les effets complexes du *N,N,N',N'*-tetraméthyl-*p*-phenylenediamine (TMPD) sur les thylakoïdes. Les molécules de TMPD réduites, responsables de l'effet d'agent ADRY, ont causé une augmentation de l'amplitude de la phase O-J. Seules les molécules de TMPD oxydées ont montré une capacité de se lier au site Q_B du photosystème II (PSII). D'autre part, la montée I-P a été retardée proportionnellement à la concentration de TMPD ajoutée, causant ainsi l'apparition claire du pic I. Alors que le TMPD était le seul agent rédox connu jusqu'à maintenant pour avoir cette propriété, cet étude montre que d'autres accepteurs artificiels d'électrons du PSII, tels le silicomolybdate, le 2,5-dichloro-*p*-benzoquinone et le phenyl-*p*-benzoquinone, ont un effet similaire. Les résultats montrent le rôle majeur de la cinétique d'oxydation/réduction du pool de PQ dans la séparation des phases J-I et I-P de l'IF des thylakoïdes.

The oxidation/reduction kinetics of the plastoquinone pool controls the appearance of the I-peak in the O-J-I-P chlorophyll fluorescence rise: effects of various electron acceptors

David Joly and Robert Carpentier*

*Groupe de Recherche en Biologie Végétale (GRBV), Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7; *Author for correspondence (e-mail: Robert.Carpentier@uqtr.ca; fax: +1-819-376-5057)*

Key words: Chlorophyll fluorescence; Photosystem II; Electron acceptors; Plastoquinone; Thylakoid

Abbreviations: A_{O-J} , A_{J-I} , and A_{I-P} , amplitude of O-J, J-I, and I-P phase, respectively; ADRY, accelerator of the deactivation reactions; Asc, Ascorbate; BQ, benzoquinone; CCCP, carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazine; Chl, chlorophyll; Cyt, cytochrome; DBMIB, dibromothymoquinone; DCBQ, 2,5-dichloro-*p*-benzoquinone; DCMU, 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea; dPQ, decylplastoquinone; DQ, duroquinone; $E_{1/2}$, midpoint redox potential; F_0 , initial fluorescence; F_m , maximal fluorescence level; Fd, ferredoxin; FI, fluorescence induction; MCBQ, monochloro-*p*-benzoquinone; MBQ, 2-methyl-*p*-benzoquinone; MV, methylviologen; NPQ, non-photochemical quenching; OEC, oxygen evolving complex; *p*BQ, 1,4-*p*-benzoquinone; phe-BQ, phenyl-*p*-benzoquinone; PQ, plastoquinone; PS, photosystem; Q_A and Q_B , primary and secondary quinone acceptors of photosystem II; SiMo, silicomolybdate; $t_{1/2}$ O-J, $t_{1/2}$ J-I, and $t_{1/2}$ I-P, half-times of O-J, J-I, and I-P phase, respectively; TMPD, *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine;

5.2 Abstract

Quantitative analysis of the fluorescence induction (FI) rise was used in this study to elucidate the complex effects of *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine (TMPD) on thylakoids. Reduced TMPD molecules, responsible for the ADRY agent effect, caused an increase in the amplitude of the O-J rise. Also, only oxidized TMPD molecules were shown to have the ability to bind the Q_B pocket of photosystem II (PSII). On the other hand, the I-P rise was slowed in proportion with the oxidized TMPD concentration, inducing the clear appearance of the I-peak. While this property was previously thought to be unique to TMPD, this study shows that some artificial electron acceptors of PSII, silicomolybdate, 2,5-dichloro-*p*-benzoquinone, and phenyl-*p*-benzoquinone, have a similar effect. These results demonstrated a major role of the oxido-reduction kinetics of the PQ-pool in the resolution of J-I and I-P phases in the FI of isolated thylakoids.

5.3 Introduction

In the last decades, chlorophyll (Chl) a fluorescence induction (FI) has been widely used to probe the activity and integrity of photosynthetic materials [1,2]. Indeed, this method is highly sensitive to any change in electron transfer reactions on both donor [3-7] and acceptor side of photosystem II (PSII) [8-12]. Upon the onset of strong actinic light, the increase in Chl fluorescence of intact dark-adapted photosynthetic materials follows a triphasic kinetic from its original level (F_o or O) to its maximal level (F_m or P), passing through two intermediate steps (J and I) [2]. While the exact trace of FI is highly dependant on the nature of the material used and on the characteristics of the light source, each step of FI occurs at specific time point of the kinetic. The O-J rise is completed within the first 2 ms after the beginning of the illumination while the I step is seen within 30 ms [10,13]. The maximal level of fluorescence is then reached with the I-P rise in several hundreds of ms [10,13].

F_0 is known to represent the excitons dissipated as fluorescence before they reach the fully open reaction centers [14,15]. On the other hand, the F_m level corresponds to the fully closed state of PSII [1]. According to experimental evidences and theoretical simulations, the polyphasic fluorescence rise between F_0 and F_m parallels the progressive reduction of specific electron transfer intermediates in PSII [1,11,13,16-18]. Most of the studies agree that the O-J phase corresponds to the photochemical reduction of the primary quinone electron acceptor of PSII (Q_A) [8,9,19]. The redox state of the Mn-cluster in the oxygen evolving complex (OEC) was also shown to affect the Chl fluorescence yield at J-step, since S_2 and S_3 act as Chl fluorescence quenchers [3,5,7]. However, the exact origin of J-I and I-P phases is still under debate [2,5,20,21]. It was reported that membrane potential changes could affect J-I [22] and I-P rises [23]. Also, quinone molecules in their oxidized state, in opposition to their reduced form, are known to be efficient static quenchers of Chl excited states [17,24-26]. Consequently, several authors proposed that J-I or I-P phases should reflect the removal of the non-photochemical quenching (NPQ) exerted by oxidized plastoquinone (PQ) molecules during their reduction by PSII [20,27]. Some suggested that J-I and I-P phases represent the reduction of two different PQ pools [10,28,29], while the secondary quinone acceptor of PSII (Q_B) redox state was proposed to be reflected during the J-I rise [8,9,16].

An important limitation in FI studies comes from the fact that the I-step is clearly observed only in intact photosynthetic materials [30,31]. The fluorescence rise was reported as biphasic in PSII submembrane fractions and the I-step is not seen in isolated thylakoids, even though the triphasic behavior has been demonstrated [20,22,27]. However, Bukhov *et al.* [32] were able to restore a well-resolved I-peak in isolated thylakoids by a treatment with the redox compound *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine (TMPD). Nonetheless, the effect of TMPD on thylakoids was shown to be complex and the reason for the appearance of a I-peak in the presence of TMPD is not fully understood [3,33,34].

Another major issue is caused by the use of only qualitative analysis of FI traces in most of the studies [1,33,35]. Visual comparison of FI traces obtained from untreated and treated photosynthetic samples permits the detection of only major changes, while minor but important changes in the fluorescence rises are neglected. Pospisil and Dau [22,27] proposed a simple quantitative analysis to rule out this problem. They approximated the experimental FI traces of isolated thylakoids by the sum of three first-order kinetics, corresponding to the three phases of the O-J-I-P rise. Boisvert *et al.* [20] used the same method to elucidate the origin of each kinetic step. They found new evidence indicating that only the I-P rise is directly related to the reduction of the PQ pool, while J-I seemed related to the full closure of PSII RC or to a Q_B -quenching mechanism. These new findings about FI, combined with a recent report about the detailed effects of TMPD on thylakoids evaluated with thermoluminescence [34], accentuated the need for a reassessment of the effects of TMPD on the FI of thylakoids membranes.

In the present study, we have evaluated quantitatively the modifications of FI caused by TMPD and their dependence on TMPD redox state. The results show an effect of reduced TMPD on the O-J rise, related to its ADRY agent behavior, and a retardation of I-P rise proportional to the concentration of oxidized TMPD. On the other hand, the J-I rise is only slightly affected by TMPD. Interestingly, other artificial PSII electron acceptors were found to exert a similar influence on the fluorescence rise of thylakoids. The results are discussed in terms of the importance of the reduction and oxidation kinetics of the PQ pool for the appearance of a I-peak in the O-J-I-P fluorescence rise.

5.4 Materials and methods

5.4.1 Isolation of thylakoids and Chl *a* fluorescence induction measurements

Isolation of thylakoid membranes from freshly harvested leaves of pea (*Pisum sativum* L.) plants was carried out as described by Joly et al [33]. Chlorophyll concentration was calculated following the procedure outlined in [36]. Before FI measurements, thylakoids were diluted to 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ in a buffer containing 20 mM

HEPES-NaOH (pH 7.5), 10 mM NaCl and 2 mM MgCl₂. Plant Efficiency Analyser (Hansatech, King' Lynn, Norfolk, UK) was used to measure the fluorescence rise in thylakoids suspended in a total volume of 4 mL in the measurement vial placed inside the sample holder. Ethanol concentration was kept below 0.8% (v/v) for all measurements. Dark-adapted thylakoids were excited with saturating red actinic light from an array of 655 nm light-emitting diodes at an intensity of 3000 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Fluorescence was detected using a PIN-photodiode after passing through a long-pass filter (50% transmission at 720 nm). As the fluorescence signal during the first 40 μs is ascribed for artifacts due to delay in response time of the instrument, these data were not included in analyses of FI traces.

5.4.2 Data analysis

For quantitative analysis, FI traces were fitted with the sum of three first order kinetics by non-linear regression using Sigma Plot (SSI, Richmond, California, USA):

$$F(t) = F_0 + A_{O-J} \left(1 - e^{-k_{O-J}t}\right) + A_{J-I} \left(1 - e^{-k_{J-I}t}\right) + A_{I-P} \left(1 - e^{-k_{I-P}t}\right)$$

where $F(t)$ is the fluorescence at time t , F_0 is the initial fluorescence, A_{O-J} , A_{J-I} and A_{I-P} are the amplitudes, k_{O-J} , k_{J-I} and k_{I-P} are the rate constants of the O-J, J-I and I-P steps of the fluorescence transient.

5.5 Results

A quantitative analysis of the OJIP fluorescence rise was performed in thylakoid membranes isolated from pea. Pospisil and Dau [22] and recently Boisvert *et al.* [20] showed that the fluorescence rise is well-fitted with the sum of three exponential rises, corresponding to the O-J, J-I, and I-P phases of the FI trace. A similar quality of fitting was obtained in the present study. The quantitative analysis used in this work provides information about the importance (amplitude) and the kinetics (half-times or rate constants) of each phase of the fluorescence rise. Values obtained from control traces such as presented in Fig. 5.1A (trace 1) are shown in Table 5.1. O-J and J-I phases had a

similar amplitudes of $38 \pm 5 \%$ and 41 ± 5 , respectively, while the I-P phase represented $21 \pm 2 \%$ of the variable fluorescence. Also, all the phases were kinetically well-separated, with half-times of 0.21 ± 0.03 ms, 8.8 ± 0.9 ms, and 56 ± 5 ms for O-J, J-I, and I-P, respectively. These values are quite similar to the results found by Boisvert *et al.* for spinach thylakoids [20].

Fig. 5.1A shows the effects of various concentrations of TMPD on FI traces of pea thylakoids. As reported earlier, 20-40 μ M of TMPD are sufficient to induce the segregation of I and P peaks [32]. Increasing furthermore the concentration of TMPD leads to the quenching of J-I-P rise (Fig. 5.1A, trace 5). Quantitative analysis of the effects of TMPD on the amplitudes and half-times of each phases are provided in Fig. 5.1B and Fig. 5.1C, respectively. A_{O-J} was raised by about 20-25% when treated with 25 μ M of TMPD or less, while A_{J-I} was only slightly affected by the same treatment. In contrast, A_{I-P} was decreased by about 35-40 % within the first 25 μ M of TMPD and then remained quite stable at higher concentrations. The I-P phase was also slowed in proportion with TMPD concentration. With 100 μ M of TMPD, $t_{1/2 I-P}$ was increased by a factor of 10. Conversely, $t_{1/2 O-J}$ and $t_{1/2 J-I}$ were not significantly affected by TMPD.

The dependence of the effect of TMPD on its redox state is shown in Fig. 5.2 and analyzed quantitatively in Fig. 5.3. For these experiments, a low and a high concentration of TMPD, 2.5 μ M and 100 μ M, were reduced by 1 mM of ascorbate (Asc). Asc alone had no significant effect on the FI traces (compare traces 1 and 2 of Fig. 5.2) or on any amplitude or half-times of untreated thylakoids (Fig. 5.3). Reduction of TMPD by Asc was not able to remove the quenching of I-P at both 2.5 and 100 μ M. Also, the small increase in A_{O-J} in the presence of low concentrations of TMPD was unaffected by its reduction by Asc. However, the increase in $t_{1/2 I-P}$ in the presence of equivalent concentrations of TMPD shown in Fig. 5.1 was completely inhibited in the presence of Asc.

Other PSII electron acceptors were found to initiate the separation of J-I and I-P phases in thylakoids, as it is the case for TMPD. Among them, 40 μ M of

silicomolybdate (SiMo) quenched the F_v rise and was able to make the I-peak resolved (Fig. 5.4, trace 2). Similar to TMPD, quantitative analysis showed that the effect of SiMo was mainly to decrease A_{I-P} by about 60% and to increase $t_{1/2 I-P}$ by a factor of about 14 (Fig. 5.5). The amplitudes and half-times of O-J and J-I phases were not significantly or only slightly altered by the presence of 40 μ M SiMo. 10 μ M of 2,5-dichloro-*p*-benzoquinone (DCBQ) or 10 μ M of phenyl-*p*-benzoquinone (phe-BQ) also made the I-peak visible (Fig. 5.4, traces 3 and 4). In opposition to TMPD and SiMo, DCBQ and phe-BQ did not decrease the amplitude of I-P rise, even if they increased $t_{1/2 I-P}$ by about 10 times (Fig. 5.5). Also, DCBQ and phe-BQ decreased A_{O-J} by around 20-25%, while they increased $t_{1/2 O-J}$ by 35% and 80%, respectively. Moreover, phe-BQ slowed the J-I rise by 35%. On the other hand, another benzoquinone (BQ) known as a good electron acceptor of PSII, duroquinone (DQ), was not efficient in provoking the I-peak appearance (Fig. 5.4, trace 5). Addition of 1 μ M DQ decreased A_{I-P} by about 60% (Fig. 5.5) and only slightly affected $t_{1/2 I-P}$. A_{O-J} was decreased by about 10%, while other parameters were not significantly affected. Higher concentrations of DQ lead to a general decrease in the amplitude of all phases, owing to the ability of DQ to quench Chl fluorescence [37]. The impact of some other BQ on FI was also verified. 1,4-*p*-benzoquinone (*p*BQ) and 2-methyl-*p*-benzoquinone (MBQ) were found to have an effect on FI much similar to DQ, while monochloro-*p*-benzoquinone (MCBQ) behaved like DCBQ (not shown). It should be noted that the substituted quinones did not quench the basic level of fluorescence, F_o , at the low concentrations used [37].

The impact of the loss of hydrosoluble PSI acceptors ferredoxin (Fd) and $NADP^+$ during thylakoid isolation was assessed by the measurement of FI after the addition of these chemicals. Addition of $NADP^+$ alone up to 2 mM did not affect significantly the FI traces as all amplitudes and half-times varied by less than 5% (not shown). In the presence of Fd alone, the I-P phase was modified with a 10% decrease in its amplitude and a 10% increase in its half-time for the maximal concentration of Fd used, 4 μ M (not shown). However, simultaneous addition of both chemicals increased the effect of Fd on the I-P rise (Fig. 5.6, traces 1 to 4). Concentrations of $NADP^+$ from 100 μ M to 2 mM

and Fd from 1 to 4 μM were tested. At the maximal concentrations used, $A_{\text{I-P}}$ decreased by 45% and $t_{1/2\text{I-P}}$ was raised by 15%.

5.6 Discussion

TMPD has been often used in photosynthesis research as an electron donor to photosystem I [38-41]. Recently, its effect on PSII was studied in thylakoid membranes. It turned out that TMPD has a new feature: it can restore a well-defined O-J-I-P induction trace in isolated thylakoids [3,32,33]. However, complex effects of TMPD on both donor and acceptor side of PSII were difficult to analyze because the fluorescence induction studies were limited to a qualitative analysis. A simple and efficient quantitative analysis of FI traces, inspired from Pospisil and Dau [22,27], was recently used to gather new information about the origin of each kinetic step [20]. Three exponential rises were used to correctly fit the FI traces, which obviously corresponded to the O-J, J-I, and I-P rises [20,22]. This procedure does not take into account all the single physical events that occur in PSII but provides an efficient model to evaluate the main components of experimental FI traces. The same procedure was used in the present study to reassess the effect of TMPD on PSII and to clarify the cause leading to the segregation of I and P steps in FI traces of thylakoids.

In a thermoluminescence study, Gauthier *et al.* [34] have shown that TMPD behaves similarly to ADRY agents and is able to reduce the S_2 states of the Mn cluster responsible for water oxidation in PSII. This ADRY effect is reflected in our experiments by an increased $A_{\text{O-J}}$ observed at low TMPD concentrations (Fig. 5.1 and 4.2). Indeed, S_2 and S_3 states of the Mn cluster are known as potential quenchers of PSII Chl fluorescence [3,5,7], and their transformation to more reduced states such as S_1 can abolish this quenching. Accordingly, the use of ADRY agents like carbonylcyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) was also shown to increase the amplitude of the O-J rise [3,4]. This effect thus required the reduced form of TMPD and was not modified if all the TMPD molecules in our assay were kept in reduced state by Asc (Fig. 5.3).

In contrast, the influence of TMPD on the I-P rise was mainly related to the oxidized form of TMPD molecules as the important increase in $t_{1/2 \text{ I-P}}$ in the presence of TMPD (Fig. 5.1) was completely removed by the addition of Asc. However, the decreased $A_{\text{I-P}}$ caused by TMPD was only slightly affected by Asc, meaning that both reduced and oxidized TMPD could act as fluorescence quenchers.

The retardation of I-P observed in the presence of TMPD (Fig. 5.1C) shows that this redox compound delays the removal of fluorescence quenching associated with an oxidized PQ pool. TMPD affects the electron transport chain before the cytochrome (Cyt) b_6f complex, as blocking the Q_0 binding site by dibromothymoquinone (DBMIB) does not prevent the appearance of the I-peak caused by TMPD [33]. Oxidized TMPD could take electrons from the PQ pool, accept electrons directly from Q_A by binding in the Q_B pocket, or both. Gauthier *et al.* [34] showed from changes in the flash-induced oscillation pattern in the intensity of TL bands that TMPD binds in the Q_B pocket. The nearly unaffected J-I observed when added TMPD was reduced by Asc indicates that reduced TMPD cannot bind efficiently in the Q_B pocket, because $A_{\text{J-I}}$ is strongly decreased when a molecule such as 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU), that cannot accept electrons, is present in the Q_B pocket [20].

Previously, TMPD was the only redox agent reported to initiate the clear separation of I and P steps of FI rise in thylakoids, thus providing a O-J-I-P rise similar to FI in leaves [32]. In the present study, we show that this ability is not unique to TMPD, but is common with some well-known chemicals used in photosynthesis research: SiMo, DCBQ, and phe-BQ. These chemicals are all used as electron acceptors of PSII. Their main effect was to increase $t_{1/2 \text{ I-P}}$ by a factor of 10 or more, as seen with TMPD. However, in opposition with TMPD, they did not caused any increase in $A_{\text{O-J}}$ indicating that they do not exert ADRY properties. The slowed I-P rise observed in the presence of all of these electron acceptors confirms the ability of TMPD to accept electrons from PSII in a similar way.

The J-I rise was proposed to parallel the formation of Q_B^- and Q_B^{2-} (PQH_2) [16]. TMPD, SiMo, and DCBQ induced only a slight retardation of J-I rise, while this effect was more pronounced in the presence of phe-BQ. These results thus indicate the different reduction kinetics and binding properties of these electron acceptors in the Q_B pocket. The relative efficiencies of these chemicals as fluorescence quenchers upon their reduction during the FI rise can also explain that they retarded $t_{1/2\ O-J}$ and slightly decreased A_{O-J} to different extent.

It was shown that various BQ accept electron from PSII at two different binding sites: from Q_A^- in the Q_B binding site, and from reduced PQ (PQH_2) [42,43]. Various chloro- and methyl-substituted BQ had different binding affinities and maximum turnover rates in each of these sites. Chloro-substituted BQ had generally a higher affinity for the Q_B site than methyl-substituted BQ. Interactions of various BQ with the Q_B pocket in spinach thylakoids was also quantitatively described by the midpoint redox potential ($E_{1/2}$) for BQ/ BQH_2 transition, a steric factor and an indicator parameter [44]. Satoh *et al.* [45] have also shown that the binding affinities of different BQ have a tendency to increase with their increasing $E_{1/2}$. Interestingly, methyl-substituted BQ, particularly DQ, accept electrons mainly from the PQ site, while chloro-substituted BQ have a preference for the Q_B site [42,43]. These observations clearly coincide with our result that DQ, MBQ, and *p*BQ strongly decreased A_{I-P} with a relatively small increase in $t_{1/2\ I-P}$, compared with the small decrease in A_{I-P} and the strong retardation of $t_{1/2\ I-P}$ induced by chloro-substituted BQ and phe-BQ. The influence of PSII electron acceptors on the I-P rise thus reflects their preferential site of electron acceptance.

The contrasting effects of the artificial electron acceptors on J-I and I-P rises also emphasize the clearly different origins of these two phases of FI. Boisvert *et al.* [32] recently showed that only I-P is related to the progressive removal of non-photochemical quenching caused by the oxidized PQ pool, which is definitely not the case for J-I. The latter was proposed to be related to the closure of PSII reaction centers. Interestingly, it was shown from absorbance changes at 820 nm that electrons coming from PSII start to reduce PSI about 20-30 ms after the beginning of strong actinic illumination [21,46],

which closely corresponds to the I-P rise. Keeping in mind that both reduction and oxidation of electron carriers happen simultaneously under illumination until the system reaches a stationary state, this indicates that the PQ pool starts to accumulate in its reduced form at the I-peak. This view is also supported by a comparison of delayed fluorescence kinetics with FI and absorbance changes at 820 nm [47].

