

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

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

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

**PAR
RÉMY BEAUCHEMIN**

**INTERACTIONS DES POLYAMINES
AVEC L'ALBUMINE HUMAINE ET LE PHOTOSYSTÈME II**

JUIN 2009

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 tous les professeurs qui ont contribué à ma formation pour faire de moi un meilleur étudiant-chercheur, et tout particulièrement mon directeur de recherche, le docteur Robert Carpentier, ainsi que mon co-directeur de recherche, le docteur Heidar-Ali Tajmir-Riahi.

J'aimerais également remercier toutes les personnes ayant participé à mes travaux de recherche durant ces années de maîtrise pour leur aide et leur contribution inestimable, tout spécialement Johanne, Sri, David, Alain et Steve, qui par leur présence également, ont rendu mon travail en laboratoire particulièrement intéressant.

AVANT-PROPOS

Ce mémoire comporte trois articles scientifiques. Les travaux présentés ont été effectués sous la supervision de mon directeur de recherche, le Professeur Robert Carpentier, et de mon codirecteur de recherche, le docteur Heidar Ali Tajmir-Riahi.

Dans le cadre de l'article intitulé « Polyamine analogues bind human serum albumin » (chapitre IV), C.N. N'soukpoé-Kossi a supervisé les techniques appliquées à l'analyse des résultats, T.J. Thomas et T. Thomas ont fourni les polyamines analogues, tandis que H.A. Tajmir-Riahi a rédigé 50% de l'article. Pour ma part, j'ai effectué toutes les mesures et participé à 50% de la rédaction de l'article.

Dans le cadre de l'article intitulé « Interaction of polyamines with proteins of photosystem II : Cation binding and photosynthetic oxygen evolution » (chapitre V), J. Harnois a réalisé des extractions de matériel biologique, R. Rouillon a effectué les expériences de FTIR, H.A. Tajmir-Riahi a participé à 25% de la rédaction de l'article alors que R. Carpentier a participé à 50% de celle-ci. Pour ma part, j'ai effectué plusieurs des extractions biologiques, toutes les mesures de dégagement d'oxygène et d'induction de fluorescence, en plus de participer à 25% de la rédaction de l'article.

Dans le cadre de l'article intitulé « Spermine and spermidine inhibition of photosystem II : Disassembly of the oxygen evolving complex and consequent perturbation in electron donation from Tyr_Z to P680⁺ and the quinone acceptors Q_A⁻ to Q_B » (chapitre VI), A. Gauthier a effectué les expériences de thermoluminescence, J. Harnois a réalisé certaines extractions du matériel biologique et plusieurs des électrophorèses, S. Boisvert a réalisé l'expérience de détermination du manganèse, S. Govindachary a réalisé l'expérience d'oxydoréduction de Q_A tout en rédigeant 25% de l'article, alors que R. Carpentier a participé à 25% de la rédaction de l'article. Pour ma part, j'ai effectué la majorité des extractions du matériel biologique, toutes les mesures de dégagement d'oxygène et d'induction de fluorescence, ainsi que plusieurs des électrophorèses, en plus de participer à 50% de la rédaction de l'article.

RÉSUMÉ

Les polyamines putrescine, spermidine et spermine sont des amines organiques aliphatiques présentes chez les bactéries, les plantes et les animaux. Les polyamines sont chargées positivement à pH physiologique et interagissent avec les macromolécules chargées négativement tel que les acides nucléiques, les protéines et les phospholipides pour réguler leurs propriétés physiques et chimiques. Les polyamines ont plusieurs fonctions biologiques dans la régulation de la prolifération, de la différenciation et de la mort cellulaire, mais aussi dans la réponse des organismes à diverses conditions de stress biotiques et abiotiques. La régulation des concentrations intracellulaires de polyamines est un mécanisme complexe dépendant de la régulation des enzymes essentielles à leur synthèse, leur transport et leur catabolisme.

Les cellules cancéreuses retrouvées chez les animaux présentent des concentrations de polyamines supérieures à celles des cellules saines, attribuables vraisemblablement à une surexpression des enzymes de biosynthèse des polyamines, et à une diminution de la capacité naturelle des cellules à exporter les polyamines par des systèmes encore non identifiés; les molécules analogues aux polyamines créées en laboratoire démontrent une activité antitumorale efficace dans plusieurs modèles expérimentaux humains *in vitro*. Les cellules végétales soumises à diverses conditions de stress abiotique présentent également une augmentation des concentrations intracellulaires de polyamines face au stress oxydatif produit, menant éventuellement à des difficultés de croissance cellulaire; les polyamines sont essentielles au développement des chloroplastes et pour l'intégrité des membranes photosynthétiques, mais problématiques en trop fortes concentrations.