On the other hand, Schanker *et al.* [21] proposed, from simultaneous measurements of FI and absorbance changes at 820 nm in leaves infiltrated with DBMIB or methylviologen (MV), that the I-P rise is directly related to PSI activity rather than to the reduction of the PQ pool. The above idea came from a transient block in the electron transport chain imposed by inactive ferredoxin-NADP⁺-reductase. However, an influence of PSI activity during the I-P rise is fully compatible with the idea that this kinetic step is due to the reduction of the PQ pool because the activity of PSI indirectly controls the oxidation kinetics of this pool [33]. The above is supported by the theoretical simulations of Zhu *et al.* [16] showing that an increased oxidation rate of the PQ pool can drastically decrease the I-P rise. This is confirmed experimentally by Schanker *et al.* [21] and Joly *et al.* [33] in leaves or isolated thylakoids treated with MV to remove the PSI acceptor side limitation in the electron transport chain. In the present study, we show further evidence supporting the theoretical predictions of Zhu *et al.* [16] about the impact of PSI activity on the I-P phase of FI. Addition of exogenous PSI electron acceptors NADP⁺ and Fd, which were lost during isolation of the thylakoid membranes, increased the activity of PSI during FI rise and consequently enhanced the oxidation rate of the PQ pool. This caused a major decrease of A_{I-P}, as predicted, and a slight retardation of I-P rise.

In conclusion, the quantitative analysis of FI traces used in this work demonstrates that the modulation of the kinetics of I-P, attributed to the reduction of the PQ pool, is sufficient to transform the FI of thylakoids, qualitatively looking as biphasic, to a triphasic and clearly defined O-J-I-P trace as those observed in intact leaves. The appearance of the I-peak is obviously associated with a change in $t_{1/2 \text{ I-P}}$ as it does not require a modification of the amplitude of J-I or I-P. While this can be achieved by

TMPD treatment, this reagent has also several other activities and binding sites in both PSII and PSI. However, other well-known electron acceptors of PSII that can delay the reduction of PQ were also shown to initiate the resolution of the I-peak. This raises the question of what causes the differences observed between the FI traces measured in untreated thylakoids and intact leaves. We showed that the absence of clear segregation between J-I and I-P rises in isolated thylakoids cannot be solely attributed to the loss of soluble PSI electron acceptors.

5.7 Acknowledgments

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). D.J. was recipient of graduate fellowships from the Fonds Québécois de Recherche sur la Nature et les Technologies and from NSERC.

5.8 References

- [1] D. Lazar, Chlorophyll *a* fluorescence induction, *Biochim. Biophys. Acta* 1412 (1999) 1-28.
- [2] D. Lazar, The polyphasic chlorophyll *a* fluorescence rise measured under high intensity of exciting light, *Funct. Plant Biol.* 33 (2006) 9-30.
- [3] 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.
- [4] U. Schreiber, C. Neubauer, The polyphasic rise of chlorophyll fluorescence upon onset of strong continuous illumination: II. Partial control by the photosystem II donor side and possible ways of interpretation, *Z. Naturforsch* 42c (1987) 1255-1264.
- [5] U. Schreiber, Assessment of maximal fluorescence yield: Donor-side dependent quenching and QB-Quenching, in O.V. Kooten, J.F.H. Snel (Eds.), *Plant*

Spectrofluorometry: Applications and Basic Research, Rozenberg, Amsterdam, 2002, pp. 23-47.

- [6] B.J. Strasser, Donor side capacity of Photosystem II probed by chlorophyll *a* fluorescence transients, *Photosynth. Res.* 52 (1997) 147-155.
- [7] R. Delosme, P. Joliot, Period four oscillations in chlorophyll *a* fluorescence, *Photosynth. Res.* 73 (2002) 165-168.
- [8] G. Samson, O. Prasil, B. Yaakoubd, Photochemical and thermal phases of chlorophyll *a* fluorescence, *Photosynthetica* 37 (1999) 163-182.
- [9] R.J. Strasser, Govindjee, On the O-J-I-P fluorescence transients in leaves and D1 mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*, in N. Murata (Ed.), *Research in Photosynthesis*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1992, pp. 23-32.
- [10] R.J. Strasser, A. Srivastava, Govindjee, Polyphasic Chlorophyll *a* Fluorescence Transient in Plants and Cyanobacteria, *Photochem. Photobiol.* 61 (1995) 32-42.
- [11] B. Yaakoubd, R. Andersen, Y. Desjardins, G. Samson, Contributions of the free oxidized and Q(B)-bound plastoquinone molecules to the thermal phase of chlorophyll- α fluorescence, *Photosynth. Res.* 74 (2002) 251-257.
- [12] C. Neubauer, U. Schreiber, The polyphasic rise of chlorophyll fluorescence upon onset of strong continuous illumination: I. Saturation characteristics and partial control by the photosystem II acceptor side, *Z. Naturforsch* 42c (1987) 1246-1254.
- [13] D. Lazar, Chlorophyll *a* Fluorescence Rise Induced by High Light Illumination of Dark-adapted Plant Tissue Studied by Means of a Model of Photosystem II and Considering Photosystem II Heterogeneity, *J. Theor. Biol.* 220 (2003) 469-503.

- [14] W.L. Butler, Energy Distribution in the Photochemical Apparatus of Photosynthesis, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 29 (1978) 345-378.
- [15] P. Mathis, G. Paillotin, Primary processes of photosynthesis, in M.D. Hatch, N.K. Boardman (Eds.), *The biochemistry of plants*, Academic Press, New York, 1981, pp. 97-161.
- [16] X.G. Zhu, Govindjee, N. Baker, E. deSturler, D. Ort, S. Long, Chlorophyll a fluorescence induction kinetics in leaves predicted from a model describing each discrete step of excitation energy and electron transfer associated with Photosystem II, *Planta* 223 (2005) 114-133.
- [17] C. Vernotte, A.L. Etienne, J.-M. Briantais, Quenching of the system II chlorophyll fluorescence by the plastoquinone pool, *Biochim. Biophys. Acta* 545 (1979) 519-527.
- [18] R. Delosme, Étude de l'induction de fluorescence des algues vertes et des chloroplastes au début d'une illumination intense, *Biochim. Biophys. Acta* 143 (1967) 108-128.
- [19] D. Lazar, P. Ilik, J. Kruk, K. Strzalka, J. Naus, A theoretical study on effect of the initial redox state of cytochrome b559 on maximal chlorophyll fluorescence level (FM): implications for photoinhibition of photosystem II, *J. Theor. Biol.* 233 (2005) 287-300.
- [20] S. Boisvert, D. Joly, R. Carpentier, Quantitative analysis of the experimental O-J-I-P chlorophyll fluorescence induction kinetics. Apparent activation energy and origin of each kinetic step, *FEBS J.* 273 (2006) 4770-4777.
- [21] G. Schansker, S.Z. Toth, R.J. Strasser, Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl a fluorescence rise OJIP, *Biochim. Biophys. Acta* 1706 (2005) 250-261.

- [22] P. Pospisil, H. Dau, Valinomycin sensitivity proves that light-induced thylakoid voltages result in millisecond phase of chlorophyll fluorescence transients, *Biochim. Biophys. Acta* 1554 (2002) 94-100.
- [23] W.J. Vredenberg, A.A. Bulychiev, Photo-electrochemical control of photosystem II chlorophyll fluorescence in vivo, *Bioelectrochemistry* 57 (2002) 123-128.
- [24] J. Kurreck, R. Schödel, G. Renger, Investigation of the plastoquinone pool size and fluorescence quenching in thylakoid membranes and Photosystem II (PS II) membrane fragments, *Photosynth. Res.* 63 (2000) 171-182.
- [25] P. Haldimann, M. Tsimilli-Michael, Non-photochemical quenching of chlorophyll a fluorescence by oxidised plastoquinone: new evidences based on modulation of the redox state of the endogenous plastoquinone pool in broken spinach chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta* 1706 (2005) 239-249.
- [26] S. Rajagopal, E.A. Egorova, N.G. Bukhov, R. Carpentier, Quenching of excited states of chlorophyll molecules in submembrane fractions of Photosystem I by exogenous quinones, *Biochim. Biophys. Acta* 1606 (2003) 147-152.
- [27] P. Pospisil, H. Dau, Chlorophyll fluorescence transients of Photosystem II membrane particles as a tool for studying photosynthetic oxygen evolution, *Photosynth. Res.* 65 (2000) 41-52.
- [28] X. Barthelemy, R. Popovic, F. Franck, Studies on the O-J-I-P transient of chlorophyll fluorescence in relation to photosystem II assembly and heterogeneity in plastids of greening barley, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol* 39 (1997) 213-218.
- [29] P.C. Meunier, D.S. Bendall, Analysis of fluorescence induction in thylakoids with the method of moments reveals 2 different active photosystem-II centers, *Photosynth. Res.* 32 (1992) 109-120.
- [30] L. Force, C. Critchley, J. van Rensen, New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants, *Photosynth. Res.* 78 (2003) 17-33.

- [31] P. Haldimann, R.J. Strasser, Effects of anaerobiosis as probed by the polyphasic chlorophyll a fluorescence rise kinetic in pea, *Photosynth. Res.* 62 (1999) 67-83.
- [32] 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.
- [33] D. Joly, C. Bigras, J. Harnois, S. Govindachary, R. Carpentier, Kinetic analyses of the OJIP chlorophyll fluorescence rise in thylakoid membranes, *Photosynth. Res.* 84 (2005) 107-112.
- [34] A. Gauthier, S. Govindachary, J. Harnois, R. Carpentier, 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 QB niche, *Biochim. Biophys. Acta* 1757 (2006) 1547-1556.
- [35] S.Z. Toth, G. Schansker, J. Kissimon, L. Kovacs, G. Garab, R.J. Strasser, Biophysical studies of photosystem II-related recovery processes after a heat pulse in barley seedlings (*Hordeum vulgare* L.), *J. Plant Physiol.* 162 (2005) 181-194.
- [36] 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.
- [37] 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.

- [38] A.A. Bulychiev, W.J. Vredenberg, Modulation of photosystem II chlorophyll fluorescence by electrogenic events generated by photosystem I, *Bioelectrochemistry* 54 (2001) 157-168.
- [39] A.A. Bulychiev, T. Voorthuysen, W.J. Vredenberg, Transmembrane movements of artificial redox mediators in relation to electron transport and ionic currents in chloroplasts, *Physiol. Plant.* 98 (1996) 605-611.
- [40] N. Cassan, B. Lagoutte, P. Setif, Ferredoxin-NADP⁺ Reductase: Kinetics of electron transfer, transient intermediates, and catalytic activities studied by flash-absorption spectroscopy with isolated photosystem I and ferredoxin, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 25960-25972.
- [41] G.J. Bredenkamp, N.R. Baker, Modification of excitation energy distribution to photosystem I by protein phosphorylation and cation depletion during thylakoid biogenesis in wheat, *Photosynth. Res.* 23 (1990) 111-117.
- [42] S. Dudekula, M. Fragata, Investigation of the electron transfer site of p-benzoquinone in isolated photosystem II particles and thylakoid membranes using [α]- and [β]-cyclodextrins, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol* 85 (2006) 177-183.
- [43] K. Satoh, M. Oh-hashi, Y. Kashino, H. Koike, Mechanism of Electron Flow through the QB Site in Photosystem II. 1. Kinetics of the Reduction of Electron Acceptors at the QB and Plastoquinone Sites in Photosystem II Particles from the Cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*, *Plant Cell Physiol.* 36 (1995) 597-605.
- [44] H.J. Soll, W. Oettmeier, Inhibitor binding and displacement in plastoquinone depleted chloroplasts, in C. Sybesma (Ed.), *Advances in Photosynthesis Research*, Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, Dordrecht, 1983, pp. 5-8.

- [45] K. Satoh, H. Koike, T. Ichimura, S. Katoh, Binding affinities of benzoquinones to the QB site of Photosystem II in *Synechococcus* oxygen-evolving preparation, *Biochim. Biophys. Acta* 1102 (1992) 45-52.
- [46] G. Schansker, A. Srivastava, Govindjee, R.J. Strasser, Characterization of the 820-nm transmission signal paralleling the chlorophyll *a* fluorescence rise (OJIP) in pea leaves, *Funct. Plant Biol.* 30 (2003) 785-796.
- [47] V. Goltsev, P. Chernev, I. Zaharieva, P. Lambrev, R.J. Strasser, Kinetics of delayed chlorophyll *a* fluorescence registered in milliseconds time range, *Photosynth. Res.* 84 (2005) 209-215.

5.9 Figure legends:

Figure 5.1: Original traces of Chl *a* fluorescence rise of isolated thylakoids (A) without additive (1) or in the presence of 2.5 μ M (2), 25 μ M (3), 50 μ M (4), or 100 μ M (5) TMPD and quantitative analysis of the effects of TMPD on the amplitudes (B) and relative half-times (C) of O-J (circles), J-I (triangles), and I-P phases (squares). Half-times of TMPD-treated thylakoids are relative to half-times of untreated thylakoids. Amplitudes and half-times are means $\pm$ S.D. (n=5)

Figure 5.2: Original traces of Chl *a* fluorescence rise obtained without additive (1) or in the presence of 1 mM Asc (2), 100 μ M TMPD (3), or 100 μ M TMPD and 1 mM Asc (4).

Figure 5.3: Amplitudes and half-times of O-J, J-I, and I-P phases measured with various concentrations of TMPD without (light gray bars) or with 1 mM Asc (dark gray bars). Results are means $\pm$ S.D. (n=5)

Figure 5.4: Original traces of Chl *a* fluorescence rise obtained without additive (1) or in the presence of 40 μ M SiMo (2), 10 μ M DCBQ (3), 10 μ M phe-BQ (4), or 1 μ M DQ (5).

Figure 5.5: Amplitudes and half-times of O-J, J-I, and I-P measured without additive (Ctrl) or in the presence of 40 μ M SiMo, 10 μ M DCBQ, 10 μ M phe-BQ, or 1 μ M DQ, respectively. Results are means $\pm$ S.D. (n=3)

Figure 5.6: Original traces of Chl *a* fluorescence rise obtained without additive (1) or in the presence of 500 μ M NADP⁺ and 1 μ M Fd (2), 500 μ M NADP⁺ and 2 μ M Fd (3), or 2 mM NADP⁺ and 4 μ M Fd (4).

Table 5.1: Quantitative analysis of FI in pea thylakoids

Phase	Amplitude (% of F_v)	$t_{1/2}$ (ms)
O-J	38 ± 5	0.21 ± 0.03
J-I	41 ± 5	8.8 ± 0.9
I-P	21 ± 2	56 ± 5

FI traces were fitted with three exponential rises corresponding to O-J, J-I, and I-P phases. Results are averages $\pm$ S.D., ($n = 10$). F_v , variable fluorescence.

Figure 5.1

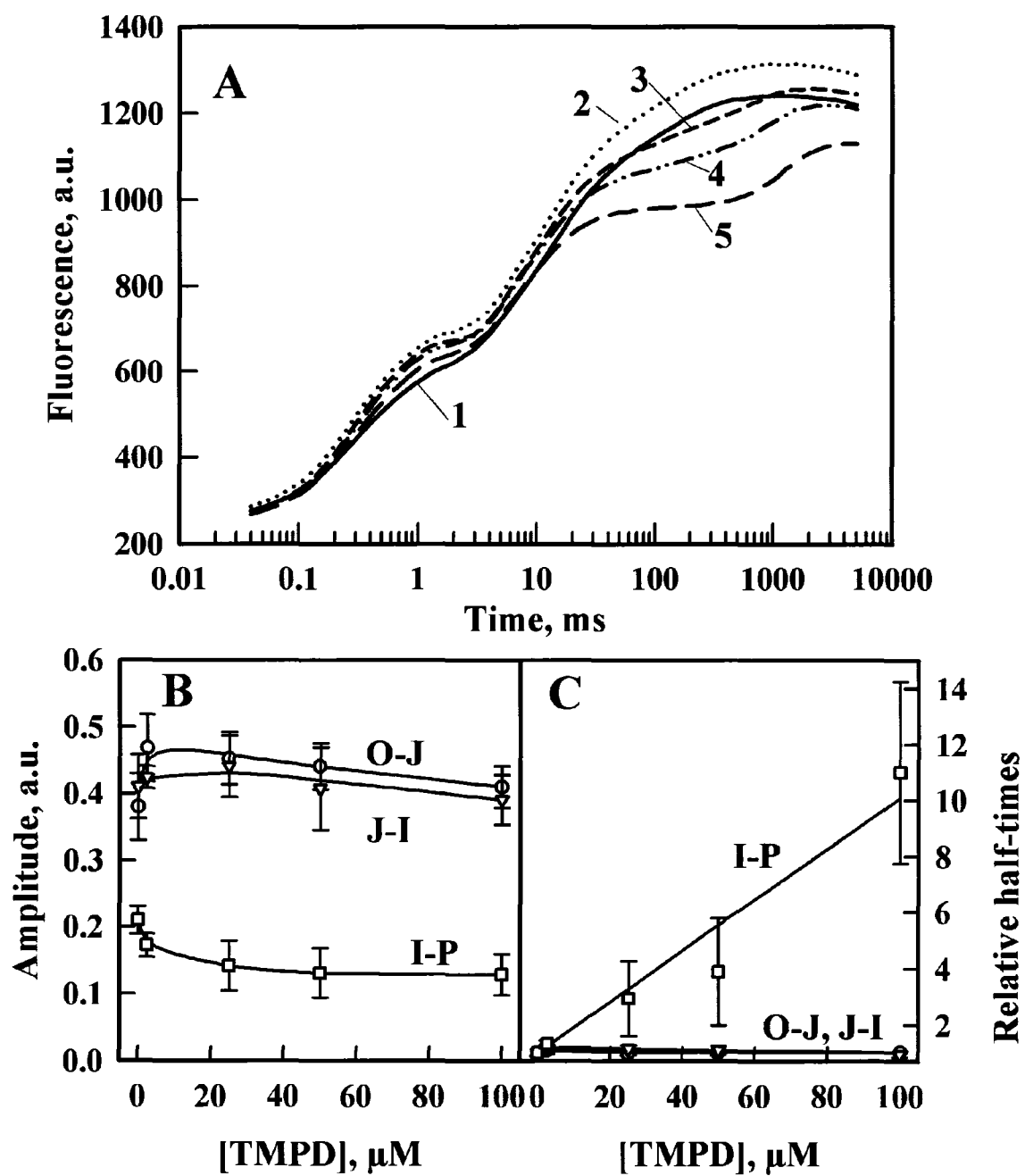


Figure 5.2

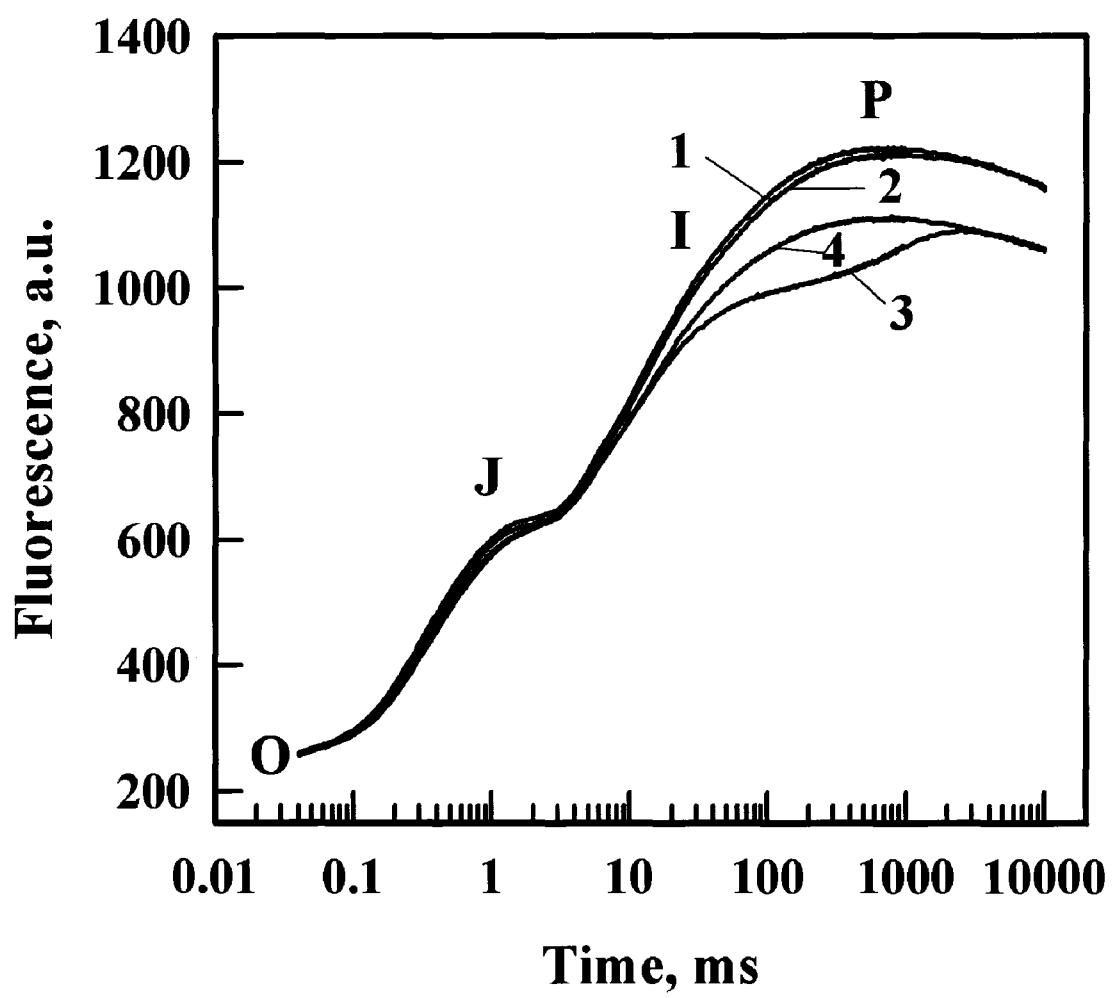


Figure 5.3

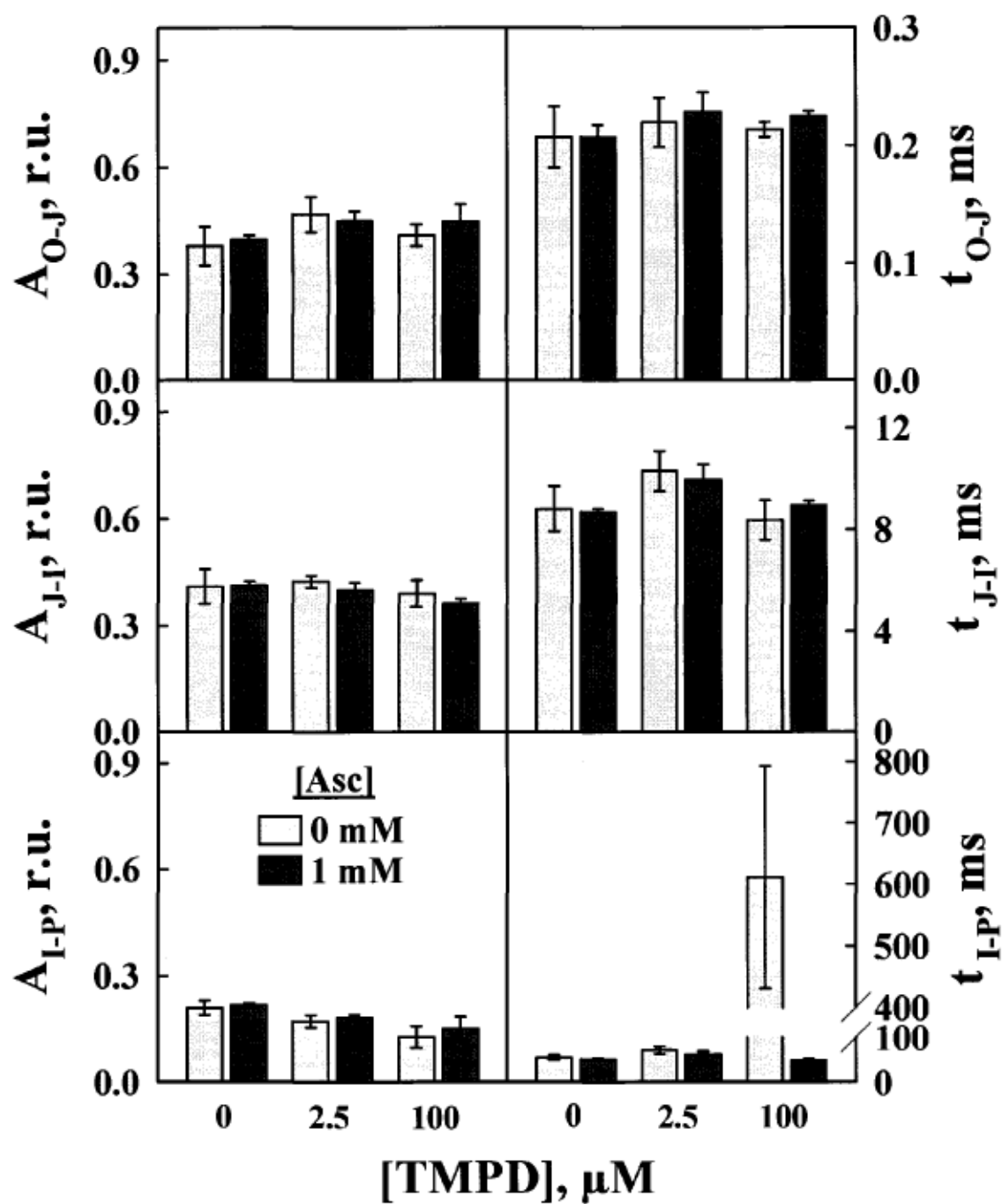


Figure 5.4

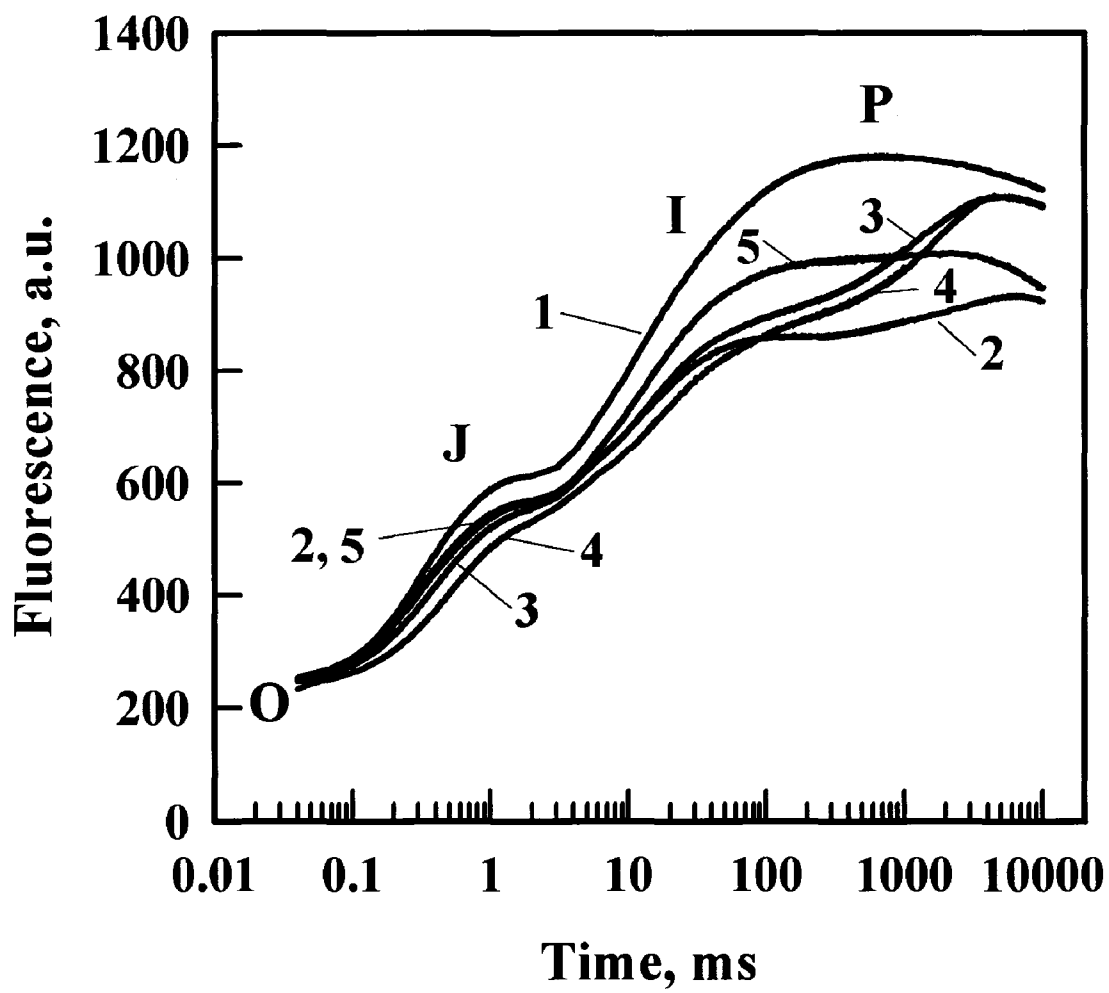


Figure 5.5

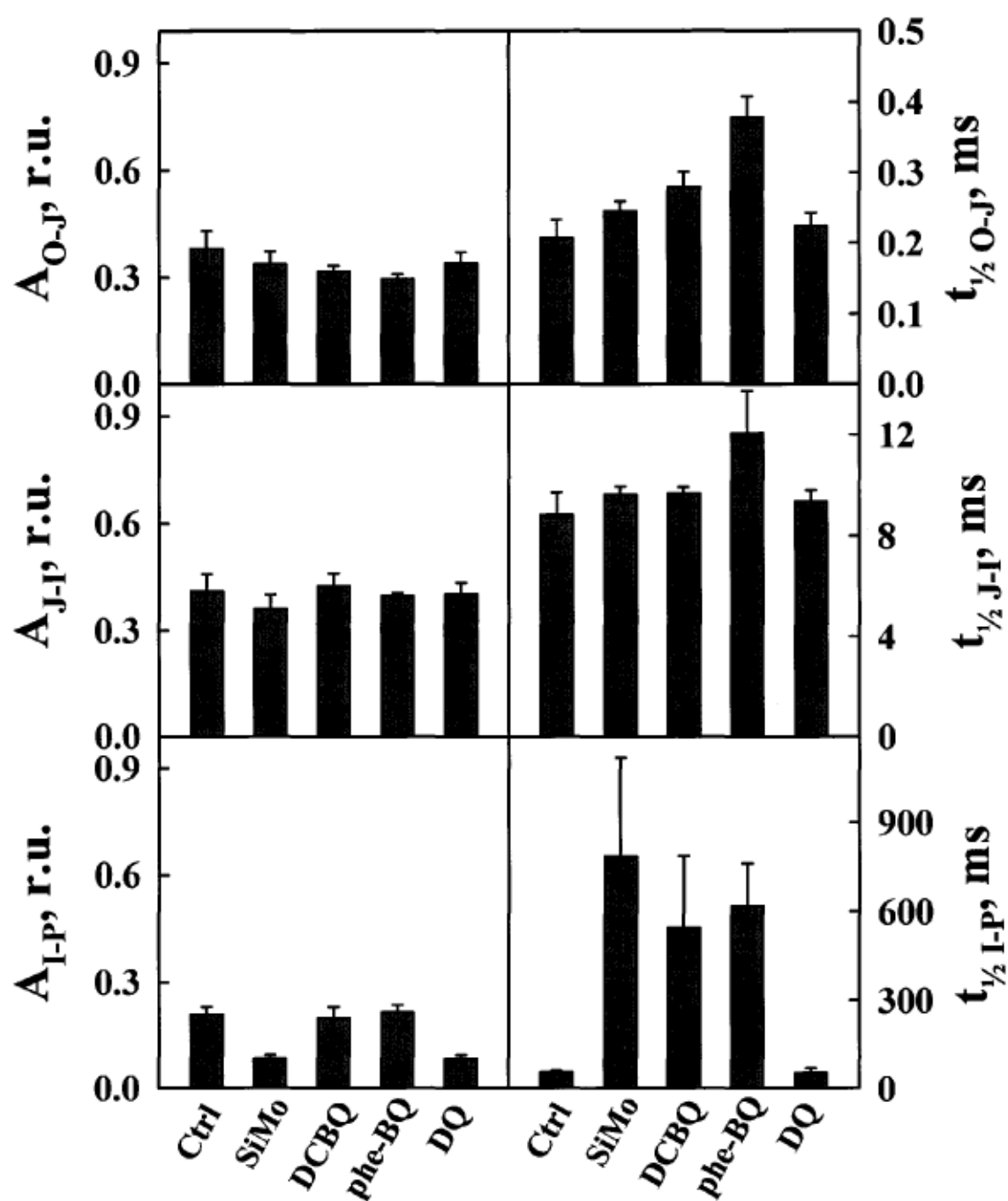
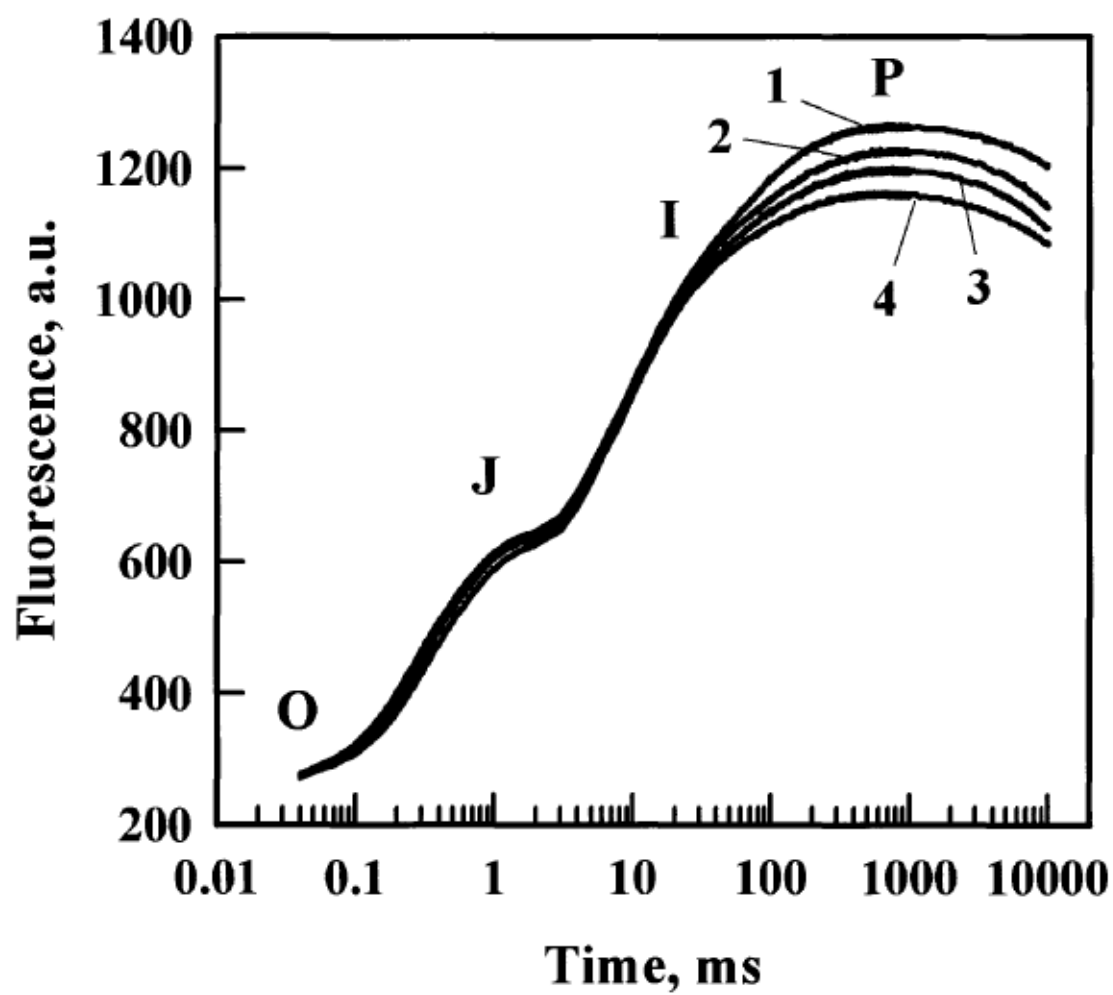


Figure 5.6



CHAPITRE VI
REGULATION OF ENERGY DISSIPATION IN PHOTOSYSTEM I
BY THE REDOX STATE OF THE PLASTOQUINONE POOL

Le contenu de ce chapitre a été accepté pour publication en 2007 au journal *Biochemistry* : Joly, D. et Carpentier, R., Regulation of energy dissipation in Photosystem I by the redox state of the plastoquinone pool (sous presse).

6.1 Résumé

L'effet de plastoquinones (PQ) exogènes sur les différentes voies de désexcitation du photosystème I (PSI) a été étudié. L'ajout de décyl-plastoquinone (dPQ) et de PQ-2 a fortement atténué le spectre d'émission des chlorophylles (Chl) de membranes enrichies en PSI. Cette atténuation augmentait avec la concentration de PQ exogènes ajoutées comme le décrit la loi de Stern-Volmer modifiée. Les constantes de Stern-Volmer trouvées pour les dPQ et PQ-2 sont $1.25 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ et $0.55 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, respectivement, tandis que la fraction de fluorescence accessible à l'atténuateur était de 0.7 pour les deux PQ exogènes. Les dPQ et PQ-2 ont également retardé la cinétique de photooxydation du P700 mesurée sous une intensité lumineuse limitante. Les mesures de spectroscopie photoacoustique ont montré que l'ajout de dPQ augmentait la dissipation thermique et diminuait la capacité photochimique du PSI. À partir de ces résultats, il est montré que les PQ exogènes agissent comme atténuateurs efficaces des états excités des Chl dans les antennes du PSI. De plus, la réduction du pool endogène de PQ dans des membranes entières de thylakoïdes a augmenté la fluorescence du PSI de 65%, indiquant ainsi l'importance de l'état rédox du pool de PQ dans la dissipation d'énergie du PSI.

Regulation of Energy Dissipation in Photosystem I by the Redox State of the Plastoquinone Pool[†]

David Joly and Robert Carpentier*

*Groupe de Recherche en Biologie Végétale, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7; *Author for correspondence (E-mail: Robert.Carpentier@uqtr.ca. Phone: 1-819-376-5011 ext.3300. Fax: +1-819-376-5057)*

Running Title : Regulation of Photosystem I by plastoquinone

Key words: Chlorophyll fluorescence; Photosystem I; P700; Plastoquinone; Thermal dissipation; photochemical quenching

[†] This work was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

Abbreviations: ΔA_{830} , absorbance changes at 830 nm; CET, cyclic electron transport; Chl, chlorophyll; DBMIB, dibromothymoquinone; dPQ, decyl-plastoquinone; f_a , fraction of fluorescence accessible to the quencher; FNR, ferredoxin:NADPH reductase; K_{SV} , Stern-Volmer constant; LHC, light harvesting complex; NPQ, non-photochemical quenching; P700, primary electron donor of photosystem I; PA, photoacoustic; PQ, plastoquinone; PQ_{ex}, exogenous plastoquinone; PS, photosystem; qE, energy-dependent quenching; qI, photoinhibitory quenching; qT, state transition quenching; RC, reaction center.

6.2 Abstract

The effect of exogenous plastoquinone (PQ) on the different deexcitation pathways of photosystem I (PSI) was investigated. Addition of oxidized decyl-plastoquinone (dPQ) and PQ-2 strongly quenched the chlorophyll (Chl) emission spectra of PSI submembrane fractions over all wavelengths. This quenching increased with the concentration of exogenous PQ added and followed the modified Stern-Volmer law. The Stern-Volmer constants found for dPQ and PQ-2 were $1.25 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ and $0.55 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, respectively, and the fraction of fluorescence accessible to the quencher was 0.7 for both exogenous PQ. dPQ and PQ-2 also retarded the P700 photooxidation measured under limiting actinic light irradiances. Photoacoustic measurements showed that addition of dPQ increased the heat dissipation and decreased the photochemical capacity of PSI. From these results, exogenous oxidized PQ were shown to efficiently quench the Chl excited state in the PSI antenna and change the balance between Chl deexcitation pathways. Moreover, reduction of the endogenous PQ pool in whole thylakoid membranes by NADPH increased PSI fluorescence by 65%, indicating the importance of the redox state of the PQ pool on PSI energy dissipation.

6.3 Introduction

In cyanobacteria and higher plants, oxygenic photosynthesis involves the light reactions of photosystems I and II (PSI and PSII) working in series. While PSII is responsible for water oxidation, PSI mediates the light-driven electron transfer from plastocyanin to ferredoxin (Fd) (1). Reduced Fd is used by the enzyme ferredoxin:NADP⁺ reductase (FNR) to produce NADPH required for carbon fixation (2). PSI is a 525 kDa protein pigment complex of the thylakoid membrane that comprises 12 core subunits and four light-harvesting proteins (Lhca1-4) forming a half-moon shape around the core (3). PsaA and PsaB are the central subunits of the core complex (4). They bind about 96 chlorophylls (Chl), 22 β -carotene, the PSI reaction center, and primary electron donor (P700) identified as a special Chl pair, two phylloquinones, and 3 [4Fe-4S] iron-sulfur clusters (4). Lhca1-4 are organized in dimers to form two light-harvesting complexes of PSI (LHCI): LHCI-680 composed of subunits Lhca2 and Lhca3, and LHCI-730 composed of subunits Lhca1 and Lhca4 (5-7). LHCI proteins

have a unique feature among Chl-binding proteins as they contain Chl with red-shifted absorbance (8).

Light absorption by antenna pigments leads to the building of electronic excited states that are transferred as excitons between the pigment molecules (9). Trapping of an exciton by P700 induces its photooxidation and the consequent charge separation driving electron transport in PSI (10). In isolated reaction center (RC) preparations, the quantum yield of charge separation is close to unity (11). However, each exciton has also a probability to be dissipated by radiative emission or heat. Both dissipation processes compete with the photochemical reaction and decrease its quantum yield (12, 13). Therefore, the rate of photosynthetic electron transport depends on the respective quantum yield of each dissipative pathway.

In intact photosynthetic tissues, special mechanisms are known to reversibly increase the probability of excitons in the PSII antenna to thermally dissipate and decrease radiative dissipation (14). As this quenching of the Chl excited states is not linked to the photochemical trapping of excitons, these mechanisms are commonly referred to as non-photochemical quenching (NPQ) of Chl fluorescence (15). NPQ includes many distinct processes contributing to light adaptation and photoprotection of the photosynthetic machinery (15). Low lumenal pH induces protonation of LHCII, conversion of their violaxanthin pigments to zeaxanthin, and a consequent conformational change that increases thermal dissipation in PSII antennas in the so-called high-energy state quenching (qE) (16). Photoinhibition quenching (qI) is caused by slowly reversible damage to PSII reaction centers (17). Another important NPQ component is the state transition (qT), a phosphorylation-related migration of LHCII from PSII to PSI (18). State transition was also reported to slightly increase the antenna cross-section in PSI (19). Energy dissipation of PSI, however, is thought to be mainly indirectly controlled by NPQ mechanisms acting on PSII (20). Information on quenching of Chl excited states in PSI is restricted to the view that P700⁺ is an excellent non-photochemical quencher (21). Recently, NADP⁺-dependent reversible conformation changes of PSI were also proposed to affect energy dissipation (22).

Oxidized plastoquinone (PQ) molecules are known as non-photochemical quenchers of Chl excited states of PSII (23-25). Their reduction at the PSII acceptor side was proposed to be reflected by the increase in fluorescence from I to P steps within 1 s during fluorescence induction (FI) kinetics, as reduced plastoquinones (PQH₂) cannot quench Chl excited states (26, 27). PQ-type fluorescence quenching would correspond to about 20-25% of the maximal fluorescence yield in thylakoids (25, 26). Because LHCI shows important similarity with PSII antennas in their structure and pigment binding properties (3, 28), PQ should also affect fluorescence and energy dissipation in PSI. Artificial exogenous quinones in their oxidized form were shown to act as quenchers of Chl excited states of PSI, and consequently quenched fluorescence and decreased the rate of P700 photooxidation under limiting illumination (27, 29). However, the capacity of the endogenous PQ pool to alter energy dissipation in PSI has not been examined.