Le présent projet de recherche comprend deux volets, un premier pour déterminer la nature des interactions de certaines molécules analogues aux polyamines avec la principale protéine de transport dans le plasma sanguin, l'albumine sérique humaine (HSA : human serum albumin), et un second pour déterminer la nature des interactions entre les polyamines naturelles et l'appareil photosynthétique dans les

cellules végétales. Les interactions entre les polyamines analogues et la protéine HSA ont été déterminées par spectroscopie d'absorption UV-visible, spectroscopie de dichroïsme circulaire (CD : circular dichroism) et spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR : fourier transform infrared), alors que les interactions entre les polyamines naturelles et le photosystème II (PSII) ont été déterminées par spectroscopie FTIR, par dégagement d'oxygène (standard et avec flash), par induction de fluorescence, par thermoluminescence, par cinétique de déclin de fluorescence induite par flash, par électrophorèse et par détermination du manganèse.

Les polyamines analogues 1,11-diamino-4,8-diazaudécane (333), 3,7,11,15-tétrazaheptadécane•4HCl (BE-333) et 3,7,11,15,19-pentazahénicosane•5HCl (BE-3333) se lient de façon non spécifique par pont H au niveau des groupes polaires de HSA, avec une affinité inférieure aux polyamines naturelles. Le nombre de charges positives associées aux polyamines naturelles contribue à la stabilité du complexe protéine-polyamine selon l'ordre spermine > spermidine > putrescine, contrairement à l'affinité des polyamines analogues avec HSA selon l'ordre 333 > BE-333 > BE-3333. La structure générale de la protéine HSA est moins perturbée par les polyamines analogues que par les polyamines naturelles. Les polyamines naturelles diaminopropane, putrescine et cadaverine se lient également au niveau des groupes C=O des protéines du PSII comme la spermine et la spermidine. La complexation des diamines avec les protéines du PSII ne produit pas de changement de structure important comparativement aux polyamines spermine et spermidine. L'interaction des polyamines avec le PSII induit une inhibition de l'activité de dégagement d'oxygène dans des concentrations de l'ordre du millimolaire. L'inhibition de l'activité du PSII provient de la déstabilisation du complexe de dégagement d'oxygène (CDO) suite à la perte des protéines extrinsèques du CDO.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
AVANT-PROPOS	iii
RÉSUMÉ	iv
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES TABLEAUX	xv
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xvi
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
1.1 Préface	1
1.2 Nature des polyamines	1
1.3 Synthèse des polyamines	3
1.4 Dégradation des polyamines	4
1.5 Transport des polyamines	6
1.6 Homéostasie des polyamines	7
1.6.1 Ornithine décarboxylase	7
1.6.2 S-adénosylméthionine décarboxylase	8
1.6.3 Spermidine/spermine N ¹ -acétyltransférase	9
1.7 Croissance et polyamines	9
1.8 Cancer et polyamines	11
1.9 Stress et polyamines	14
1.10 Photosynthèse	16
1.10.1 Phases énergétiques	17
1.10.2 Membranes photosynthétiques	17
1.10.3 Appareillage photosynthétique	18
1.10.4 Pigments photocollecteurs	20
1.10.5 Photosystème II	20
1.10.6 Transport des électrons	23
1.10.7 Cytochrome b ₆ f	25
1.10.8 Photosystème I	25
1.11 Problématique et objectifs du projet	27

CHAPITRE II	MÉTHODES EXPÉRIMENTALES	-----29
2.1	Matériel utilisé	-----29
2.2	Préparation des solutions stocks	-----29
2.3	Isolation des fractions membranaires enrichies en PSII	-----30
2.4	Spectroscopie d'absorption UV-visible pour HSA	-----30
2.5	Spectroscopie de dichroïsme circulaire pour HSA	-----31
2.5.1	Analyse de la structure secondaire par CD de HSA	-----31
2.6	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier pour HSA	-----32
2.6.1	Analyse de la structure secondaire par FTIR pour HSA	-----33
2.7	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier pour PSII	-----35
2.7.1	Analyse de la structure secondaire par FTIR pour PSII	-----36
2.8	Dégagement d'oxygène standard	-----37
2.9	Induction de fluorescence	-----37
2.10	Thermoluminescence	-----38
2.11	Cinétique de l'affaiblissement de la fluorescence induite par flash	-----39
2.12	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide	-----40
2.13	Détermination du manganèse	-----40
2.14	Taux de dégagement d'oxygène induit par flash	-----41
2.14.1	Analyse de la distribution des paramètres des états S	-----41
CHAPITRE III	POLYAMINE ANALOGUES BIND HUMAN SERUM	
	ALBUMIN	-----42
3.1	Résumé	-----43
3.2	Abstract	-----45
3.3	Introduction	-----45
3.4	Experimental procedures	-----47
3.4.1	Materials	-----47
3.4.2	Preparation of stock solutions	-----47
3.4.3	Absorption spectroscopy	-----47
3.4.4	CD spectroscopy	-----48
3.4.5	FTIR spectroscopy measurements	-----48
3.4.6	Analysis of protein secondary structure	-----49