In the present work, we studied the effect of exogenous PQ on PSI submembrane fractions. Our work revealed that exogenously added PQ molecules were highly efficient in fluorescence quenching, increased thermal dissipation of Chl excited states, retarded the photooxidation of PSI, and decreased the photochemical capacity of PSI RC. Reduction of the endogenous PQ pool in thylakoid membranes caused a major increase in Chl fluorescence of PSI. An important impact of the PQ pool redox state in PSI dissipative pathways is thus shown. The results are discussed in terms of a possible role of PQ in the regulation of PSI activity.

6.4 Materials and Methods

6.4.1 Isolation of Photosynthetic Materials and Sample Preparation

Thylakoids and PSI submembrane fractions were isolated from fresh spinach leaves obtained from a local market, according to the procedure of Peters *et al.* (30) with some modifications (31). These stroma lamella preparations retain the cytochrome b₆f complex, a full complement of plastocyanin, and a Chl/P700 ratio of 260 (30), and they were devoid of PSII polypeptides (22). Chl concentration was determined in 80% acetone according to Porra *et al.* (32). The isolated fractions with approximately 1-2 mg

of Chl/mL were suspended in a medium containing 20 mM Tricine-KOH buffer (pH 7.8), 10 mM NaCl, 10 mM KCl, and 5 mM MgCl₂ and stored at -80°C until use. Unless mentioned, the same buffer was used as a measurement medium.

For experiments done under anaerobiosis, photosynthetic samples were incubated 45 min in the dark in the presence of 10 mM glucose, 50 units/mL glucose oxidase, and 1000 units/mL catalase. dPQ was obtained from Sigma-Aldrich (D7786) and dissolved in ethanol. PQ-2 and PQ-9 were provided by Dr Jerzy Kruk (Department of Plant Physiology and Biochemistry, Jagiellonian University, Poland) in ethanol solution at a concentration of 1 mM. Chemical structures of these PQ molecules are presented in Figure 6.1. For all measurements, ethanol concentration was kept below 1% (v/v).

6.4.2 Fluorescence Measurements

The room temperature (298 K) and low temperature (77 K) spectra of fluorescence emission were measured with a Perkin-Elmer LS55 spectrofluorimeter equipped with a red-sensitive photomultiplier R928. Chl fluorescence was excited at 436 nm. The excitation and emission spectral widths were fixed at 5 and 2.5 nm, respectively. Emission spectra were corrected according to the photomultiplier sensitivity using the correction factor spectrum provided by Perkin Elmer. The Chl content of the samples was adjusted to 5 µg/mL. Low temperature spectra were measured as reported previously (33) in the presence of 60% glycerol.

6.4.3 Absorbance Changes at 830 nm (ΔA_{830})

Absorbance changes at 830 nm were assayed using a PAM Chl fluorometer (Walz, Effeltrich, Germany) equipped with ED-P700DW dual-wavelength emitter-detector unit. White actinic light for measurements with the PAM device was obtained from a Fiber-Lite source (Microview, Thornhill, ON, Canada) and controlled by an electronic shutter. The signals of absorbance changes were recorded using the Walz Data Acquisition System DA100. Chl concentration was 66 µg/mL during the measurements of absorbance changes of PSI submembrane fractions, which were done with an optical path of 1.065 mm. The measurements were performed in the presence of 3 mM methyl

viologen to prevent charge recombination between $P700^+$ and reduced acceptor side intermediates of PSI. Experimental conditions were the same for the experiments using thylakoid membranes, except that Chl concentration was 100 $\mu\text{g/mL}$ and 100 μM diuron was added to prevent reduction of P700 by electrons coming from PSII during measurements.

6.4.4 Photoacoustic Spectroscopy

For the measurements of photoacoustic (PA) signal, 150 μL of PSI fractions diluted to 250 μg of Chl/mL in the final resuspension buffer was absorbed on a nitrocellulose filter (Millipore Corp., AA type, 0.8 μm pore size) in the presence of 5 mM ascorbate and 0.3 mM 2,6-dichlorophenolindophenol (DCIP). The filter was cut to the proper dimensions for introduction in the PA cell (MTEC Photoacoustic, Ames, IA, USA). PA measurements were made with a laboratory-built PA spectrometer (34). The light beam from a 150 W xenon lamp (ILC Technology, Sunnyvale, CA, USA) passing through a monochromator (Photon Technology International Inc., Brunswick, NJ, USA, model PTI 101-001SF) to obtain light at 680 nm was modulated with a mechanical chopper at a frequency of 35 Hz. The light intensity was controlled with neutral density filters. Saturating background illumination (150 W/m^2) from a KL1500 projector (Walz, Effeltrich, Germany) was used to completely oxidize P700, thus converting all PSI reaction centers into a photochemically inactive state.

6.5 Results

Figure 6.2 shows the fluorescence emission spectra of photosystem I submembrane fractions in the absence of additive or in the presence of various concentrations of exogenous plastoquinone molecules (PQ_{ex}). The spectra of untreated PSI submembrane fractions showed a maximum at 684 nm and a shoulder around 725 nm, as described before (27, 35). Addition of a low concentration (0.2 μM) of dPQ or PQ-2 quenched 14% and 7% of the fluorescence spectra, respectively. The importance of the fluorescence quenching increased with amount of PQ_{ex} added, and at 15 μM up to 70% of the emission was lost. Also, the extent of the quenching was similar for all wavelengths of the emission spectra. However, addition of various concentrations of

PQ-9, the type of PQ found in vivo in thylakoids, could only slightly quench the emission spectra of PSI (not shown). It should be noted that added quinones did not alter the absorption properties of the PSI submembrane fractions.

Variation of fluorescence quenching can be described by the Stern-Volmer law (36):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (1)$$

where F_0 and F are the Chl fluorescence emission integrated from 640 to 800 nm in the absence or in the presence of PQ_{ex} , respectively, K_{SV} is the Stern-Volmer quenching constant, and $[Q]$ is the concentration of the fluorescence quencher, which is PQ_{ex} in the present case and will be therefore replaced by $[PQ_{ex}]$. However, the relationship between F_0/F and $[PQ_{ex}]$ is not linear when a fraction of the fluorescence is not accessible to the quencher (23). This condition was observed in our experiments (not shown). However, the Stern-Volmer equation can be modified to take into account the fluorescence accessible ($F_{0,a}$) and inaccessible ($F_{0,i}$) to the quencher. The fluorescence in the absence of quencher becomes:

$$F_0 = F_{0,a} + F_{0,i} \quad (2)$$

Thus, the fraction of fluorescence accessible to the quencher (f_a) is defined as:

$$f_a = \frac{F_{0,a}}{F_0} \quad (3)$$

The above gives rise to a modified Stern-Volmer equation (23, 37, 38):

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{1}{f_a K_{SV}[PQ_{ex}]} + \frac{1}{f_a} \quad (4)$$

where ΔF is the fluorescence intensity difference in the absence and presence of PQ_{ex} .

By plotting $\frac{F_0}{\Delta F}$ against $[PQ_{ex}]^{-1}$, f_a is found from the intercept, which is f_a^{-1} , and K_{SV} is obtained from the slope of the graph ($f_a^{-1}K_{SV}^{-1}$). K_{SV} characterizes the efficiency of the quencher.

Figure 6.2C shows that the modified Stern-Volmer equation provided linear traces for dPQ and PQ-2. In both cases, f_a values were 0.7 and a K_{SV} of $1.25 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ and $0.55 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ was calculated for dPQ and PQ-2, respectively.

The quenching of Chl excited states by PQ_{ex} should limit the yield of exciton transfer between Chl molecules in the antenna and affect the rate of P700 photooxidation, particularly under non-saturating illumination. Figure 6.3 shows the traces of ΔA_{830} induced by low irradiance (4.6 W/m^2) in PSI submembrane fractions. Positive changes in ΔA_{830} indicate photooxidation of P700. Increasing concentrations of added dPQ from $15 \text{ }\mu\text{M}$ to $300 \text{ }\mu\text{M}$ decreased the rate of P700 photooxidation, which delayed the establishment of a stable and complete level of P700 photooxidation. However, the total magnitude of ΔA_{830} was not significantly altered by the addition of dPQ. P700 photooxidation kinetics were fitted with a first-order kinetics to verify its dependency on the concentration of added dPQ. The rate constant of P700 photooxidation decreased with the concentration of added dPQ from 0 to $300 \text{ }\mu\text{M}$ and an almost optimal effect was observed at $50 \text{ }\mu\text{M}$ oxidized quinone. (Figure 6.3, inset). It should be noted that the Chl concentration was more than 10 times higher compared to the fluorescence experiments. This explains why a higher concentration of exogenous dPQ was needed to obtain a significant effect on the P700 photooxidation. $30 \text{ }\mu\text{M}$ of PQ-2 and dPQ retarded similarly the P700 photooxidation, while PQ-9 did not induce significant changes in the P700 photooxidation kinetics (Figure 6.3B).

As PQ_{ex} were shown to decrease the yield of radiative dissipation of Chl excited states in the antenna and to slow the delivery of excitons to the PSI reaction center, an alternative dissipative pathway must be favored, which should be thermal dissipation. To confirm this hypothesis, photoacoustic spectroscopy was used to monitor thermal dissipation. Heat release was studied at various measuring light intensities in either the absence or the presence of $150 \text{ }\mu\text{M}$ dPQ. The modulated measuring beam was used to obtain a steady state of thermal dissipation (Q_c) under a different level of nonsaturating PSI excitation (Figure 6.4, Inset). Under these conditions, the modulated beam caused the closing of part of the reaction centers, the fraction of closed centers increasing with

measuring beam intensity. Therefore, only part of the absorbed energy was stored in photochemical reactions and thus not released. Then, strong nonmodulated white light was applied to completely oxidize P700, thus converting all PSI RC into a photochemically inactive state. Consequently, the fraction of absorbed modulated light energy converted into thermal emission reached its maximal level (Q_m). Turning off the saturating white light brought back the PA signal to its steady state Q_c (Figure 6.4, inset). Using the values of Q_c and Q_m , the photosynthetic energy storage yield (ϕ_I) at a given modulated light intensity can be calculated (39-41):

$$\phi_I = \frac{(Q_m - Q_c)}{Q_m} \times 100\% \quad (5)$$

As the fraction of closed reaction centers increased with the intensity of modulated light, the fraction of absorbed energy used for photochemical reactions as measured by ϕ_I also decreased. As a result, for both untreated and treated (150 μ M dPQ) PSI, ϕ_I decreased by about 40-45% as light intensity was raised from 1.1 to 10.2 W/m² (Figure 6.4). However, ϕ_I was smaller for dPQ treated PSI than in control at all light intensities.

To characterize further the effect of PQ_{ex} on the PA signal, the relationship between the energy storage yield and the measuring beam intensity (I) was studied. Plotting the reciprocal of ϕ_I versus I leads to a linear relationship where the intercept represents the maximal photosynthetic energy storage yield (ϕ_m) extrapolated to a modulated light intensity of zero, thus when all reactions centers are in the open state (42). Further extrapolation of the relation to the abscissa provides the modulated light intensity that closes half of the photosystems (i_{50}). This relationship corresponds to the following equation:

$$\frac{1}{\phi_I} = \frac{1}{\phi_m} \left(\frac{I}{i_{50}} + 1 \right) \quad (6)$$

where the slope is $(\phi_m i_{50})^{-1}$ (42).

Figure 6.4 shows the ϕ_I^{-1} vs I plot for PSI in the absence or presence of 150 μM dPQ. Both untreated and treated PSI had the same slope, but addition of dPQ increases the value of the intercept. This corresponds to a decrease of the maximal photosynthetic energy storage yield from 36% to 29% for control and dPQ-treated PSI, respectively, while the i_{50} increased from 8.5 W/m^2 to 10 W/m^2 . The above indicates an inhibition of energy storage by about 20% at the dPQ concentration used. This seems a weak inhibition compare to the strong fluorescence quenching reported in Figure 6.2. However, this can be expected as the final effective concentration of added dPQ during PA measurements is difficult to estimate. Indeed, a fraction of solubilized dPQ is lost by aspiration of the liquid medium during the filtration of the PSI preparations on the nitrocellulose filter (42) and the final concentration of PSI in terms of Chl concentration becomes very high thus leading to a low dPQ/Chl ratio.

Even though the above data demonstrate that exogenous PQ molecules added to isolated PSI submembrane fractions influence energy dissipation of PSI, it would be interesting to verify the impact of the endogenous PQ pool on PSI in a more intact and complete system such as whole thylakoid membranes. The endogenous PQ pool of thylakoid membranes can be specifically reduced under anaerobiosis by the addition of NADPH (43, 44). Reduction of the PQ pool by NADPH was shown to produce a strong increase in the amplitude of the O-J rise of Chl FI observed within the first milliseconds of illumination (data not shown) (43, 44).

At room temperature, fluorescence measurements in thylakoids are mainly influenced by PSII (45, 46). Such measurements are efficient to probe the PQ redox state but cannot give clear information about the influence of PQ on PSI. Nonetheless, the unique spectral properties of red Chl present only in PSI can be used to distinguish between PSII and PSI contributions to the emission spectra of thylakoids at cryogenic temperature. At room temperature, PSII fluorescence from vibrational sublevels overlaps with red Chl fluorescence of PSI at 720-750 nm, and PSI contributions can hardly be separated from PSII (47). At cryogenic temperature, the vibrational bands of PSII fluorescence are lost and PSI fluorescence comes from its red Chl, because uphill energy

transfer from red Chl to bulk antenna Chl is not efficient at this temperature. Hence, two clearly separated emission bands emerge at 680 and 735 nm, coming from PSII and PSI, respectively (48-51). Therefore, NADPH can be used to reduce the endogenous PQ pool in whole thylakoid membranes and the subsequent 77 K fluorescence emission spectra will show the effect of oxidized vs reduced PQ pool on the quenching of Chl excited state for both PSII and PSI.

Figure 6.5A shows that reduction of the endogenous PQ pool by NADPH increased both PSII and PSI emission bands by about 40% and 65%, respectively. Conversely, 1 μ M of added dPQ quenched about 45% of both PSII and PSI fluorescence. The action of added dPQ was reversed if thylakoids were incubated in the presence of both NADPH and dPQ, which yields to an increased emission spectrum similar to thylakoids incubated in the presence of NADPH alone.

Moreover, the ability of oxidized dPQ_{ox} to retard P700 photooxidation in isolated thylakoids under low irradiance (4.6 W/m²) is demonstrated in Figure 6.5B. As observed in PSI submembrane fractions, increasing concentrations of added dPQ decreased the rate of P700 photooxidation. The decrease in its first-order rate constant was similar to what was observed with PSI submembrane fractions (Figure 6.5B, inset).

6.6 Discussion

A number of special mechanisms are known to control energy utilization in photosynthesis by modulating heat dissipation of PSII (14). These mechanisms provide the flexibility needed by the photosynthetic apparatus to adapt itself to a wide variety of environmental light conditions and to limit photoinhibitory damage (15, 20). However, little is known about PSI contribution to regulative and photoprotective mechanisms, and this subject is rarely discussed in the literature (22, 52). This is mainly because PSI activity is thought to be only indirectly controlled by the regulation of PSII activity (20). Nonetheless, addition of artificial quinones such as dibromothymoquinone (DBMIB), 2,5-dichloro-*p*-benzoquinone (DCBQ), and duroquinone (DQ) were recently shown to quench the excited states of Chl in PSI submembrane fractions (27). To our knowledge,

the present study is the first to show that exogenous and endogenous plastoquinone molecules may control the utilization of absorbed light energy in PSI.

Among the different types of plastoquinone used, PQ-9 did not exhibit any significant effect on PSI fluorescence or P700 photooxidation (Figure 6.3). The same absence of effect of PQ-9 was also previously observed by Bojko and co-workers (53, 54) when they assessed the reduction of different quinones by FNR. The above is explained by the formation of micelles by PQ-9 molecules in the polar measurement buffer owing to their long aliphatic chain (Figure 6.1), which prevented them to interact efficiently with the photosynthetic membrane.

Addition of dPQ and PQ-2 caused an important decrease in the fluorescence emission spectra of PSI submembrane fractions. This fluorescence quenching was well described by the modified Stern-Volmer equation (Figure 6.2), which takes into account that a part of the fluorescence is not accessible to the quencher (23). The Stern-Volmer constants found, quantifying the quencher efficiency, were twice to four times higher than those found by Rajagopal *et al.* (27) for the most efficient artificial quinone tested, DBMIB. The PSI submembrane fractions used in the present study are composed of about 260 Chl/RC and 11 endogenous PQ/RC (30). The impact of the addition of 11 dPQ/RC, corresponding to about 0.25 μ M dPQ, can be estimated from Figure 6.2C and results into a nearly 20% quenching of the PSI fluorescence, which points toward a possible physiological significance of the endogenous PQ pool effects on PSI energy dissipation.

As shown by Rajagopal *et al.* (27), the quenching of Chl excited states of PSI observed in fluorescence spectra leads also to a delay in the P700 photooxidation measured under limiting light. The same effect was observed in this study in the presence of exogenous dPQ or PQ-2 (Figure 6.3). This indicates that oxidized PQ_{ex} molecules in the neighborhood of PSI retard the migration of excitons between antenna Chls toward the RC by increasing the probability of nonradiative dissipation of their

excited state. The above was confirmed by the measurement of heat dissipation using photoacoustic spectroscopy.

Photoacoustic measurements under different light intensities permit the simultaneous assessment of heat dissipation and photosynthetic capacity of PSI. Exogenous dPQ produced a decrease in the energy storage yield (ϕ_I) and an increase in the half-saturation light intensity of energy storage (i_{50}) (Figure 6.4). These changes are due to an increase of thermal dissipation under nonsaturating illumination in the presence of exogenous dPQ owing to the capacity of oxidized dPQ to statically quench the Chl excited states in PSI antennas. In Figure 6.4, the photoacoustic data lead to parallel slopes of ϕ_I vs I relationships for untreated and dPQ_{ex}-treated PSI. The above shows that the addition of oxidized dPQ to PSI submembrane fractions mimics a decrease in the measuring light intensity because it increased the fraction of absorbed light energy dissipated as heat before it can reach a reaction center. Then, for the same measuring light intensity, the energy storage yield was decreased after the addition of oxidized dPQ.

The most striking observation of this work is the demonstration of the increased PSI fluorescence in whole thylakoid membranes at 77 K, where the contribution of PSII and PSI can be clearly distinguished, upon reduction of the endogenous PQ pool by NADPH (Figure 6.5). This effect cannot be attributed to state transition as no ATP needed for LHCII phosphorylation was added to the thylakoids and the maximal level of fluorescence (F_m) measured by fluorescence induction rise was not significantly affected by the incubation of thylakoids in the presence of NADPH (data not shown) (55, 56). Additionally, the retardation of P700 photooxidation by dPQ_{ex} measured in PSI submembrane fractions was also observed in isolated thylakoids (Figure 6.5B). Clearly, the redox state of the endogenous PQ pool can have a significant effect on PSI energy dissipation. An illustration of the action of oxidized PQ on Chl excited states of PSI antennas is presented in Figure 6.6.

It is likely that endogenous PQ molecules are in contact with the antenna of PSI complexes in the thylakoid membranes. Even if rapid diffusion of PQ is thought to be limited to small microdomains close to PSII, slow long-range diffusion is also expected (57). Joliot *et al.* (58) observed a slow redistribution of PQ molecules between granal and stromal pools with a half-time of 6 s. Thus, the redox state of PQ in the vicinity of PSI can influence PSI reactions *in vivo*.

The observed effects of the PQ pool could contribute to light adaptation and photoprotection. Under some stress conditions, like freezing stress or heat stress, the Benson-Calvin cycle is partially inhibited (59, 60), resulting in an accumulation of NADPH. This would indeed result in the accumulation of reduced PQ molecules through the action of NADPH dehydrogenase, Fd-quinone oxidoreductase pathway, or FNR diaphorase activity. Oppositely to oxidized PQ molecules, these reduced PQs would contribute to increase the photosynthetic capacity of PSI required to activate the cyclic electron transport (CET). The latter is known to rapidly increase the proton gradient across the thylakoid membranes, resulting in the activation of photoprotective energy-dependent NPQ mechanisms (61, 62). Moreover, reduced PQs are known as efficient scavengers of superoxide ions generated in thylakoid membranes during light stress (63) and would then additionally contribute to a direct photoprotective effect.

The influence of the redox state of the endogenous PQ pool on the fluorescence of PSI could also introduce some artefacts in the measurements of variable Chl fluorescence, which was attributed exclusively to PSII. In intact leaves, PSI can contribute up to 40% of F_0 and 14% of F_m for emission wavelength higher than 700 nm (45). If the redox state of the PQ pool is affected by a treatment prior to the measurement or during a measurement over a sufficient time scale, some changes in the fluorescence pattern could be wrongly attributed to PSII. However, the variable part of the fluorescence induction rise within the first second of excitation should not be affected by the effects of PQ on PSI since the redistribution of the PQ molecules in the thylakoid membranes operates with a half time of 6 s (58).

In conclusion, the present study shows that the redox state of the endogenous PQ pool has a significant influence in the balance of PSI dissipative pathways. This mechanism is likely to improve the maximal PSI activity under conditions where PSII activity is high and could contribute to an enhancement of the PSI turnover rate when CET routes are favored.

6.7 Acknowledgments

The authors thank Dr. Jerzy Kruk for providing PQ molecules and Johanne Harnois for helpful professional assistance. D.J. was recipient of graduate fellowships from Fonds Québécois de Recherche sur la Nature et les Technologies and NSERC.

6.8 References

1. Chitnis, P. R. (2001) Photosystem I: Function and Physiology, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 593-626.
2. Herrmann, R. G. (1999) Biogenesis and Evolution of Photosynthetic (Thylakoid) Membranes, *Biosci. Rep.* 19, 355-365.
3. Ben-Shem, A., Frolow, F., and Nelson, N. (2003) Crystal structure of plant photosystem I, *Nature* 426, 630-635.
4. Jordan, P., Fromme, P., Witt, H. T., Klukas, O., Saenger, W., and Krausz, N. (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5Å resolution, *Nature* 411, 909-917.
5. Ganeteg, U., Strand, A., Gustafsson, P., and Jansson, S. (2001) The Properties of the Chlorophyll a/b-Binding Proteins Lhca2 and Lhca3 Studied in Vivo Using Antisense Inhibition, *Plant Physiol.* 127, 150-158.
6. Jansson, S., Andersen, B., and Scheller, H. V. (1996) Nearest-Neighbor Analysis of Higher-Plant Photosystem I Holocomplex, *Plant Physiol.* 112, 409-420.

7. Kargul, J., Nield, J., and Barber, J. (2003) Three-dimensional Reconstruction of a Light-harvesting Complex I- Photosystem I (LHCI-PSI) Supercomplex from the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Insights into light harvesting for PSI, *J. Biol. Chem.* 278, 16135-16141.
8. Melkozernov, A. N. (2001) Excitation energy transfer in Photosystem I from oxygenic organisms, *Photosynth. Res.* 70, 129-153.
9. Gobets, B. and van Grondelle, R. (2001) Energy transfer and trapping in photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta* 1507, 80-99.
10. van Grondelle, R., Dekker, J. P., Gillbro, T., and Sundstrom, V. (1994) Energy transfer and trapping in photosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta* 1187, 1-65.
11. Sun, A. S. K. and Sauer, K. (1971) Pigment systems and electron transport in chloroplasts I. Quantum requirements for the two light reactions in spinach chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta* 234, 399-414.
12. Buschmann, C. and Kocsányi, L. (1989) Light-induced heat production correlated with fluorescence and its quenching mechanisms, *Photosynth. Res.* 21, 129-136.
13. Butler, W. L. (1978) Energy Distribution in the Photochemical Apparatus of Photosynthesis, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 29, 345-378.
14. Horton, P., Ruban, A. V., and Walters, R. G. (1996) Regulation of light harvesting in green plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 655-684.
15. Muller, P., Li, X. P., and Niyogi, K. K. (2001) Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy, *Plant Physiol.* 125, 1558-1566.
16. Demmig-Adams, B. and Adams III, W. W. (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis, *Trends Plant Sci.* 1, 21-26.

17. Osmond, B., Badger, M., Maxwell, K., Bjorkman, O., and Leegood, R. (1997) Too many photons: photorespiration, photoinhibition and photooxidation, *Trends Plant Sci.* 2, 119-121.
18. Allen, J. F. (1992) Protein-Phosphorylation in Regulation of Photosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta* 1098, 275-335.
19. Haldrup, A., Jensen, P. E., Lunde, C., and Scheller, H. V. (2001) Balance of power: a view of the mechanism of photosynthetic state transitions, *Trends Plant Sci.* 6, 301-305.
20. Ort, D. R. (2001) When There Is Too Much Light, *Plant Physiol.* 125, 29-32.
21. Bukhov, N. G. and Carpentier, R. (2003) Measurement of photochemical quenching of absorbed quanta in photosystem I of intact leaves using simultaneous measurements of absorbance changes at 830 nm and thermal dissipation, *Planta* 216, 630-638.
22. Rajagopal, S., Bukhov, N. G., Tajmir-Riahi, H. A., and Carpentier, R. (2003) Control of energy dissipation and photochemical activity in photosystem I by NADP-dependent reversible conformational changes, *Biochemistry* 42, 11839-11845.
23. Karukstis, K. K., Boegeman, S. C., Fruetel, J. A., Gruber, S. M., and Terris, M. H. (1987) Multivariate analysis of Photosystem II fluorescence quenching by substituted benzoquinones and naphthoquinones, *Biochim. Biophys. Acta* 891, 256-264.
24. Vasil'ev, S., Wiebe, S., and Bruce, D. (1998) Non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in photosynthesis. 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone in spinach thylakoids as a model for antenna based quenching mechanisms, *Biochim. Biophys. Acta* 1363, 147-156.

25. Vernotte, C., Etienne, A. L., and Briantais, J.-M. (1979) Quenching of the system II chlorophyll fluorescence by the plastoquinone pool, *Biochim. Biophys. Acta* 545, 519-527.
26. Boisvert, S., Joly, D., and Carpentier, R. (2006) Quantitative analysis of the experimental O-J-I-P chlorophyll fluorescence induction kinetics. Apparent activation energy and origin of each kinetic step, *FEBS J.* 273, 4770-4777.
27. Rajagopal, S., Egorova, E. A., Bukhov, N. G., and Carpentier, R. (2003) Quenching of excited states of chlorophyll molecules in submembrane fractions of Photosystem I by exogenous quinones, *Biochim. Biophys. Acta* 1606, 147-152.
28. Jansson, S. (1999) A guide to the Lhc genes and their relatives in Arabidopsis, *Trends Plant Sci.* 4, 236-240.
29. Lee, J. W., Zipfel, W., and Owens, T. G. (1992) Quenching of chlorophyll excited states in photosystem I by quinones : Stern-Volmer analysis of fluorescence and photochemical yield, *J. Lumin.* 51, 79-89.
30. Peters, F. A. L. J., Van Spanning, R., and Kraayenhof, R. (1983) Studies on well coupled Photosystem I-enriched subchloroplast vesicles. Optimization of ferredoxin-mediated cyclic photophosphorylation and electric potential generation, *Biochim. Biophys. Acta* 724, 159-165.
31. Boucher, N., Harnois, J., and Carpentier, R. (1990) Heat-stress stimulation of flow in a photosystem I submembrane fraction, *Biochem. Cell. Biol.* 68, 999-1004.
32. Porra, R. J., Thompson, W. A., and Kriedemann, P. E. (1989) 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, 384-394.

33. Rajagopal, S., Bukhov, N. G., and Carpentier, R. (2002) Changes in the structure of chlorophyll-protein complexes and excitation energy transfer during photoinhibitory treatment of isolated photosystem I submembrane particles, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 67, 194-200.
34. Velitehkova, M. Y. and Carpentier, R. (1994) Variable thermal dissipation in a Photosystem I submembrane fraction, *Photosynth. Res.* 40, 263-268.
35. Rajagopal, S., Joly, D., Gauthier, A., Beauregard, M., and Carpentier, R. (2005) Protective effect of active oxygen scavengers on protein degradation and photochemical function in photosystem I submembrane fractions during light stress, *FEBS J.* 272, 892-902.
36. Valeur, B. (2002) *Molecular fluorescence: principles and applications*, Wiley-VCH, Weinheim.
37. Lakowicz, J. R. (1983) *Principles of fluorescence spectroscopy*, Plenum Press, New York.
38. Lehrer, S. S. (1971) Solute perturbation of protein fluorescence. The quenching of the tryptophyl fluorescence of model compounds and of lysozyme by iodide ion, *Biochemistry* 10, 3254-3263.
39. Carpentier, R., Larue, B., and Leblanc, R. M. (1984) Photoacoustic spectroscopy of *Anacystis nidulans* III. Detection of photosynthetic activities, *Arch. Biochem. Biophys.* 228, 534-543.
40. Malkin, S. and Cahen, D. (1979) Photoacoustic spectroscopy and radiant energy conversion: Theory of the effect with special emphasis on photosynthesis, *Photochem. Photobiol.* 29, 803-813.
41. Malkin, S. (2000) The photoacoustic effect in leaves and its applications, in *Probing photosynthesis: Mechanisms, regulation and adaptation* (Yunus, M., Pathre, U., and Mohanty, P., Eds.) pp 484-524, Taylor & Francis, London.

42. Carpentier, R., Leblanc, R. M., and Mimeault, M. (1989) Photoacoustic detection of photosynthetic energy storage in Photosystem II submembrane fractions, *Biochim. Biophys. Acta* 975, 370-376.
43. Haldimann, P. and Tsimilli-Michael, M. (2002) Mercury inhibits the non-photochemical reduction of plastoquinone by exogenous NADPH and NADH: evidence from measurements of the polyphasic chlorophyll a fluorescence rise in spinach chloroplasts, *Photosynth. Res.* 74, 37-50.
44. Haldimann, P. and Tsimilli-Michael, M. (2005) Non-photochemical quenching of chlorophyll a fluorescence by oxidized plastoquinone: new evidences based on modulation of the redox state of the endogenous plastoquinone pool in broken spinach chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta* 1706, 239-249.
45. Franck, F., Juneau, P., and Popovic, R. (2002) Resolution of the Photosystem I and Photosystem II contributions to chlorophyll fluorescence of intact leaves at room temperature, *Biochim. Biophys. Acta* 1556, 239-246.
46. Lazar, D. (2006) The polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light, *Funct. Plant Biol.* 33, 9-30.
47. Franck, F., Dewez, D., and Popovic, R. (2005) Changes in the room-temperature emission spectrum of chlorophyll during fast and slow phases of the Kautsky effect in intact leaves, *Photochem. Photobiol.* 81, 431-436.
48. Bredenkamp, G. J. and Baker, N. R. (1990) Modification of excitation energy distribution to photosystem I by protein phosphorylation and cation depletion during thylakoid biogenesis in wheat, *Photosynth. Res.* 23, 111-117.
49. Siffel, P., Hunalova, I., and Rohacek, K. (2000) Light-induced quenching of chlorophyll fluorescence at 77 K in leaves, chloroplasts and Photosystem II particles, *Photosynth. Res.* 65, 219-229.

50. Percival, M. P. and Baker, N. R. (1985) Comparison of chlorophyll fluorescence emission characteristics of wheat leaf tissue and isolated thylakoids as a function of excitation wavelength, *Plant, Cell Environ.* 8, 41-48.
51. Samson, G. and Bruce, D. (1995) Complementary changes in absorption cross-sections of Photosystems I and II due to phosphorylation and Mg²⁺-depletion in spinach thylakoids, *Biochim. Biophys. Acta* 1232, 21-26.
52. Bukhov, N. G., Rajagopal, S., and Carpentier, R. (2002) Characterization of P700 as a photochemical quencher in isolated Photosystem I particles using simultaneous measurements of absorbance changes at 830 nm and photoacoustic signal, *Photosynth. Res.* 74, 295-302.
53. Bojko, M. and Wieckowski, S. (1999) NADPH and ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase-dependent reduction of quinones and their reoxidation, *Phytochemistry* 50, 203-208.
54. Bojko, M., Kruk, J., and Wieckowski, S. (2003) Plastoquinones are effectively reduced by ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase in the presence of sodium cholate micelles Significance for cyclic electron transport and chlororespiration, *Phytochemistry* 64, 1055-1060.
55. Bellafore, S., Barneche, F., Peltier, G., and Rochaix, J. D. (2005) State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7, *Nature* 433, 892-895.
56. Zer, H., Vink, M., Shochat, S., Herrmann, R. G., Andersson, B., and Ohad, I. (2003) Light Affects the Accessibility of the Thylakoid Light Harvesting Complex II (LHCII) Phosphorylation Site to the Membrane Protein Kinase(s), *Biochemistry* 42, 728-738.
57. Kirchhoff, H., Horstmann, S., and Weis, E. (2000) Control of the photosynthetic electron transport by PQ diffusion microdomains in thylakoids of higher plants, *Biochim. Biophys. Acta* 1459, 148-168.

58. Joliot, P., Lavergne, J., and Beal, D. (1992) Plastoquinone compartmentation in chloroplasts .1. Evidence for domains with different rates of photo-reduction, *Biochim. Biophys. Acta* 1101, 1-12.
59. Susanne, R., Christoph, G., and Krause, G. H. (1987) Inactivation of the photosynthetic carbon reduction cycle in isolated mesophyll protoplasts subjected to freezing stress, *Photosynth. Res.* 14, 137-145.
60. David Law, R. and Crafts-Brandner, S. J. (1999) Inhibition and Acclimation of Photosynthesis to Heat Stress Is Closely Correlated with Activation of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase, *J. Plant. Physiol.* 120, 173-182.
61. Miyake, C., Shinzaki, Y., Miyata, M., and Tomizawa, K. i. (2004) Enhancement of Cyclic Electron Flow Around PSI at High Light and its Contribution to the Induction of Non-Photochemical Quenching of Chl Fluorescence in Intact Leaves of Tobacco Plants, *Plant Cell Physiol.* 45, 1426-1433.
62. Miyake, C., Horiguchi, S., Makino, A., Shinzaki, Y., Yamamoto, H., and Tomizawa, K. i. (2005) Effects of Light Intensity on Cyclic Electron Flow Around PSI and its Relationship to Non-photochemical Quenching of Chl Fluorescence in Tobacco Leaves, *Plant Cell Physiol.* 46, 1819-1830.
63. Kruk, J., Jemiola-Rzeminska, M., Burda, K., Schmid, G. H., and Strzalka, K. (2003) Scavenging of superoxide generated in photosystem I by plastoquinol and other prenyllipids in thylakoid membranes, *Biochemistry* 42, 8501-8505.

6.9 Figure Legends

Figure 6.1

Chemical structures of dPQ and PQ-*n*. Endogenous type of PQ corresponds to PQ-9.

Figure 6.2

Fluorescence emission spectra measured in isolated PSI submembrane fractions at room temperature with the addition of dPQ (A) or PQ-2 (B) at a concentration of 0 (1), 0.2 (2), 0.7 (3), 1.5 (4), 5 (5), and 15 μM (6). (C) Modified Stern-Volmer plots of Chl fluorescence quenching by dPQ (circles) or PQ-2 (triangles). Chl fluorescence was integrated from 640 to 800 nm using the emission spectra. For other details, see Materials and Methods.

Figure 6.3

Original traces of light-induced increase in absorbance at 830 nm measured in isolated PSI submembrane fractions (A) with the addition of 0 (1), 15 (2), 30 (3), and 300 μM (4) of dPQ or (B) with the addition of 30 μM of different types of PQ molecules. The upward arrow indicates actinic light turned on. Insert: Dependency of the photooxidation rate constant (k) on the concentration of added dPQ. Traces of light-induced increase in ΔA_{830} were fitted with first-order kinetics, and calculated values of k were normalized with the rate found for the control ($k_0 = 0.009 \text{ ms}^{-1}$).

Figure 6.4

Dependency of the energy storage yield (A) and the reciprocal of the energy storage yield (B) on the modulated light intensity for PSI submembrane fractions in the absence (open circles) or in the presence of 150 μM dPQ_{ex}. Inset: Photoacoustic signal from PSI submembrane fractions aspired on a nitrocellulose filter. Upward triangle indicates modulated light on. Upward and downward arrows indicate strong white light on and off, respectively.

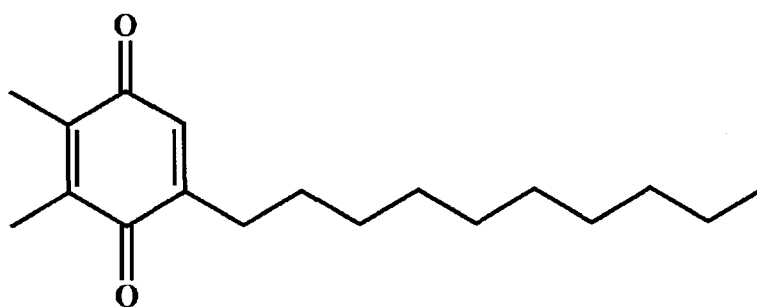
Figure 6.5

Influence of dPQ_{ex} on energy dissipation of PSI in thylakoid membranes. (A) Fluorescence emission spectra measured in isolated thylakoids at 77 K without additive (1) or in the presence of 500 μM NADPH (2), 1 μM dPQ (3), or both 500 μM NADPH and 1 μM dPQ (4). Incubation of the sample before measurement was carried out under anaerobiosis as described in Materials and Methods. (B) Original traces of light-induced increase in absorbance at 830 nm measured at room temperature in isolated thylakoids with the addition of 0 (1), 30 (2), 60 (3), and 100 μM (4) of dPQ. The upward arrow indicates actinic light turned on. Inset: Dependency of the photooxidation rate constant (k) on the concentration of added dPQ. Traces of light-induced increase in ΔA_{830} were fitted with first-order kinetics, and calculated values of k were normalized with the rate found for the control ($k_0 = 0.0034 \text{ ms}^{-1}$).

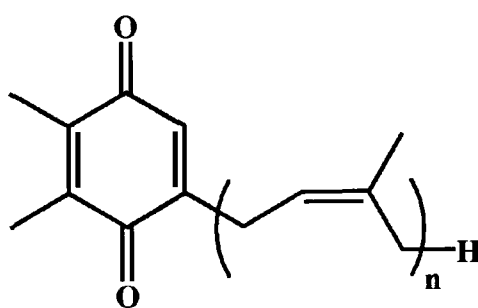
Figure 6.6

Incompetitive inhibition of the PSI energy storage yield by oxidized PQ (PQ_{ox}) molecules. Chl*, excited Chl; $h\nu$, photon.