3.5	Results and discussion -----	50
3.5.1	FTIR spectra of polyamine-HSA adducts -----	50
3.5.2	CD spectra -----	51
3.5.3	Stability of polyamine analogue-HSA complexes -----	52
3.5.4	Comparison Between Polyamine Analogue-HSA and Biogenic Polyamine-HSA Interactions -----	52
3.6	Acknowledgement -----	54
3.7	References -----	54
3.8	Figure captions -----	57
CHAPITRE IV	INTERACTION OF POLYAMINES WITH PROTEINS OF PHOTOSYSTEM II : CATION BINDING AND PHOTOSYNTHETIC OXYGEN EVOLUTION -----	70
4.1	Résumé -----	71
4.2	Abstract -----	73
4.3	Introduction -----	73
4.4	Materials and methods -----	74
4.5	Results and discussion -----	77
4.6	Acknowledgements -----	81
4.7	References -----	82
4.8	Figure captions -----	84
CHAPITRE V	SPERMINE AND SPERMIDINE INHIBITION OF PHOTOSYSTEM II : DISASSEMBLY OF THE OXYGEN EVOLVING COMPLEX AND CONSEQUENT PERTURBATION IN ELECTRON DONATION FROM TYR_Z TO P680⁺ AND THE QUINONE ACCEPTORS Q_A⁻ TO Q_B -----	90
5.1	Résumé -----	91
5.2	Abstract -----	93
5.3	Introduction -----	93
5.4	Materials and methods -----	95
5.4.1	Isolation of photosystem II submembrane fractions -----	95

5.4.2	Oxygen evolution	96
5.4.3	Fluorescence induction	96
5.4.4	Thermoluminescence	96
5.4.5	Flash-induced fluorescence decay kinetics	97
5.4.6	Polyacrylamide gel electrophoresis	98
5.4.7	Manganese determination	99
5.5	Results	99
5.6	Discussion	105
5.7	Acknowledgements	110
5.8	References	110
5.9	Figure captions	118
CHAPITRE VI	ANALYSE DE L'INTERACTION DES POLYAMINES AVEC LE COMPLEXE DE MANGANÈSE PAR MESURE DE TAUX DE DÉGAGEMENT D'OXYGÈNE APRÈS FLASH DANS LES THYLACOÏDES	126
6.1	Oscillation en quatre temps du dégagement d'oxygène	126
6.2	Inhibition par la spermine	129
6.3	Inhibition par l'hydroxylamine	132
CHAPITRE VII	DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS	135
7.1	Objectifs de recherche	135
7.2	Interaction des polyamines avec l'albumine sérique humaine	136
7.3	Interaction des polyamines avec le photosystème II	142
7.4	Perspectives de recherche	156
BIBLIOGRAPHIE		158

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 :	Structure des polyamines naturelles -----	2
Figure 1.2 :	Voies de biosynthèse des polyamines au sein des plantes, des animaux et des bactéries indiquées par des flèches vertes, bleues et rouges respectivement. Adapté de Kusano et al. (2008) -----	4
Figure 1.3 :	Voies de dégradation des polyamines au sein des plantes, des animaux et des bactéries indiquées par des flèches vertes, bleues et rouges respectivement. Adapté de Kusano et al. (2008) -----	5
Figure 1.4 :	Structure des chloroplastes. Adapté de Garret et Grisham (2000) -----	18
Figure 1.5 :	Représentation schématique de la structure de la membrane thylacoïde. Adapté de Joly (2007) -----	19
Figure 1.6 :	Représentation schématique de la structure du photosystème II. Adapté de Joly (2007) -----	21
Figure 1.7 :	Schéma en Z du transport des électrons dans la membrane de thylacoïde. Adapté de Joly (2007) -----	24
Figure 1.8 :	Représentation schématique de la structure du photosystème I. Adapté de Joly (2007) -----	26
Figure 3.1 :	Polyamine Analogues -----	62
Figure 3.2 :	Chemical structure of human serum albumin -----	63

- Figure 3.3 : FTIR spectra in the region of $1800\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ of hydrated films (pH 7.2) for free HSA (0.25 mM) and 333-HSA adducts (top three curves) and difference spectra (Diff.) of polyamine-HSA complexes (bottom two curves) obtained at different polyamine concentrations (indicated on the figure) -----64
- Figure 3.4 : FTIR spectra in the region of $1800\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ of hydrated films (pH 7.2) for free HSA (0.25 mM) and BE-333-HSA adducts (top three curves) and difference spectra (Diff.) of polyamine-HSA complexes (bottom two curves) obtained at different polyamine concentrations (indicated on figure) -----65
- Figure 3.5 : FTIR spectra in the region of $1800\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ of hydrated films (pH 7.2) for free HSA (0.25 mM) and BE-3333-HSA adducts (top three curves) and difference spectra (Diff.) of polyamine-HSA complexes (bottom two curves) obtained at different polyamine concentrations (indicated on figure) -----66
- Figure 3.6 : Second derivative resolution enhancement and curve-fitted amide I region ($1700\text{-}1612\text{ cm}^{-1}$) for free HSA and its polyamine adducts in aqueous solution with 1 mM polyamine and 1.5 mM protein concentrations ----67
- Figure 3.7 : Circular dichroism of the free HSA and its polyamine analogue complexes in aqueous solution with protein concentration of 12.5 μM and polyamine concentrations of 0.25, 0.5, and 1 mM -----68
- Figure 3.8 : Plot of $1/(A-A_0)$ vs $(1/L)$ and the binding constant K for polyamine-HSA complexes, where A_0 is the initial absorbance of HSA (280 nm), and A is the recorded absorbance at different polyamine concentrations (L) -----69

- Figure 4.1: Structure of the diamines (1,3-diaminopropane, putrescine, and cadaverine) -----86
- Figure 4.2 : FTIR spectra (top curve) and difference spectra [(PSII + diamine) - (PSII)] (bottom six curves) of uncomplexed PSII and its 1,3-diaminopropane, putrescine, and cadaverine complexes in the region of 1800-1500 cm^{-1} with two diamine concentrations. The FTIR spectrum of diaminopropane alone is also given for comparison, cadaverine and putrescine have similar spectral properties consistent with a major IR absorption around 1600 cm^{-1} also found for propylamine and tert-butylamine [31] -----87
- Figure 4.3 : The inhibitory effects of cadaverine (trace 1), 1,3-diaminopropane (trace 2), and putrescine (trace 3), on the rate of photosynthetic oxygen evolution in PSII submembrane fractions -----88
- Figure 4.4 : Effect of increasing diaminopropane concentration in PS II submembrane fractions on the Chl fluorescence parameters (A) F_m , F_0 and (B) F_v/F_m , and (C) Chl a fluorescence induction: trace 1, control; trace 2, 6 mM 1,3-diaminopropane; trace 3, 6 mM diaminopropane together with 1 mM diphenylcarbazide -----89
- Figure 5.1 : Inhibition of oxygen evolution activity in PSII submembrane fractions after a 5-min incubation with various concentrations of spermine (open circles) or spermidine (closed circles). Other conditions are given in Materials and methods -----121

Figure 5.2 : (A) Effect of increasing spermidine (closed circles) on the F_v/F_0 ratio in PSII submembrane fractions. (B) Fluorescence induction traces with diphenylcarbazide: (1) control; (2) 3 mM spermidine; (3) 3 mM spermidine and 1 mM diphenylcarbazide. (C) Fluorescence induction traces of PSII membranes treated with various concentrations of spermidine: (1) control; (2) 2 mM; (3) 4 mM; (4) 7 mM. All traces were normalized at both initial and maximal intensities -----122

Figure 5.3 : Effects of a 5-min incubation of PSII submembrane fractions (100 μ g Chl/mL) in the presence of spermidine on the polypeptide profile. Upper panel: Lane 1, molecular weight standards; lane 2, control PSII; lane 3, spermidine-treated PSII; lane 4, supernatant of spermidine-treated PSII; lane 5, supernatant of the Tris-alkali treated PSII; lane 6, Tris-alkali treated PSII. Numbers on the left side indicate apparent molecular masses (kDa) of the molecular markers. Lower panel: 33 kDa polypeptide content of the PSII submembrane fractions as a function of spermidine concentration -----123

Figure 5.4 : Temperature profile of the thermoluminescence emission from PSII submembrane fractions in the absence (B-band) (A) or presence (Q- and C-bands) (B) of 5 μ M DCMU with various spermine concentrations: 1, control; 2, 0.5 mM; 3, 1 mM; 4, 2 mM; 5, 5 mM; 6, 10 mM. Inset: Relative thermoluminescence intensity of the B-band (closed circles) and the Q-band (open circles) at various spermine concentrations -----124

Figure 5.5 : Chl fluorescence decay kinetics of PSII submembrane fractions alone (trace 1) or treated with 1 (trace 2), 2 (trace 3) or 4 (trace 4) mM spermine. Upward arrow indicates the application of the single turn-over saturating white flash. Each trace is the average of nine independent measurements -----125

Figure 6.1 :	Dégagement d'oxygène induit par flash dans les chloroplastes d'épinards. Adapté de Forbush et al. (1971) -----	126
Figure 6.2 :	Modèle classique de Kok. Adapté de Shinkarev (2005a) -----	127
Figure 6.3 :	(A) Modèle amélioré de Kok proposé par Shinkarev (2005b). (B) Modèle amélioré de Kok proposé par Renger et Kühn (2007) -----	128
Figure 6.4 :	Taux de dégagement d'oxygène global suivant les 12 premiers flashes lumineux pour des thylacoïdes traités avec la spermine -----	129
Figure 6.5 :	Taux de dégagement d'oxygène après flashes lumineux pour des thylacoïdes traités avec la spermine -----	130
Figure 6.6 :	Répartition initiale des états S des complexes de manganèse dans les thylacoïdes traités avec la spermine -----	131
Figure 6.7 :	Répartition des paramètres de transition des états S des complexes de manganèse dans les thylacoïdes traités avec la spermine -----	131
Figure 6.8 :	Taux de dégagement d'oxygène global suivant les 12 premiers flashes lumineux pour des thylacoïdes traités avec l'hydroxylamine -----	132
Figure 6.9 :	Répartition initiale des états S des complexes de manganèse dans les thylacoïdes traités avec l'hydroxylamine -----	134
Figure 6.10 :	Répartition des paramètres de transition des états S des complexes de manganèse dans les thylacoïdes traités avec l'hydroxylamine -----	134