Figure 6.1



dPQ



PQ-n

Figure 6.2

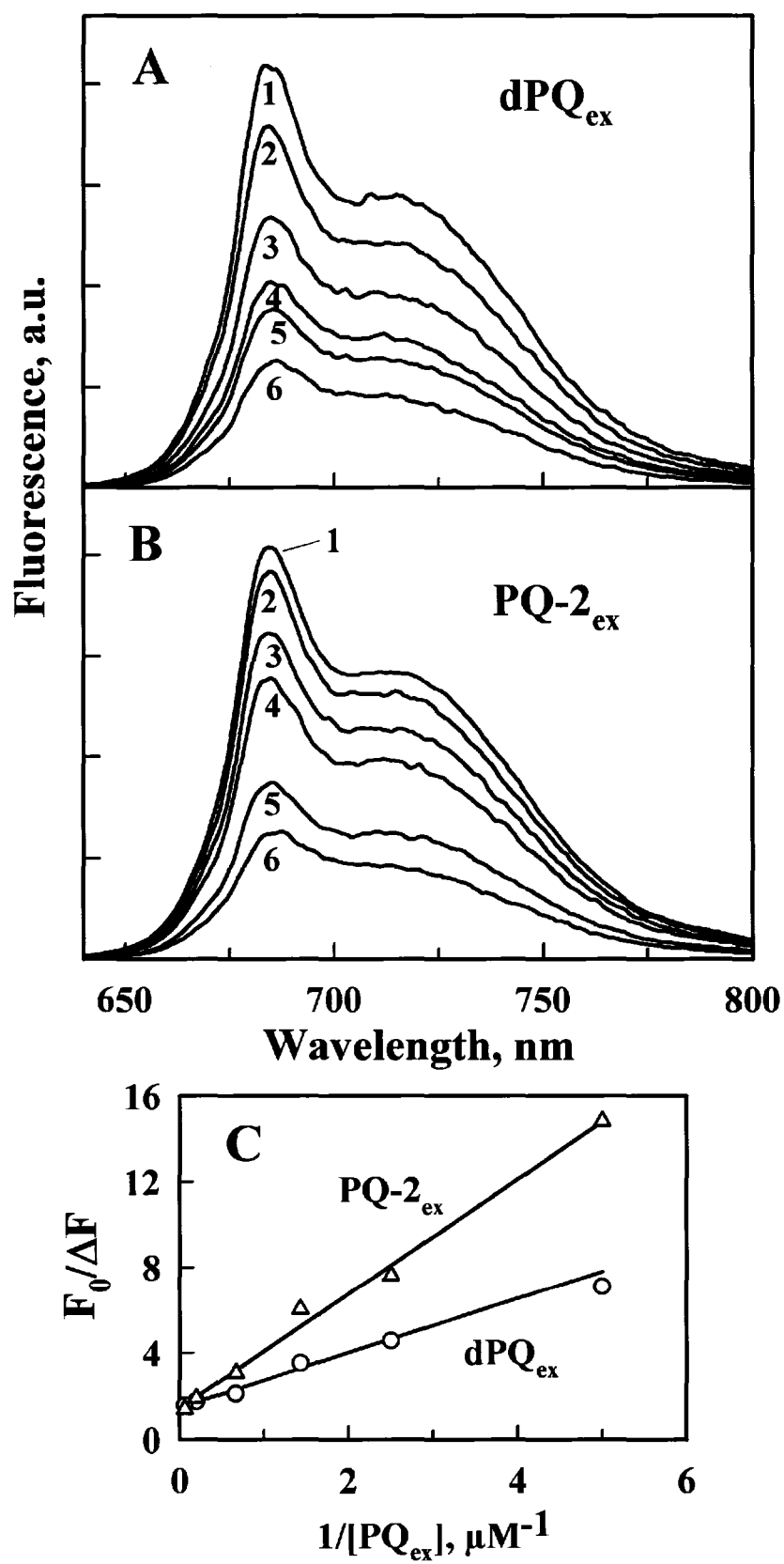


Figure 6.3

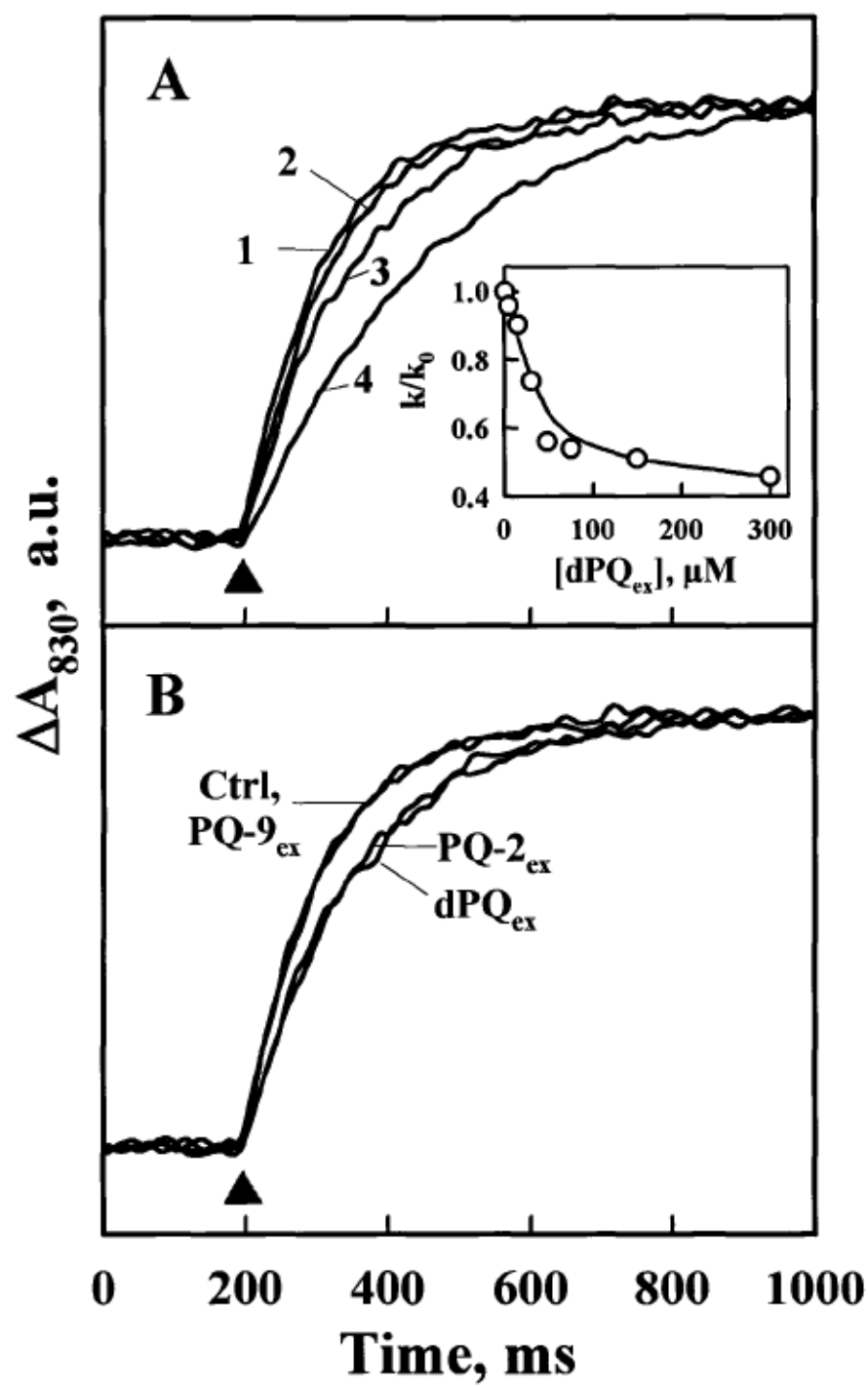


Figure 6.4

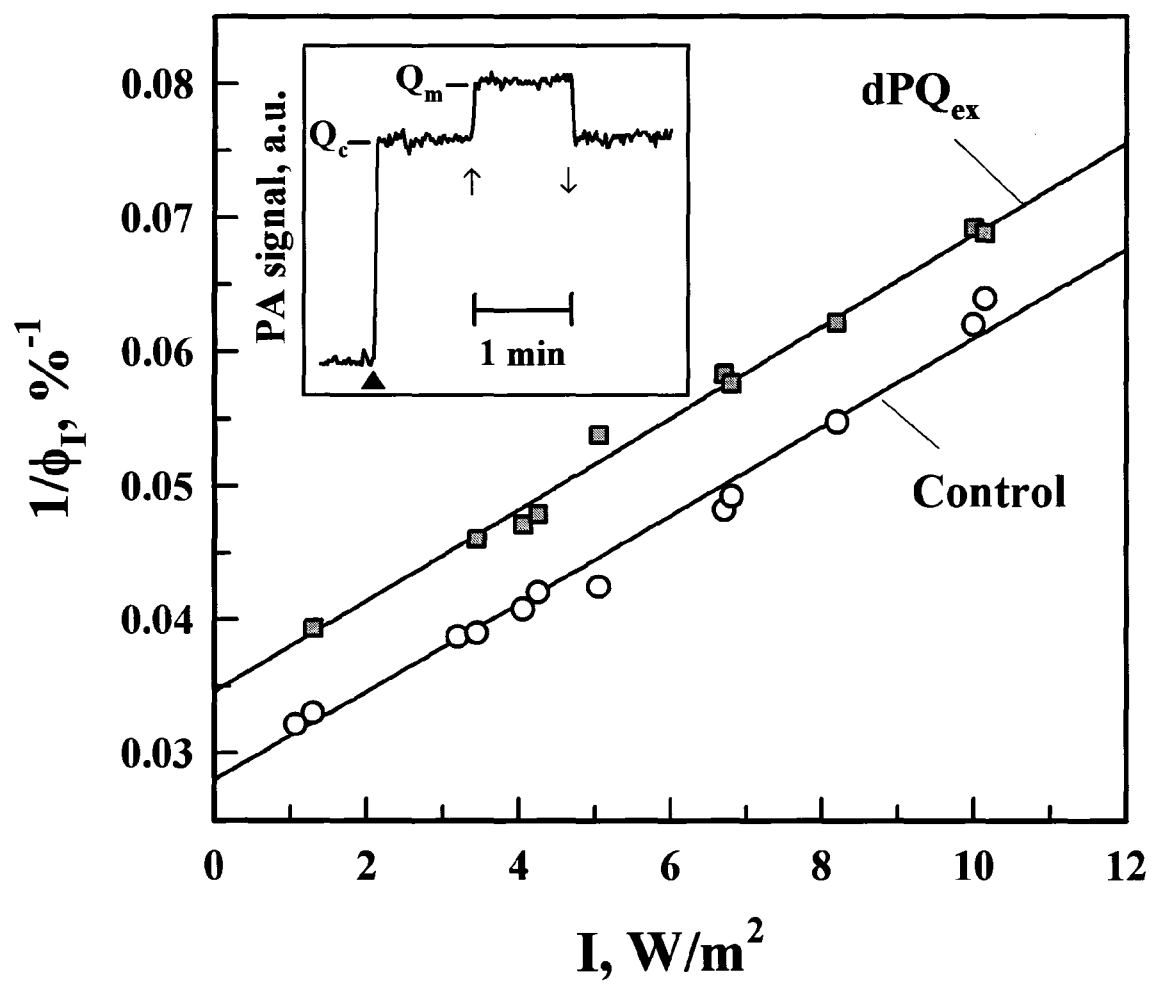


Figure 6.5

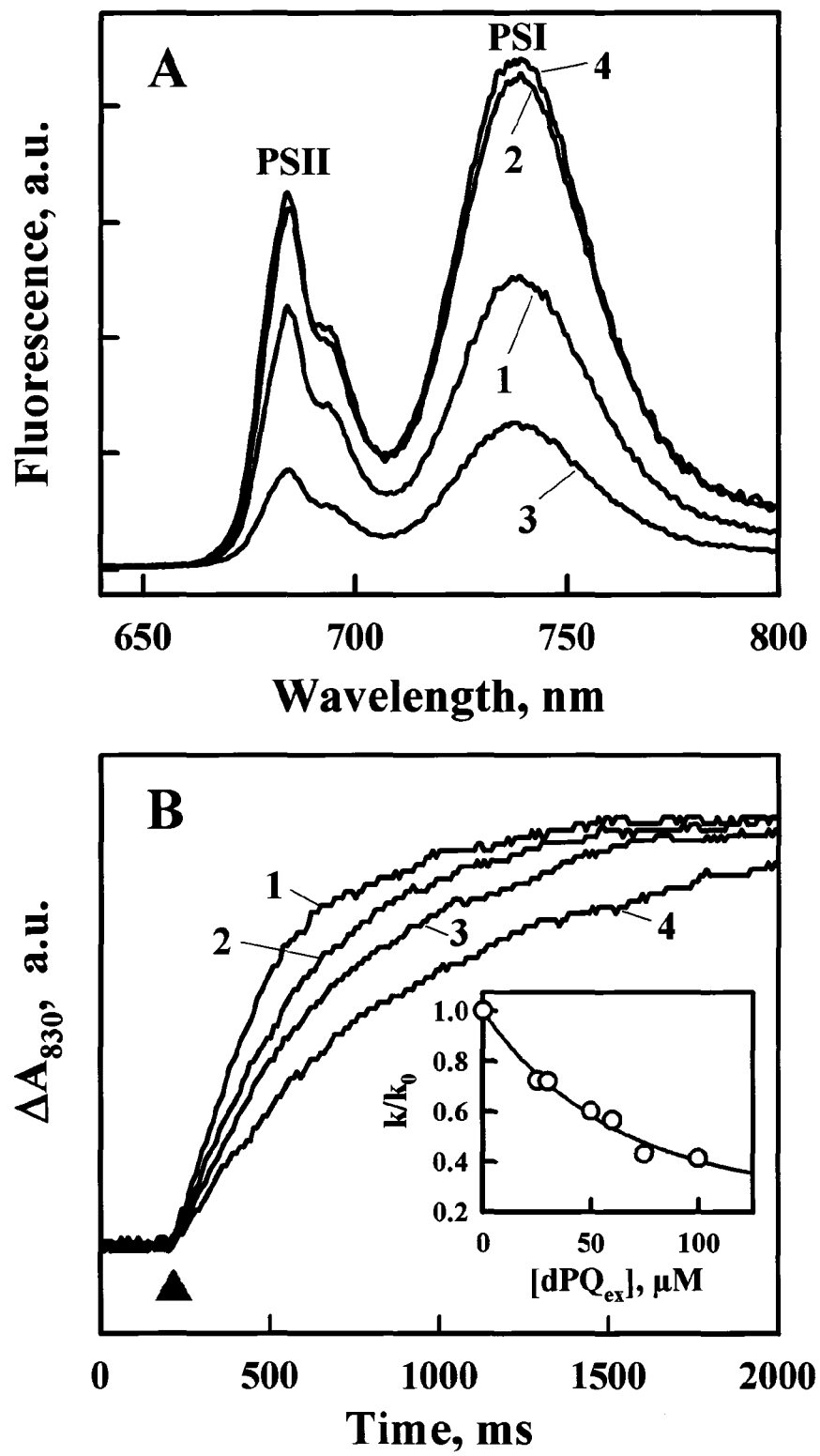
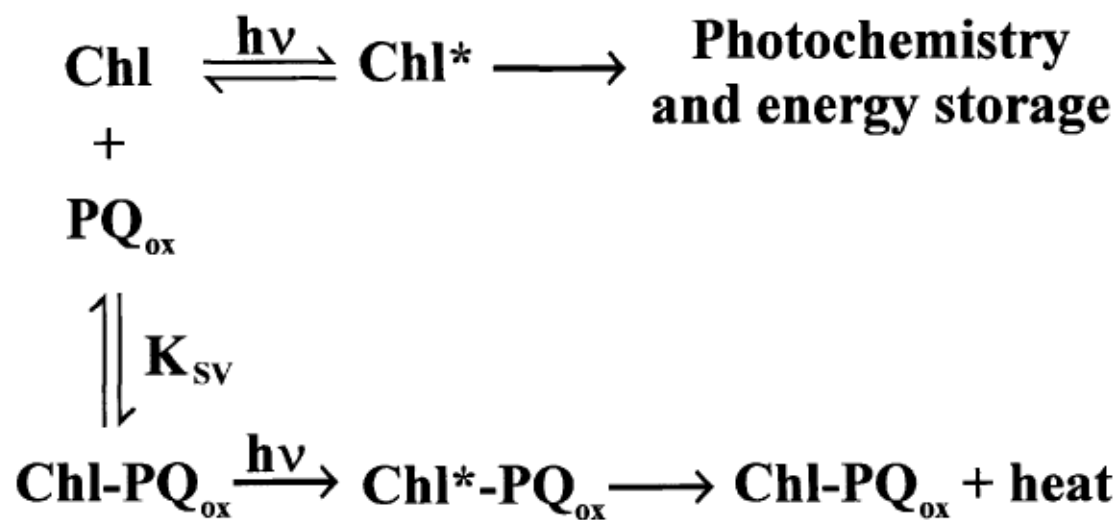


Figure 6.6



CHAPITRE VII

DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS

Le pool de PQ est un intermédiaire dans la chaîne de transport photosynthétique d'électrons qui occupe une place centrale dans sa régulation. Cette régulation de l'activité photosynthétique est primordiale pour assurer une adaptation et une optimisation de la photosynthèse aux conditions environnementales, tant à court qu'à long terme (41-43). Sans ces mécanismes, les plantes auraient des problèmes d'inefficacité et/ou de photoinhibition (44). Or, il a été montré que de nombreux mécanismes de dissipation d'énergie dépendent de l'état rédox du pool de PQ. Par exemple, la régulation à court terme dépend du quenching des états excités du PSII par les PQ oxydés et de la transition d'états (56, 99, 100). Quant à la régulation à plus long terme, l'expression génétique dans les chloroplastes est en partie régulée par l'état rédox du pool de PQ (101). Cependant, la plupart des mécanismes de régulation connus affectent principalement l'activité du PSII.

Les objectifs de la présente étude étaient de caractériser les effets des PQ sur la dissipation d'énergie des PSII et des PSI. Les résultats obtenus ont permis d'élucider principalement deux aspects de l'effet des PQ sur la photosynthèse. Le premier aspect consistait à éclaircir le rôle encore disputé de la réduction des PQ dans la cinétique d'induction de fluorescence des thylakoïdes. Le second aspect consistait à vérifier si l'état rédox du pool de PQ pouvait également avoir une importance dans la dissipation d'énergie du PSI. Les objectifs ont donc été atteints.

7.1 Oxydation/réduction du pool de PQ et induction de fluorescence des PSII

Dans les travaux des Chapitres III et IV, l'approche utilisée consistait à affecter principalement la phase I-P de l'induction de fluorescence, souvent attribuée à la réduction du pool de PQ (54, 63, 82), par l'ajout de différentes molécules à des membranes de thylakoïdes. Parmi celles-ci, le TMPD a été utilisé. Cet agent rédox est d'intérêt particulier pour l'induction de fluorescence : la mesure de l'IF de thylakoïdes

en présence de TMPD par Bukhov *et al.* (83) a permis pour la première fois d'y voir une séparation claire entre les phases J-I et I-P, ce qui n'avait été observé que dans des systèmes photosynthétiques complets et intacts.

Cependant, l'effet du TMPD est complexe et celui-ci semble avoir plusieurs sites d'action (83, 102). Une étude de thermoluminescence a montré qu'il pouvait réduire les états S_2 du complexe de Mn du CÉO du PSII, en plus de se lier dans le site Q_B du côté accepteur du PSII (103). L'effet sur le côté donneur du PSII a cependant été observé par Gauthier *et al.* (103) à de très faibles concentrations ($< 10 \mu\text{M}$ TMPD pour $200 \mu\text{g Chl/ml}$) en comparaison aux concentrations utilisées pour bien séparer J-I et I-P lors de l'IF (≈ 40 à $100 \mu\text{M}$ TMPD pour $50 \mu\text{g Chl/ml}$) (83, 102). C'est ce dernier effet qui pourrait être lié à une influence de la réduction du pool de PQ par le TMPD.

Les figures 4.1 et 5.1-5.3 montrent que l'effet principal observé en IF en présence de TMPD, la séparation de J-I et I-P induite par le retard de la montée I-P, est causé uniquement par les molécules de TMPD oxydées, puisque l'ajout d'un excès d'ascorbate aux thylakoïdes, pour garder le TMPD sous sa forme réduite, empêche d'observer l'effet sur les phases J-I et I-P. Cela montre donc que l'effet observé est lié à la capacité du TMPD d'accepter des électrons du PSII.

Le méthyl viologène (MV) est un produit qui accepte très efficacement les électrons du PSI, ce qui a pour effet d'augmenter l'activité du PSI et ainsi favoriser le transport linéaire d'électrons du PSII au PSI. Cela est particulièrement valable pour des thylakoïdes isolés où l'activité du PSI est fortement limitée, puisque les accepteurs d'électrons hydrosolubles, la Fd et le NADP^+ , sont perdus au cours de l'extraction. L'IF des thylakoïdes en présence de MV présente donc une forte diminution de l'amplitude de I-P (Figure 4.2B). Cela signifie que le pool de PQ a été gardé dans un état beaucoup plus oxydé qu'en absence de MV, puisque le transport linéaire d'électrons vers le PSI était favorisé. Cela est confirmé par la mesure de l'IF en présence de MV et de dibromothymoquinone (DBMIB). Le DBMIB se lie avec beaucoup d'affinité au site Q_0 du Cyt b_6f , bloquant ainsi l'oxydation du pool de PQ par le Cyt b_6f (104). La présence

simultanée de MV et de DBMIB n'a que très peu d'effet sur l'IF des thylakoïdes aux concentrations utilisées (Figure 4.2A). L'ajout de DBMIB a alors complètement empêché le MV d'exercer son influence sur l'état rédox du pool de PQ.

Les travaux présentés montrent également pour la première fois que le TMPD n'est pas le seul agent rédox à pouvoir entraîner une séparation claire des phases J-I et I-P de l'induction de fluorescence. Le silicomolybdate (SiMo) ainsi que certaines benzoquinones (BQ), comme le 2,5-dichloro-*p*-benzoquinone (DCBQ), phényl-benzoquinone (phe-BQ) et le monochloro-benzoquinone (MCBQ) peuvent également se comporter de façon similaire, encore une fois en ayant comme principal effet de retarder la phase I-P (Figure 5.4 et 5.5). Ces molécules sont toutes utilisées comme accepteurs d'électrons du PSII. Contrairement au TMPD, celles-ci ne semblent pas avoir la faculté de réduire les états S du PSII, qui aurait été constaté par une augmentation de l'amplitude de la phase O-J causée par l'enlèvement du quenching des états S₂ et S₃ (75, 102, 105). Cela confirme donc que la taille du pool d'accepteurs d'électrons du PSII module la fluorescence chlorophyllienne du PSII, particulièrement durant la phase I-P.

Dans ce contexte, l'influence de plusieurs BQ sur l'IF a été vérifiée. Il est connu que les BQ peuvent accepter des électrons à partir de deux sites distincts du PSII : en acceptant dans le site Q_B les électrons en provenance de Q_A⁻, ou en acceptant des électrons à partir de PQ réduite (PQH₂) dans le pool (106, 107). En mesurant l'activité du PSII à différentes concentrations de BQ avec ou sans DCMU puis en traçant les graphiques de double-réciproques, des valeurs de tours de rotation ($V_{\max}$) et d'affinités (K_m) ont été estimées (107-110). Les BQ substituées avec du chlore (Cl-BQ) ont généralement tendance à avoir une plus grande affinité pour le site Q_B que les BQ substituées par des méthyles (CH₃-BQ). Les CH₃-BQ auraient plutôt tendance à accepter des électrons à partir du pool de PQ, contrairement aux Cl-BQ. La duroquinone (DQ) représente le cas extrême, puisqu'elle semble accepter des électrons strictement à partir du pool de PQ (108).

Curieusement, l'effet des DQ sur l'IF est de diminuer fortement l'amplitude de I-P avec un retard de I-P relativement faible, contrairement au TMPD, DCBQ, MCBQ et phe-BQ qui retardent I-P d'un facteur 10 tout en ayant un effet limité sur l'amplitude de I-P (Figures 5.4 et 5.5). Le méthyl-benzoquinone (MBQ) et le *p*-benzoquinone (*p*BQ) ont également eu un effet similaire aux DQ. Cela se corrèle bien avec les résultats de l'équipe de Satoh *et al.* (107, 108, 110) : les BQ que ces auteurs ont identifiées comme acceptant plutôt les électrons à partir de Q_B correspondent à celles qui ont eu comme effet principal de retarder I-P, alors que les BQ identifiées comme acceptant les électrons surtout à partir du pool correspondent à celles qui ont eu comme effet principal de diminuer l'amplitude de I-P. La fluorescence du PSII donne donc des indications sur le site d'acceptation des électrons et sur comment le transport d'électrons est affecté au niveau du pool de PQ.

Les molécules ayant comme site d'action préférentiel la niche Q_B agiraient alors principalement en compétition avec les PQ endogènes pour la liaison dans Q_B . Cela expliquerait que la conséquence ne soit principalement qu'un retard de I-P, puisqu'une proportion de centres réactionnels réduirait les PQ. Quant aux molécules ayant comme site d'action préférentiel le pool de PQ, elles agiraient en oxydant une proportion des PQH_2 dans le pool au fur et à mesure qu'elles sont produites par les PSII. Cela mime un taux d'oxydation du pool de PQ plus élevé, comme obtenu par la présence de MV et par des simulations théoriques effectuées par Zhu *et al.* (74).

Puisque l'absence de Fd et de $NADP^+$ dans les thylakoïdes isolés pourrait être un facteur limitant pour le PSI et ainsi influencer l'IF des PSII, l'IF a été également mesuré en ajoutant aux thylakoïdes ces accepteurs d'électrons du PSI. La conséquence a été une diminution majeure de l'amplitude de I-P avec un léger retard de cette phase (Fig. 5.6). Cela est tout à fait consistant avec les mesures effectuées en présence de MV et de CH_3BQ et indique que l'augmentation de l'activité du PSI a augmenté le taux d'oxydation du pool de PQ, reflété par l'effet sur la phase I-P de l'IF. Un schéma global des inhibitions et activations causées par les produits utilisés ayant un effet sur la phase I-P est présenté à la Figure 7.1.

Ces résultats montrent, comme pour les travaux de Boisvert *et al.* (54), que la phase I-P de l'IF est directement liée aux cinétiques de réduction et d'oxydation du pool de PQ, ce qui n'est pas le cas de la phase J-I qui n'a relativement pas été affectée par l'ensemble de ces traitements. La phase J-I semble plutôt être reliée à la fermeture des centres réactionnels des PSII avant la réduction du pool de PQ (54). Cependant, l'attribution de la montée I-P à la réduction du pool de PQ a été contredite par certains auteurs (77, 105, 111).

Des mesures simultanées d'induction de fluorescence et de changement d'absorption à 820 ont montré que les électrons en provenance du PSII commencent à réduire le PSI environ 20-30 ms après le début de l'illumination intense (64, 112). Cela correspond bien avec le début de la montée I-P de l'IF. Certains auteurs (64, 75, 113) interprètent donc ces données comme indiquant que le pool de PQ est complètement réduit après 20-30 ms d'éclairage intense, et argumentent que la phase I-P, complétée en plusieurs centaines de ms, est donc trop lente pour représenter la réduction du pool de PQ. Cependant, il faut garder en tête que les transferts d'électrons ne procèdent pas un par un de façon quasi-simultanée dans l'ensemble des centres réactionnels, mais qu'il s'agit d'un ensemble de réactions de réduction et d'oxydation avec certains goulots d'étranglement du point de vue cinétique, c'est-à-dire que l'induction de fluorescence permet d'observer la formation de différents niveaux stationnaires d'états du PSII.

Ainsi, les réactions d'oxydation des PQ réduites du pool, qui acheminent les électrons au PSI, n'« attendent » pas que le pool de PQ soit complètement réduit pour débiter ! Le Cyt b_6f et le PSI, lorsqu'ils sont actifs, travailleront à oxyder les PQH₂ aussitôt qu'elles seront disponibles, et un état stationnaire de réduction du pool de PQ sera atteint plus ou moins rapidement en fonction des vitesses respectives de réduction et d'oxydation du pool. L'accumulation des PQ dans leur état réduit durant la phase I-P est alors entièrement compatible avec les données de changements d'absorption à 820 nm mesurées de façon simultanée à l'IF. Cela est également supporté par la comparaison des

première étude montrant que les plastoquinones peuvent contrôler l'utilisation de l'énergie lumineuse absorbée dans les PSI.