LISTE DES TABLEAUX

Table 3.1 :	Secondary structure analysis (Infrared) for the free HSA and its polyamine analogue complexes in H ₂ O at pH 7.2 -----	59
Table 3.2 :	Secondary structure of HSA complexes with polyamine analogues calculated by CDSSTR software (CD spectra) -----	60
Table 3.3 :	Secondary structure analysis (infrared) for the free HSA and its biogenic polyamine complexes in H ₂ O at pH 7.2 -----	61
Table 4.1 :	Secondary structure determination of PSII proteins in the presence of diamines (cadaverine, 1,3-diaminopropane, putrescine), and inhibition of oxygen evolution in PSII at various diamine concentrations -----	85
Table 5.1 :	Half-times ($t_{1/2}$, in ms) and amplitudes (A) of the three exponential components of the Chl fluorescence decay in PSII submembrane fractions (25 µg/ml) incubated for 3 min in the dark at $20 \pm 2^\circ\text{C}$ in the absence or presence of spermine -----	120

LISTE DES ABRÉVIATIONS

333	1,11-diamino-4,8-diazaudécane
ADC	Arginine décarboxylase
AIH	Agmatine iminohydrolase
BE-333	3,7,11,15-tétrazaheptadécane•4HCl
BE-3333	3,7,11,15,19-pentazahénicosane•5HCl
CD	Dichroïsme circulaire
CDKs	kinases cycline-dépendantes
Chl	Chlorophylle
COE	Complexe d'oxydation de l'eau
CPA	<i>N</i> -carbamoylputrescine aminohydrolase
Cyt b ₆ f	Cytochrome b ₆ f
DAO	Diamine oxydase
DCBQ	2,5-dichlorobenzoquinone
DCMU	3-(3',4'-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée
DMFO	α -difluoromethylornithine
DPC	Diphénylcarbazine
F ₀	Niveau minimal de fluorescence
F _m	Niveau maximal de fluorescence
F _v	Fluorescence variable
FNR	Ferrédoxine-NADP ⁺ -réductase
FTIR	Infrarouge à transformée de Fourier
HSA	Albumine sérique humaine
LHC	Antenne photocollectrice de lumière
OAZ	Ornithine antizyme
OAZI	Ornithine antizyme inhibitrice
ODC	Ornithine décarboxylase
P680	Donneur primaire d'électrons du photosystème II
P700	Donneur primaire d'électrons du photosystème I
PAO	Polyamine oxydase

PC	Plastocyanine
PMSF	Fluorure de phénylmétanesulfonyle
PQ	Plastoquinone
PQH ₂	Plastoquinol
PSI	Photosystème I
PSII	Photosystème II
Q _A	Quinone acceptrice primaire du photosystème II
Q _B	Quinone acceptrice secondaire du photosystème II
ROS	Espèces réactives d'oxygène
SAM	<i>S</i> -adénosylméthionine
SAMDC	<i>S</i> -adénosylméthionine décarboxylase
SPDS	Spermidine synthase
SPMS	Spermine synthase
SSAT	Spermidine/spermine <i>N</i> ¹ -acétyltransférase
TDO	Taux de dégagement d'oxygène
T _m	Température d'émission maximale de thermoluminescence
Tyr _D	Tyrosine D
Tyr _Z	Tyrosine Z; donneur d'électron principal du P680

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Préface

Les polyamines sont reconnues pour être des molécules essentielles à la croissance et la différenciation cellulaire chez les eucaryotes, tant chez les animaux que chez les végétaux; toutefois, plusieurs de leurs mécanismes d'action sont toujours inconnus à ce jour. Le présent mémoire met l'emphasis sur l'étude des interactions de différents types de polyamines avec deux systèmes protéiques distincts: les polyamines analogues avec l'albumine sérique chez l'humain et les polyamines naturelles avec le photosystème II chez la plante. Les raisons qui motivent l'incorporation de ces travaux différents dans ce même mémoire sont multiples. D'un côté scientifique, les polyamines sont primordiales à toutes les cellules eucaryotes et il est donc intéressant à mon avis de pouvoir étudier l'interaction de systèmes disparates avec des molécules semblables. D'un côté pragmatique, les études des dernières décennies ont démontré que la régulation des concentrations cellulaires des polyamines, tant au niveau des mécanismes associés au cancer chez les humains que du stress chez les plantes, est un point névralgique dans la compréhension de ces phénomènes aux enjeux importants dans la société actuelle. L'étude des interactions des polyamines, avec l'albumine sérique humaine et le photosystème II, présente donc des caractéristiques et des intérêts qui me permettent d'inclure ces deux modèles de recherche conjointement dans ce travail.

1.2 Nature des polyamines

Les polyamines sont des cations aliphatiques organiques de faible poids moléculaire omniprésents dans presque tous les organismes vivants, tant au niveau des bactéries, que des plantes et des animaux (Tabor et Tabor 1984, Smith 1985, Pegg et McCann 1982). Le terme polyamine est principalement utilisé pour désigner trois molécules particulières, la putrescine, la spermine et la spermidine tel que montré dans la figure 1.1 :

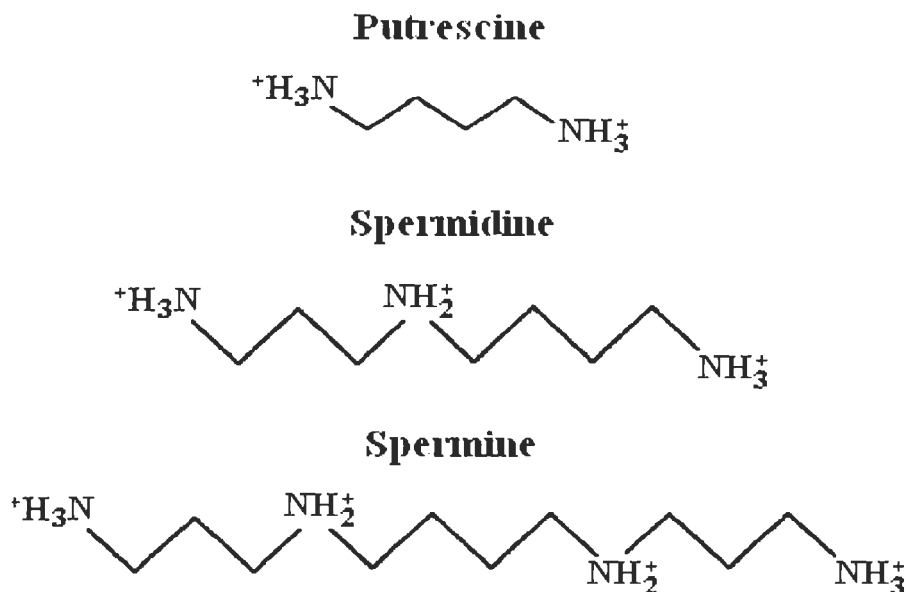


Figure 1.1: Structure des polyamines naturelles.

Chez les cellules eucaryotes, les polyamines ont plusieurs rôles importants au niveau de la régulation de la transcription et de la traduction des gènes, de la croissance cellulaire, dans la régulation de l'activité de certains canaux ioniques et signaux cellulaires ainsi qu'au niveau de l'apoptose (Igarashi et Kashiwagi 2000, Thomas et Thomas 2001, Childs et al. 2003, Seiler et Raul 2005). Les polyamines sont également produites chez les plantes en réponse aux conditions de stress salin, de sécheresse, de radicaux libres et de rayonnement UV (Bors et al. 1989, Brosché et Strid 2003, Capell et al. 2004, Zapata et al. 2004, Lütz et al. 2005).

Les polyamines sont des molécules solubles dans l'eau et chargées positivement à pH physiologique avec leur pK d'environ 10 (Seiler et al. 1996). Les polyamines se retrouvent sous trois formes différentes en équilibre dans les organismes vivants, soit sous forme libre comme cation, soit sous forme conjuguée avec des petites molécules telles que les acides phénoliques, et sous forme liée avec des macromolécules chargées négativement comme les acides nucléiques, les phospholipides et les protéines (Martin-Tanguy 1997). Les fonctions des polyamines semblent vraisemblablement dépendantes

de leur charge électrique, dans la mesure où leur énergie de liaison diminue parallèlement à leur nombre de charges électriques, ce qui fait que la spermine est plus active que la putrescine dans le contrôle des divers processus physiologiques associés. La liaison des polyamines aux molécules biologiques est à la base de leurs fonctions physiologiques (Yuan et al. 2001).