Récemment, Rajagopal *et al.* (55) ont montré que l'ajout de quinones artificielles oxydées (DBMIB, DCBQ, et DQ) pouvait atténuer les états excités des Chl de membranes enrichies en PSI, comme c'est le cas pour les PSII. D'une façon similaire, l'effet de trois PQ différentes (dPQ, PQ-2, PQ-9) a été vérifié sur le spectre d'émission et la photooxydation du P700 dans des fractions membranaires enrichies en PSI.

Notons que parmi les PQ utilisées, la PQ-9 n'a eu aucun effet significatif sur la fluorescence du PSI et la photooxydation du P700. La PQ-9 est le même type de PQ que l'on retrouve *in vivo* dans les chloroplastes, et on se serait alors attendu à obtenir l'effet optimal sur le PSI en ajoutant des PQ-9. Cependant, Bojko *et al.* (117, 118) ont également observé l'absence d'effet des PQ-9 dans des mesures de réductions de PQ par la FNR, alors que d'autres PQ plus petites étaient actives. Cela a été expliqué par la formation de micelles par les PQ-9 dans le tampon de mesure polaire, à cause de leur longue chaîne aliphatique non-polaire de 45 carbones, qui les empêche d'interagir efficacement avec les membranes photosynthétiques.

L'ajout de dPQ et PQ-2 a entraîné une atténuation importante du niveau de fluorescence sur l'ensemble du spectre d'émission des PSI (Figure 6.2). Ce quenching de fluorescence était très bien décrit par la loi de Stern-Volmer modifiée qui prend en compte qu'une partie de la fluorescence n'est pas accessible à l'atténuateur. La constante de Stern-Volmer, K_{SV} , caractérise l'efficacité d'atténuation (51, 84), puisqu'elle représente la constante de formation du complexe non-fluorescent « atténuateur-fluorophore ». Les valeurs de K_{SV} calculées pour les dPQ et les PQ-2 sont de $1.25 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ et $0.55 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, respectivement. À titre de comparaison, la quinone la plus efficace pour atténuer la fluorescence du PSI trouvée par Rajagopal *et al.* (55) est le DBMIB avec un K_{SV} calculé de $3.28 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$.

La fraction de fluorescence accessible aux dPQ et aux PQ-2 a été de 70%. Cependant, l'étude de Rajagopal *et al.* (55) avec le même type d'extraction n'avait pas nécessité de prendre en compte qu'une partie de la fluorescence du PSI était inaccessible dans l'analyse de Stern-Volmer. L'origine de cette différence n'est pas claire. On remarque cependant que les quinones artificielles de cette dernière étude étaient toutes de petites tailles et sans chaîne aliphatique, alors que les dPQ et PQ-2 ont une chaîne aliphatique de grandeur similaire contenant 10 carbones. Une hypothèse pourrait donc être qu'en augmentant la concentration de PQ, une portion de celles-ci ne peut interagir efficacement avec les Chl du PSI, possiblement à cause de la formation de micelles dans le milieu de mesure polaire, ce qui mimerait qu'une fraction de la fluorescence n'est pas accessible aux atténuateurs. Cela pourrait signifier que la forme efficace de PQ atteint une limite de solubilité au-delà de laquelle tout excès se retrouve sous une forme de micelles incapables d'agir comme atténuateurs statiques. Les cas extrêmes seraient les PQ-9, avec pratiquement 0% de la fluorescence accessible, et les quinones utilisées par Rajagopal *et al.*, sans queue aliphatiques avec 100% de fluorescence ainsi accessible.

Dans un autre ordre d'idées, il est important de noter que les fractions membranaires enrichies en PSI utilisées dans la présente étude contiennent environ 260 Chl/CR et environ 11 PQ endogènes par CR (95). L'ajout de 11 dPQ/CR a mené à l'atténuation d'environ 20% de la fluorescence du PSI, ce qui montre que l'effet observé est d'un ordre de grandeur suffisamment grand pour avoir une signification physiologique. On remarque également que ces 11 dPQ/CR correspondent à 1 dPQ/25 Chl et entraînent la perte de la fluorescence de 1/5 des Chl. Lee *et al.* (66) ont montré qu'un seul site de liaison des quinones par 4 Chl était nécessaire pour entraîner l'atténuation de 70% de la fluorescence de PSI-40, puisqu'il y a un fort couplage des excitations entre les Chl et que les états excités sont ainsi délocalisés parmi les pigments (119-121). C'est ce qui peut expliquer l'efficacité accrue des PQ à atténuer la fluorescence des photosystèmes.

Les implications d'une telle atténuation des états excités des Chl du PSI par des PQ ajoutés (PQ_{ex}) peuvent être montrées par des mesures du taux de photooxydation du

P700 par ΔA_{830} . Dans des conditions où la lumière d'excitation est limitante, c'est-à-dire où la quantité de photons disponible à chaque instant limite la vitesse de photooxydation du P700, l'ajout d'atténuateurs des états excités des Chl devrait mimer l'utilisation d'une lumière plus faible et ainsi ralentir la vitesse de photooxydation du P700 (55, 66).

C'est ce qui s'est produit avec l'ajout de 30 μM dPQ et de PQ-2, qui ont retardé la photooxydation du P700 d'une façon similaire, sans toutefois affecter la quantité totale de P700 oxydé à l'état stationnaire (Figure 6.3). Cela indique qu'une partie des excitons étaient dissipés de façon non-radiative avant d'avoir migré jusqu'au P700. Les PQ_{ex} exerceraient donc un quenching non-photochimique des états excités des Chl.

Les mesures de spectroscopie photoacoustique sous différentes intensités de lumière modulée ont permis de vérifier l'impact des PQ_{ex} sur la dissipation thermique et la capacité photochimique du PSI (Figure 6.4). La capacité des PQ oxydés d'atténuer statiquement les états excités des Chl a causé une augmentation de la dissipation thermique sous la lumière modulée non-saturante, diminuant ainsi le rendement du stockage d'énergie (ϕ_t) par les PSI. L'analyse de Lineweaver-Burk des données de photoacoustique, c'est-à-dire les graphiques de ϕ_t^{-1} en fonction de l'intensité lumineuse (I) (122) avec et sans ajout de PQ, indique que les PQ_{ex} diminuent la capacité photochimique du PSI. Les deux tracés parallèles sur le graphique en double réciproque peuvent être analysés comme les inhibitions enzymatiques traditionnelles : les dPQ ajoutés agissent donc comme des inhibiteurs incompétitifs des réactions de stockage d'énergie.

L'effet des PQ ajoutées sur les différentes voies de dissipation d'énergie du PSI est ainsi démontré dans fractions membranaires enrichies en PSI. Il était intéressant de tenter de vérifier si certains de ces effets pouvaient être reproduits dans des systèmes plus complets, comme des membranes entières de thylakoïdes, ou en affectant l'état rédox du pool endogène de PQ de ces systèmes.

Cependant, les informations que l'on peut obtenir sur le PSI dans des thylakoïdes complets sans interférence du PSII peuvent être limitées. Par exemple, la mesure de photooxydation du P700 dans des thylakoïdes pour vérifier l'effet des PQ_{ex} sur le PSI aura une interférence du PSII, puisque ce dernier peut réduire les quinones endogènes et exogènes, qui indirectement réduiront le PSI et affecteront sa cinétique de photooxydation. On pourra partiellement contourner ce problème de flux d'électrons en provenance du PSII en ajoutant du DCMU dans le tampon de mesure. Une grande concentration de PQ ajoutées pourrait cependant compétitionner avec le DCMU pour le site Q_B du PSII et ainsi rétablir le transport linéaire d'électrons. L'ajout de dPQ aux thylakoïdes, en présence de 100 μM DCMU, a donc eu un effet similaire à celui observé dans les fractions purifiées de PSI, en diminuant la vitesse de photooxydation du P700 (Figure 6.5). Par contre, la réduction du pool endogène de PQ pour les mesures de ΔA_{830} demeure problématique, peu importe la méthode de réduction utilisée : l'effet de donneur d'électrons des PQH_2 au P700 (en transitant par le Cyt b_6f) interférera avec le possible effet des PQH_2 sur les états excités des Chl que l'on tente d'observer.

En fluorescence, on peut mettre à profit certaines propriétés spécifiques aux PSI pour distinguer l'effet des PQ sur le PSII et le PSI dans des membranes entières de thylakoïdes. Le spectre d'émission de fluorescence à la température de la pièce des thylakoïdes ne permet pas de séparer les contributions respectives des PSII et des PSI, puisque la fluorescence des sous-niveaux vibrationnels des Chl du PSII se superpose à la bande principale de fluorescence des PSI autour de 700-750 nm (123). Cependant, en diminuant suffisamment la température, les bandes vibrationnelles du PSII sont perdues et la fluorescence du PSI provient alors uniquement des quelques Chl « rouges », le transfert d'énergie défavorable (« uphill ») vers les Chl de plus haute énergie n'étant plus assez efficace. À température cryogénique, on obtient donc deux bandes clairement séparées à 680 nm et 735 nm, originant du PSII et du PSI, respectivement (124-127). Il est alors possible de réduire le pool endogène de PQ en ajoutant du NADPH (36, 56) en conditions anaérobiques et d'en observer les effets.

La réduction du pool endogène de PQ a donc causé une augmentation d'environ 50% de la fluorescence à 77 K, tant du PSII et que du PSI, alors que leurs contributions respectives était clairement séparées (Figure 6.5). Cette observation importante montre que l'état redox du pool endogène de PQ a un effet significatif dans des membranes entières de thylakoïdes.

Ce résultat pourrait être expliqué de façon partielle par le phénomène de transition d'états. Dans un système intact, la réduction du pool entraîne l'activation de la phosphorylation des LHCII, qui migreront alors du PSII au PSI (47, 128). Il a été montré que cela pouvait augmenter la fluorescence du PSI à 77 K dans des membranes de thylakoïdes (129, 130). Toutefois, pour que la transition d'états puisse se produire dans des membranes isolées de thylakoïdes, de l'ATP, perdu lors de l'extraction, doit être ajouté au milieu d'incubation pour que les LHCII puissent être phosphorylés (131), ce qui n'a pas été le cas. La transition d'états aurait également entraîné une diminution du niveau maximal de fluorescence (F_m) durant l'induction de fluorescence (132), ce qui n'a pas été observé. Cette hypothèse peut donc être rejetée.

Le rôle de l'état redox du pool de PQ sur la dissipation d'énergie du PSI pourrait se situer au niveau de l'adaptation aux conditions lumineuses, à la la photoprotection, et au TCE autour du PSI. Lorsque des chloroplastes sont soumis à certains stress, comme des stress thermiques, le cycle de Benson-Calvin est alors partiellement inhibé (133, 134), causant ainsi l'accumulation du NADPH. Le NADPH peut alors réduire le pool de PQ par les différentes voies possibles du TCE : la NAD(P)H déshydrogénase (36, 135), la voie de la Ferrédoxine-quinone réductase (FQR) (136, 137), ou par le biais de l'activité de diaphorase de la FNR (117, 118). Les PQ ainsi réduites peuvent alors permettre d'augmenter la capacité photochimique du PSI nécessaire à l'activation du TCE, contrairement aux PQ oxydées. Rajagopal *et al.* (62) ont montré que la conformation du PSI dépend du ratio $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ et que le niveau d'activité du PSI était plus grand quand ce ratio est élevé, ce qui pourrait également contribuer à l'activation du TCE (34).

La combinaison de ces deux mécanismes, qui favoriseraient l'activité du TCE, peut alors amener à voir le rôle du PSI dans la dissipation de l'énergie dans des conditions de stress sous un autre angle. Plutôt que de lui attribuer un rôle passif où il ne subit que les conséquences des mécanismes de régulation du PSII (45), le PSI, par son TCE, pourrait être un élément majeur et être actif dans l'activation des mécanismes de régulation du transport d'électron et de photoprotection. En plus d'avoir comme rôle potentiel de balancer le ratio ATP/NADPH produit par les thylakoïdes (31, 33, 34), le TCE permet aussi d'augmenter rapidement le gradient transmembranaire de protons, entraînant ainsi l'activation des mécanismes de photoprotection dépendant du pH et de quenching de haute énergie (qE) (138, 139). Cela semble être appuyé par les résultats de Munekage *et al.* (37, 38), qui montrent que des plants d'arabette des dames déficientes en certains enzymes du TCE ont une croissance très limitée et doivent être cultivées sous de très faibles intensités lumineuses.

7.3 Perspectives de recherche

La première partie du travail a mis en évidence l'importance des cinétiques de réduction et d'oxydation simultanées du pool de PQ pour la fluorescence du PSII, tant sur l'amplitude que sur le $t_{1/2}$ de la phase I-P de l'IF. Un point important demeure nébuleux : pourquoi les phases J-I et I-P sont clairement séparées dans les feuilles alors qu'elles le sont beaucoup moins dans des membranes de thylakoïdes isolées ? Les données présentées semblent pointer vers une différence dans les cinétiques de réduction et d'oxydation entre les feuilles et les thylakoïdes isolés, ce qui ne s'explique pas uniquement par l'absence d'accepteurs d'électrons du PSI (Fd et NADPH). Il faut donc chercher parmi les différences entre les feuilles et les thylakoïdes isolés.

On peut aborder la question de deux façons : traiter des feuilles et vérifier si les courbes ressemblent à celles de thylakoïdes isolés, ou bien traiter des thylakoïdes isolés et vérifier si les courbes ressemblent à celles de feuilles. La dernière option est la plus facile expérimentalement, puisque certains produits sont difficiles à introduire dans les feuilles. La première façon doit par contre servir de contrôle pour vérifier les hypothèses.

Un aspect à étudier pourrait être du côté de l'organisation des membranes des thylakoïdes à l'intérieur des chloroplastes. Il serait en effet intéressant de voir comment les propriétés des membranes affectent l'induction de fluorescence et les cinétiques de réduction et d'oxydation du pool de PQ. D'ailleurs, Dudekala et Fragata (106) ont affecté la structure des membranes de thylakoïdes isolés et de PSII isolés par des traitements avec des cyclodextrines et ont montré que l'accessibilité des quinones aux sites d'acceptation d'électrons du PSII s'en trouvait modifié.

Il pourrait également être intéressant de vérifier si l'activité du CET a des impacts visibles sur l'IF en modifiant l'état rédox du pool de PQ, de même que l'effet du ratio NADPH/NADP^+ . Une autre curiosité serait d'amener des thylakoïdes dans le « state II » de la transition d'états et de mesurer l'IF.

Dans la deuxième partie de cette étude, il a été montré que l'état rédox du pool de PQ agit comme mécanisme de contrôle de la dissipation de l'énergie lumineuse absorbée par le PSI. Le plus grand défi consisterait à imaginer et faire des expériences pour vérifier si ce mécanisme a significativement lieu dans des feuilles entières. Une façon de s'en approcher consisterait à infiltrer des PQ_{ex} dans des feuilles entières et d'en mesurer l'effet sur les différentes voies de dissipation de l'énergie du PSI.

Une autre approche indirecte consisterait à mieux caractériser les réactions de stockages d'énergie du PSI par spectroscopie photoacoustique. Cette méthode est couramment utilisée pour tester le stockage d'énergie du PSI par le TCE (98, 140, 141), mais la réaction de stockage d'énergie mesurée demeure très mal connue. Pour y parvenir, certaines modifications au spectroscope photoacoustique pourraient être apportées pour améliorer le rapport signal/bruit de l'appareil ainsi qu'augmenter sa précision et sa sensibilité. Par exemple, l'utilisation d'une diode émettrice de lumière (DEL) dont l'intensité est contrôlable comme lumière modulée de mesure pourrait remplacer la lampe au xénon 150 W et le modulateur mécanique, pour ainsi obtenir une meilleure modulation sinusoïdale.

Une caractérisation détaillée des réactions de stockage d'énergie du PSI mesurées par PA et de l'effet des PQ sur celles-ci et dans le TCE pourrait révéler des informations supplémentaires sur l'importance de l'état rédox des PQ sur la dissipation d'énergie des photosystèmes.

BIBLIOGRAPHIE

1. Van den Hoek, C., Mann, D. G., Jahns, H. M. (1996) "Algae - An introduction to phycology", Cambridge University Press, New York.
2. Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schliefer, K.-H. (1992) "The Prokaryotes", Springer-Verlag, Berlin.
3. Bryant, D. A. (1994) "The molecular biology of cyanobacteria", Kluwer Academic Press, Dordrecht.
4. Taiz, L., Zeiger, E. (1998) "Plant Physiology", Sinauer Associates, Sunderland, MA.
5. Blankenship, R. E. (2002) "Molecular Mechanisms of Photosynthesis", Blackwell Science Ltd, Cornwall.
6. Walker, D. A. (1992) "Energy, Plants and Man", Oxygraphics, Brighton.
7. Dhingra, A., Portis, A. R., Jr., Daniell, H. (2004) "Enhanced translation of a chloroplast-expressed RbcS gene restores small subunit levels and photosynthesis in nuclear RbcS antisense plants", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 6315-6320.
8. John Andrews, T., Whitney, S. M. (2003) "Manipulating ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase in the chloroplasts of higher plants", Arch. Biochem. Biophys. 414: 159-169.
9. Albertsson, P. A. (2001) "A quantitative model of the domain structure of the photosynthetic membrane", Trends Plant Sci. 6: 349-358.
10. Calvin, M. (1989) "40 years of photosynthesis and related activities", Photosynth. Res. 21: 3-16.

11. Horton, R., Moran, L. A., Ochs, R. S., Rawn, D. J., Scrimgeour, K. G. (2002) "Principles of Biochemistry", Prentice Hall, Englewood Cliffs.
12. Green, B. R., Parson, W. W. (2003) "Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis", Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
13. Liu, Z., Yan, H., Wang, K., Kuang, T., Zhang, J., Gui, L., An, X., Chang, W. (2004) "Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution", *Nature* 428: 287-292.
14. Ferreira, K. N., Iverson, T. M., Maghlaoui, K., Barber, J., Iwata, S. (2004) "Architecture of the Photosynthetic Oxygen-Evolving Center", *Science* 303: 1831-1838.
15. Kamiya, N., Shen, J. R. (2003) "Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7-Å resolution", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 98-103.
16. Loll, B., Kern, J., Saenger, W., Zouni, A., Biesiadka, J. (2005) "Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II", *Nature* 438: 1040-1044.
17. van Grondelle, R., Dekker, J. P., Gillbro, T., Sundstrom, V. (1994) "Energy transfer and trapping in photosynthesis", *Biochim. Biophys. Acta* 1187: 1-65.
18. Ke, B. (2001) "Photobiochemistry and Photobiophysics", Kluwer Academic, Dordrecht.
19. Diner, B. A. and Babcock, G. T. (1996) "Structure, Dynamics, and Energy Conversion Efficiency in Photosystem II", in *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*, Ort, D. R., Yocum, C. F., éditeurs, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 213-247.

20. Garbers, A., Reifarth, F., Kurreck, J., Renger, G., Parak, F. (1998) "Correlation between Protein Flexibility and Electron Transfer from QA- to QB in PSII Membrane Fragments from Spinach", *Biochemistry* 37: 11399-11404.
21. Kuhl, H., Kruij, J., Seidler, A., Krieger-Liszkay, A., Bunker, M., Bald, D., Scheidig, A. J., Rogner, M. (2000) "Towards Structural Determination of the Water-splitting Enzyme. Purification, crystallization, and preliminary crystallographic studies of the photosystem II from a thermophilic cyanobacterium", *J. Biol. Chem.* 275: 20652-20659.
22. Ben-Shem, A., Frolov, F., Nelson, N. (2003) "Crystal structure of plant photosystem I", *Nature* 426: 630-635.
23. Scheller, H. V., Jensen, P. E., Haldrup, A., Lunde, C., Knoetzel, J. (2001) "Role of subunits in eukaryotic Photosystem I", *Biochim. Biophys. Acta* 1507: 41-60.
24. Brettel, K., Leibl, W. (2001) "Electron transfer in photosystem I", *Biochim. Biophys. Acta* 1507: 100-114.
25. Chitnis, P. R. (2001) "Photosystem I: Function and Physiology", *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 593-626.
26. Brettel, K. (1997) "Electron transfer and arrangement of the redox cofactors in photosystem I", *Biochim. Biophys. Acta* 1318: 322-373.
27. Andersen, B., Scheller, H. V., Moller, B. L. (1992) "The PSI-E subunit of photosystem I binds ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase", *FEBS Lett.* 311: 169-173.
28. Kurisu, G., Zhang, H., Smith, J. L., Cramer, W. A. (2003) "Structure of the Cytochrome b6f Complex of Oxygenic Photosynthesis: Tuning the Cavity", *Science* 302: 1009-1014.

29. Zhang, H., Whitelegge, J. P., Cramer, W. A. (2001) "Ferredoxin:NADP+ Oxidoreductase Is a Subunit of the Chloroplast Cytochrome b6f Complex", J. Biol. Chem. 276: 38159-38165.
30. Allen, J. F. (2002) "Photosynthesis of ATP — Electrons, Proton Pumps, Rotors, and Poise", Cell 110: 273-276.
31. Allen, J. F. (2003) "Cyclic, pseudocyclic and noncyclic photophosphorylation: new links in the chain", Trends Plant Sci. 8: 15-19.
32. Seelert, H., Poetsch, A., Dencher, N. A., Engel, A., Stahlberg, H., Muller, D. J. (2000) "Structural biology: Proton-powered turbine of a plant motor", Nature 405: 418-419.
33. Bukhov, N. G., Carpentier, R. (2004) "Alternative Photosystem I-Driven Electron Transport Routes: Mechanisms and Functions", Photosynth. Res. V82: 17-33.
34. Johnson, G. N. (2005) "Cyclic electron transport in C3 plants: fact or artefact?", J. Exp. Bot. 56: 407-416.
35. Joliot, P., Joliot, A. (2006) "Cyclic electron flow in C3 plants", Biochim. Biophys. Acta 1757: 362-368.
36. Haldimann, P., Tsimilli-Michael, M. (2002) "Mercury inhibits the non-photochemical reduction of plastoquinone by exogenous NADPH and NADH: evidence from measurements of the polyphasic chlorophyll a fluorescence rise in spinach chloroplasts", Photosynth. Res. 74: 37-50.
37. Munekage, Y., Hojo, M., Meurer, J., Endo, T., Tasaka, M., Shikanai, T. (2002) "PGR5 Is Involved in Cyclic Electron Flow around Photosystem I and Is Essential for Photoprotection in *Arabidopsis*", Cell 110: 361-371.