1.3 Synthèse des polyamines

Les voies physiologiques de synthèse des polyamines sont conservées des bactéries aux animaux et aux plantes, lesquelles ne présentent que de légères variations entre les différents organismes (Tabor et Tabor 1984). Les cellules eucaryotes produisent la putrescine à partir de la décarboxylation de l'ornithine par l'action de l'enzyme ornithine décarboxylase (ODC), laquelle est l'étape limitante lors de la biosynthèse des polyamines tel que montrée dans la figure 1.2; l'ornithine provient de l'hydrolyse catalytique de l'arginine par l'arginase. La spermidine est ensuite synthétisée à partir de la putrescine par l'ajout d'un groupe aminopropyle, réaction catalysée par l'enzyme spermidine synthase (SPDS); le groupe aminopropyle provient de la décarboxylation d'une molécule de *S*-adénosylméthionine (SAM) produite à partir de l'acide aminé méthionine, réactions catalysées successivement par les enzymes méthionine adénosyltransférase (MAT) et *S*-adénosylméthionine décarboxylase (SAMDC). La synthèse de la spermine est finalement possible à partir de la spermidine par l'ajout d'un autre groupe aminopropyle via la spermine synthase (SPMS). Dans le cas où la synthèse des polyamines est insuffisante pour les besoins cellulaires, les cellules eucaryotes peuvent importer des polyamines de nature exogène tout comme les molécules précurseurs aux polyamines (Wallace et al. 2003*b*).

Chez les plantes, la putrescine est également synthétisée via une autre molécule, l'agmatine, par une série de trois réactions enzymatiques catalysées par les enzymes arginine décarboxylase (ADC), agmatine iminohydrolase (AIH) et *N*-carbamoylputrescine aminohydrolase (CPA) respectivement, et ce, en utilisant l'arginine comme molécule de base (Kusano et al. 2008).

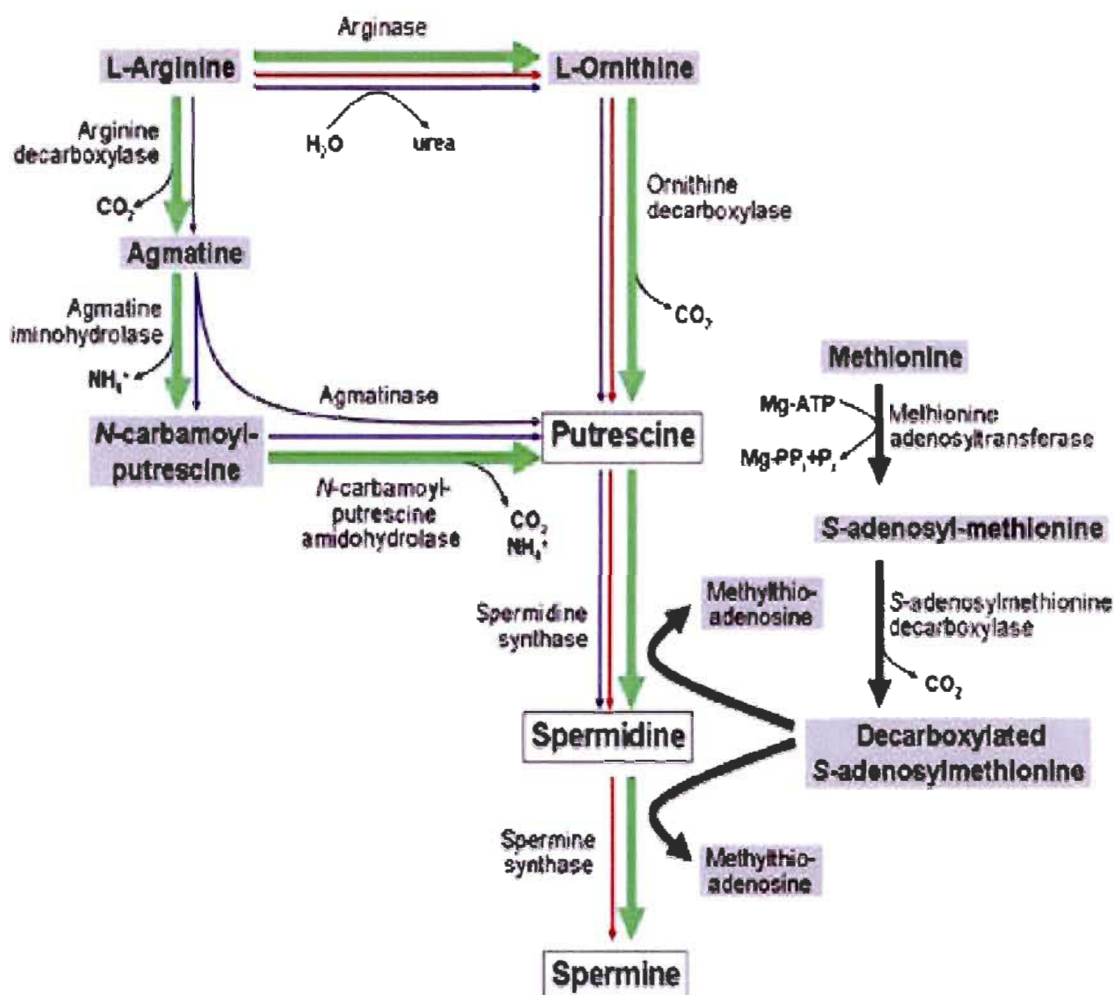


Figure 1.2: Voies de biosynthèse des polyamines au sein des plantes, des animaux et des bactéries indiquées par des flèches vertes, bleues et rouges respectivement. Adapté de Kusano et al. (2008).