38. Munekage, Y., Hashimoto, M., Miyake, C., Tomizawa, K. i., Endo, T., Tasaka, M., Shikanai, T. (2004) "Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis", *Nature* 429: 579-582.
39. Buschmann, C., Kocsányi, L. (1989) "Light-induced heat production correlated with fluorescence and its quenching mechanisms", *Photosynth. Res.* 21: 129-136.
40. Butler, W. L. (1978) "Energy Distribution in the Photochemical Apparatus of Photosynthesis", *Annu. Rev. Plant Physiol.* 29: 345-378.
41. Demmig-Adams, B., Adams, W. W. (2000) "Harvesting sunlight safely", *Nature* 403: 371-374.
42. Horton, P., Ruban, A. V., Walters, R. G. (1996) "Regulation of light harvesting in green plants", *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 655-684.
43. Külheim, C., Agren, J., Jansson, S. (2002) "Rapid regulation of light harvesting and plant fitness in the field", *Science* 297: 91-93.
44. Muller, P., Li, X. P., Niyogi, K. K. (2001) "Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy", *Plant Physiol.* 125: 1558-1566.
45. Ort, D. R. (2001) "When There Is Too Much Light", *Plant Physiol.* 125: 29-32.
46. Demmig-Adams, B., Adams III, W. W. (1996) "The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis", *Trends Plant Sci.* 1: 21-26.
47. Allen, J. F. (1992) "Protein-Phosphorylation in Regulation of Photosynthesis", *Biochim. Biophys. Acta* 1098: 275-335.
48. Rajagopal, S., Joly, D., Gauthier, A., Beauregard, M., Carpentier, R. (2005) "Protective effect of active oxygen scavengers on protein degradation and photochemical function in photosystem I submembrane fractions during light stress", *FEBS J.* 272: 892-902.

49. Govindachary, S., Bukhov, N. G., Joly, D., Carpentier, R. (2004) "Photosystem II inhibition by moderate light under low temperature in intact leaves of chilling-sensitive and -tolerant plants", *Physiol. Plant.* 121: 322-333.
50. Osmond, B., Badger, M., Maxwell, K., Bjorkman, O., Leegood, R. (1997) "Too many photons: photorespiration, photoinhibition and photooxidation", *Trends Plant Sci.* 2: 119-121.
51. Karukstis, K. K., Boegeman, S. C., Fruetel, J. A., Gruber, S. M., Terris, M. H. (1987) "Multivariate analysis of Photosystem II fluorescence quenching by substituted benzoquinones and naphthoquinones", *Biochim. Biophys. Acta* 891: 256-264.
52. Vasil'ev, S., Wiebe, S., Bruce, D. (1998) "Non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in photosynthesis. 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone in spinach thylakoids as a model for antenna based quenching mechanisms", *Biochim. Biophys. Acta* 1363: 147-156.
53. Vernotte, C., Etienne, A. L., Briantais, J.-M. (1979) "Quenching of the system II chlorophyll fluorescence by the plastoquinone pool", *Biochim. Biophys. Acta* 545: 519-527.
54. Boisvert, S., Joly, D., Carpentier, R. (2006) "Quantitative analysis of the experimental O-J-I-P chlorophyll fluorescence induction kinetics. Apparent activation energy and origin of each kinetic step", *FEBS J.* 273: 4770-4777.
55. Rajagopal, S., Egorova, E. A., Bukhov, N. G., Carpentier, R. (2003) "Quenching of excited states of chlorophyll molecules in submembrane fractions of Photosystem I by exogenous quinones", *Biochim. Biophys. Acta* 1606: 147-152.
56. Haldimann, P., Tsimilli-Michael, M. (2005) "Non-photochemical quenching of chlorophyll a fluorescence by oxidized plastoquinone: new evidences based on modulation of the redox state of the endogenous plastoquinone pool in broken spinach chloroplasts", *Biochim. Biophys. Acta* 1706: 239-249.

57. Samson, G., Prasil, O., Yaakoubd, B. (1999) "Photochemical and thermal phases of chlorophyll a fluorescence", *Photosynthetica* 37: 163-182.
58. Strasser, R. J. and Govindjee (1992) "On the O-J-I-P fluorescence transients in leaves and D1 mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*", in *Research in Photosynthesis*, Murata, N., éditeur, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 23-32.
59. Bukhov, N. G., Sridharan, G., Egorova, E. A., Carpentier, R. (2003) "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: 115-123.
60. Krause, G. H., Weis, E. (1991) "Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics", *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 313-349.
61. Bukhov, N. G., Carpentier, R. (2003) "Measurement of photochemical quenching of absorbed quanta in photosystem I of intact leaves using simultaneous measurements of absorbance changes at 830 nm and thermal dissipation", *Planta* 216: 630-638.
62. Rajagopal, S., Bukhov, N. G., Tajmir-Riahi, H. A., Carpentier, R. (2003) "Control of energy dissipation and photochemical activity in photosystem I by NADP-dependent reversible conformational changes", *Biochemistry* 42: 11839-11845.
63. Lazar, D. (1999) "Chlorophyll a fluorescence induction", *Biochim. Biophys. Acta* 1412: 1-28.
64. Schansker, G., Toth, S. Z., Strasser, R. J. (2005) "Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl a fluorescence rise OJIP", *Biochim. Biophys. Acta* 1706: 250-261.

65. Jansson, S. (1999) "A guide to the Lhc genes and their relatives in *Arabidopsis*", Trends Plant Sci. 4: 236-240.
66. Lee, J. W., Zipfel, W., Owens, T. G. (1992) "Quenching of chlorophyll excited states in photosystem I by quinones : Stern-Volmer analysis of fluorescence and photochemical yield", J. Lumin. 51: 79-89.
67. Melkozernov, A. N. (2001) "Excitation energy transfer in Photosystem I from oxygenic organisms", Photosynth. Res. 70: 129-153.
68. Croce, R., Zucchelli, G., Garlaschi, F. M., Bassi, R., Jennings, R. C. (1996) "Excited state equilibration in the photosystem I light-harvesting I complex: P700 is almost isoenergetic with its antenna.", Biochemistry 35: 8572-8579.
69. Frigaard, N. U., Tokita, S., Matsuura, K. (1999) "Exogenous quinones inhibit photosynthetic electron transfer in *Chloroflexus aurantiacus* by specific quenching of the excited bacteriochlorophyll c antenna", Biochim. Biophys. Acta 1413: 108-116.
70. Kautsky, H., Hirsch, A. (1931) "Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation", Naturwissenschaften 48: 964.
71. Lazár, D. (2006) "The polyphasic chlorophyll *a* fluorescence rise measured under high intensity of exciting light", Funct. Plant Biol. 33: 9-30.
72. Strasser, R. J., Srivastava, A., Govindjee (1995) "Polyphasic Chlorophyll *a* Fluorescence Transient in Plants and Cyanobacteria", Photochem. Photobiol. 61: 32-42.
73. Mathis, P. and Paillotin, G. (1981) "Primary processes of photosynthesis", in The biochemistry of plants, Hatch, M. D., Boardman, N. K., éditeurs, Academic Press, New York, pp 97-161.
74. Zhu, X. G., Govindjee, Baker, N., deSturler, E., Ort, D., Long, S. (2005) "Chlorophyll *a* fluorescence induction kinetics in leaves predicted from a model

describing each discrete step of excitation energy and electron transfer associated with Photosystem II", *Planta* 223: 114-133.

75. Schreiber, U. (2002) "Assesment of maximal fluorescence yield: Donor-side dependent quenching and QB-Quenching", *in* *Plant Spectrofluorometry: Applications and Basic Reseach*, Kooten, O. V., Snel, J. F. H., éditeurs, Rozenberg, Amsterdam, pp 23-47.
76. Pospisil, P., Dau, H. (2002) "Valinomycin sensitivity proves that light-induced thylakoid voltages result in millisecond phase of chlorophyll fluorescence transients", *Biochim. Biophys. Acta* 1554: 94-100.
77. Vredenberg, W. J., Bulychhev, A. A. (2002) "Photo-electrochemical control of photosystem II chlorophyll fluorescence in vivo", *Bioelectrochemistry* 57: 123-128.
78. Vredenberg, W. J., Bulychhev, A. (2003) "Photoelectric effects on chlorophyll fluorescence of photosystem II in vivo. Kinetics in the absence and presence of valinomycin", *Bioelectrochemistry* 60: 87-95.
79. Schreiber, U., Neubauer, C. (1987) "The polyphasic rise of chlorophyll fluorescence upon onset of strong continuous illumination: II. Partial control by the photosystem II donor side and possible ways of interpretation", *Z. Naturforsch* 42c: 1255-1264.
80. Barthelemy, X., Popovic, R., Franck, F. (1997) "Studies on the O-J-I-P transient of chlorophyll fluorescence in relation to photosystem II assembly and heterogeneity in plastids of greening barley", *J. Photochem. Photobiol. B: Biol* 39: 213-218.
81. Meunier, P. C., Bendall, D. S. (1992) "Analysis of fluorescence induction in thylakoids with the method of moments reveals 2 different active photosystem-II centers", *Photosynth. Res.* 32: 109-120.

82. Pospisil, P., Dau, H. (2000) "Chlorophyll fluorescence transients of Photosystem II membrane particles as a tool for studying photosynthetic oxygen evolution", *Photosynth. Res.* 65: 41-52.
83. Bukhov, N. G., Govindachary, S., Egorova, E. A., 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.
84. Valeur, B. (2002) "Molecular fluorescence: principles and applications", Wiley-VCH, Weinheim.
85. Lakowicz, J. R. (1983) "Principles of fluorescence spectroscopy", Plenum Press, New York.
86. Lehrer, S. S. (1971) "Solute perturbation of protein fluorescence. The quenching of the tryptophyl fluorescence of model compounds and of lysozyme by iodide ion", *Biochemistry* 10: 3254-3263.
87. Oja, V., Eichelmann, H., Peterson, R. B., Rasulov, B., Laisk, A. (2003) "Deciphering the 820 nm signal: redox state of donor side and quantum yield of Photosystem I in leaves", *Photosynth. Res.* V78: 1-15.
88. Bell, A. G. (1880) "On the Production and Reproduction of Sound by Light", *Am. J. Sci.* XX: 305-324.
89. Malkin, S. (2000) "The photoacoustic effect in leaves and its applications", *in* Probing photosynthesis: Mechanisms, regulation and adaptation, Yunus, M., Pathre, U., Mohanty, P., éditeurs, Taylor & Francis, London, pp 484-524.
90. Malkin, S., Canaani, O. (1994) "The photoacoustic method and its characteristics in use for the study of photosynthesis", *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 493-526.

91. Carpentier, R., Larue, B., Leblanc, R. M. (1984) "Photoacoustic spectroscopy of *Anacystis nidulans* III. Detection of photosynthetic activities", Arch. Biochem. Biophys. 228: 534-543.
92. Malkin, S., Cahen, D. (1979) "Photoacoustic spectroscopy and radiant energy conversion: Theory of the effect with special emphasis on photosynthesis", Photochem. Photobiol. 29: 803-813.
93. Howell, J. M., Vieth, W. R. (1982) "Biophotolytic membranes: Simplified kinetic model of photosynthetic electron transport", J. Mol. Catal. 16: 245-298.
94. Porra, R. J., Thompson, W. A., Kriedemann, P. E. (1989) "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: 384-394.
95. Peters, F. A. L. J., Van Spanning, R., Kraayenhof, R. (1983) "Studies on well coupled Photosystem I-enriched subchloroplast vesicles. Optimization of ferredoxin-mediated cyclic photophosphorylation and electric potential generation", Biochim. Biophys. Acta 724: 159-165.
96. Boucher, N., Harnois, J., Carpentier, R. (1990) "Heat-stress stimulation of flow in a photosystem I submembrane fraction", Biochem. Cell. Biol. 68: 999-1004.
97. Rajagopal, S., Bukhov, N. G., Carpentier, R. (2002) "Changes in the structure of chlorophyll-protein complexes and excitation energy transfer during photoinhibitory treatment of isolated photosystem I submembrane particles", J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 67: 194-200.
98. Velitchkova, M. Y., Carpentier, R. (1994) "Variable thermal dissipation in a Photosystem I submembrane fraction", Photosynth. Res. 40: 263-268.

99. Haldrup, A., Jensen, P. E., Lunde, C., Scheller, H. V. (2001) "Balance of power: a view of the mechanism of photosynthetic state transitions", *Trends Plant Sci.* 6: 301-305.
100. Allen, J. F. (2002) "Plastoquinone redox control of chloroplast thylakoid protein phosphorylation and distribution of excitation energy between photosystems: discovery, background, implications", *Photosynth. Res.* 73: 139-148.
101. Pfannschmidt, T. (2003) "Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes", *Trends Plant Sci.* 8: 33-41.
102. Bukhov, N. G., Egorova, E. A., 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.
103. Gauthier, A., Govindachary, S., Harnois, J., Carpentier, R. (2006) "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 QB niche", *Biochim. Biophys. Acta* 1757: 1547-1556.
104. Rich, P. R., Madgwick, S. A., Moss, D. A. (1991) "The interactions of duroquinol, DBMIB and NQNO with the chloroplast cytochrome *b_f* complex", *Biochim. Biophys. Acta* 1058: 312-328.
105. Delosme, R., Joliot, P. (2002) "Period four oscillations in chlorophyll *a* fluorescence", *Photosynth. Res.* 73: 165-168.
106. Dudekula, S., Fragata, M. (2006) "Investigation of the electron transfer site of *p*-benzoquinone in isolated photosystem II particles and thylakoid membranes using [α]- and [β]-cyclodextrins", *J. Photochem. Photobiol. B: Biol* 85: 177-183.

107. Satoh, K., Oh-hashii, M., Kashino, Y., Koike, H. (1995) "Mechanism of Electron Flow through the QB Site in Photosystem II. 1. Kinetics of the Reduction of Electron Acceptors at the QB and Plastoquinone Sites in Photosystem II Particles from the Cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*", Plant Cell Physiol. 36: 597-605.
108. Kashino, Y., Yamashita, M., Okamoto, Y., Koike, H., Satoh, K. (1996) "Mechanisms of Electron Flow through the QB Site in Photosystem II. 3. Effects of the Presence of Membrane Structure on the Redox Reactions at the QB Site", Plant Cell Physiol. 37: 976-982.
109. Koike, H., Yoneyama, K., Kashino, Y., Satoh, K. (1996) "Mechanism of Electron Flow through the QB Site in Photosystem II. 4. Reaction Mechanism of Plastoquinone Derivatives at the QB Site in Spinach Photosystem II Membrane Fragments", Plant Cell Physiol. 37: 983-988.
110. Satoh, K., Koike, H., Ichimura, T., Katoh, S. (1992) "Binding affinities of benzoquinones to the QB site of Photosystem II in *Synechococcus* oxygen-evolving preparation", Biochim. Biophys. Acta 1102: 45-52.
111. Bulychiev, A. A., Vredenberg, W. J. (2001) "Modulation of photosystem II chlorophyll fluorescence by electrogenic events generated by photosystem I", Bioelectrochemistry 54: 157-168.
112. Schansker, G., Srivastava, A., Govindjee, Strasser, R. J. (2003) "Characterization of the 820-nm transmission signal paralleling the chlorophyll *a* fluorescence rise (OJIP) in pea leaves", Funct. Plant Biol. 30: 785-796.
113. Schreiber, U., Neubauer, C., Klughammer, C. (1989) "Devices and methods for room-temperature fluorescence analysis", Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 323: 241-251.

114. Goltsev, V., Chernev, P., Zaharieva, I., Lambrev, P., Strasser, R. J. (2005) "Kinetics of delayed chlorophyll *a* fluorescence registered in milliseconds time range", *Photosynth. Res.* 84: 209-215.
115. Yaakoubd, B., Andersen, R., Desjardins, Y., Samson, G. (2002) "Contributions of the free oxidized and Q(B)-bound plastoquinone molecules to the thermal phase of chlorophyll-alpha fluorescence", *Photosynth. Res.* 74: 251-257.
116. Bukhov, N. G., Rajagopal, S., Carpentier, R. (2002) "Characterization of P700 as a photochemical quencher in isolated Photosystem I particles using simultaneous measurements of absorbance changes at 830 nm and photoacoustic signal", *Photosynth. Res.* 74: 295-302.
117. Bojko, M., Wieckowski, S. (1999) "NADPH and ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase-dependent reduction of quinones and their reoxidation", *Phytochemistry* 50: 203-208.
118. Bojko, M., Kruk, J., Wieckowski, S. (2003) "Plastoquinones are effectively reduced by ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase in the presence of sodium cholate micelles: Significance for cyclic electron transport and chlororespiration", *Phytochemistry* 64: 1055-1060.
119. Jean, J. M., Chan, C. K., Fleming, G. R., Owens, T. G. (1989) "Excitation transport and trapping on spectrally disordered lattices", *Biophys. J.* 56: 1203-1215.
120. Owens, T. G., Webb, S. P., Alberte, R. S., Mets, L., Fleming, G. R. (1988) "Antenna structure and excitation dynamics in photosystem I. I. Studies of detergent-isolated photosystem I preparations using time-resolved fluorescence analysis", *Biophys. J.* 53: 733-745.
121. Owens, T. G., Webb, S. P., Mets, L., Alberte, R. S., Fleming, G. R. (1989) "Antenna structure and excitation dynamics in photosystem I. II. Studies with

- mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* lacking photosystem II", *Biophys. J.* 56: 95-106.
122. Carpentier, R., Leblanc, R. M., Mimeault, M. (1989) "Photoacoustic detection of photosynthetic energy storage in Photosystem II submembrane fractions", *Biochim. Biophys. Acta* 975: 370-376.
 123. Franck, F., Dewez, D., Popovic, R. (2005) "Changes in the room-temperature emission spectrum of chlorophyll during fast and slow phases of the Kautsky effect in intact leaves", *Photochem. Photobiol.* 81: 431-436.
 124. Bredenkamp, G. J., Baker, N. R. (1990) "Modification of excitation energy distribution to photosystem I by protein phosphorylation and cation depletion during thylakoid biogenesis in wheat", *Photosynth. Res.* 23: 111-117.
 125. Percival, M. P., Baker, N. R. (1985) "Comparison of chlorophyll fluorescence emission characteristics of wheat leaf tissue and isolated thylakoids as a function of excitation wavelength", *Plant, Cell Environ.* 8: 41-48.
 126. Samson, G., Bruce, D. (1995) "Complementary changes in absorption cross-sections of Photosystems I and II due to phosphorylation and Mg^{2+} -depletion in spinach thylakoids", *Biochim. Biophys. Acta* 1232: 21-26.
 127. Siffel, P., Hunalova, I., Rohacek, K. (2000) "Light-induced quenching of chlorophyll fluorescence at 77 K in leaves, chloroplasts and Photosystem II particles", *Photosynth. Res.* 65: 219-229.
 128. Wollman, F. A. (2001) "State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus", *EMBO J.* 20: 3623-3630.
 129. Bellafigliore, S., Barneche, F., Peltier, G., Rochaix, J. D. (2005) "State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7", *Nature* 433: 892-895.

130. McTavish, H. (1988) "A demonstration of photosynthetic state transitions in nature", *Photosynth. Res.* V17: 247-254.
131. Zer, H., Vink, M., Shochat, S., Herrmann, R. G., Andersson, B., Ohad, I. (2003) "Light Affects the Accessibility of the Thylakoid Light Harvesting Complex II (LHCII) Phosphorylation Site to the Membrane Protein Kinase(s)", *Biochemistry* 42: 728-738.
132. Delphin, E., Duval, J. C., Etienne, A. L., Kirilovsky, D. (1996) "State Transitions or dpH-Dependent Quenching of Photosystem II Fluorescence in Red Algae", *Biochemistry* 35: 9435-9445.
133. David Law, R., Crafts-Brandner, S. J. (1999) "Inhibition and Acclimation of Photosynthesis to Heat Stress Is Closely Correlated with Activation of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase", *J. Plant. Physiol.* 120: 173-182.
134. Susanne, R., Christoph, G., Krause, G. H. (1987) "Inactivation of the photosynthetic carbon reduction cycle in isolated mesophyll protoplasts subjected to freezing stress", *Photosynth. Res.* 14: 137-145.
135. Teicher, H. B., Scheller, H. V. (1998) "The NAD(P)H Dehydrogenase in Barley Thylakoids Is Photoactivatable and Uses NADPH as well as NADH", *Plant Physiol.* 117: 525-532.
136. Bendall, D. S., Manasse, R. S. (1995) "Cyclic photophosphorylation and electron transport", *Biochim. Biophys. Acta* 1229: 23-38.
137. Cleland, R. E., Bendall, D. S. (1992) "Photosystem I cyclic electron transport: Measurement of ferredoxin-plastoquinone reductase activity", *Photosynth. Res.* 34: 409-418.
138. Miyake, C., Shinzaki, Y., Miyata, M., Tomizawa, K. i. (2004) "Enhancement of Cyclic Electron Flow Around PSI at High Light and its Contribution to the Induction of Non-Photochemical Quenching of Chl Fluorescence in Intact Leaves of Tobacco Plants", *Plant Cell Physiol.* 45: 1426-1433.

139. Miyake, C., Horiguchi, S., Makino, A., Shinzaki, Y., Yamamoto, H., Tomizawa, K. i. (2005) "Effects of Light Intensity on Cyclic Electron Flow Around PSI and its Relationship to Non-photochemical Quenching of Chl Fluorescence in Tobacco Leaves", *Plant Cell Physiol.* 46: 1819-1830.
140. Bukhov, N. G., Carpentier, R. (2002) "Application of photoacoustic methods to study alternative photosystem I-dependant electron transport routes", *Trends Photochem. Photobiol.* 9: 107-121.
141. Joet, T., Cournac, L., Peltier, G., Havaux, M. (2002) "Cyclic Electron Flow around Photosystem I in C3 Plants. In Vivo Control by the Redox State of Chloroplasts and Involvement of the NADH-Dehydrogenase Complex", *Plant Physiol.* 128: 760-769.