1.4 Dégénération des polyamines

Les voies physiologiques de dégradation des polyamines sont montrées dans la figure 1.3. Chez les animaux, le catabolisme des polyamines débute par l'ajout d'un groupe acétyle provenant de la coenzyme A sur la spermine, réaction catalysée par l'enzyme spermidine/spermine *N*¹-acétyltransférase (SSAT). La spermine acétylée est ensuite dégradée en spermidine par l'enzyme polyamine oxydase (PAO), laquelle réaction produit une molécule de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et de 3-acéto-aminopropanal; la molécule d'aldéhyde est transformée en β -alanine par l'action des enzymes aldéhyde déshydrogénase et *N*-acétyl- β -alanine déacétylase (Seiler 2004).

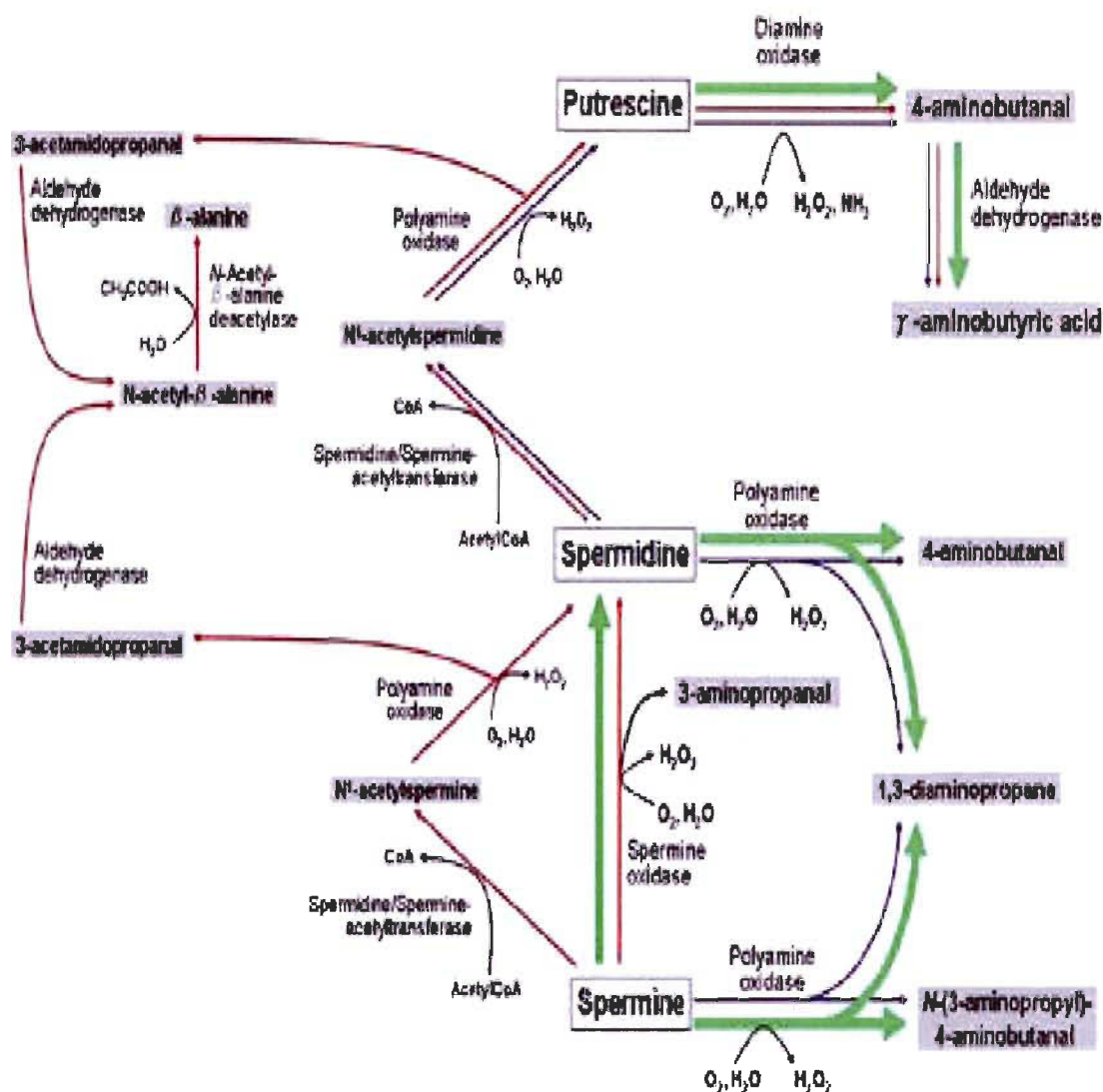


Figure 1.3: Voies de dégradation des polyamines au sein des plantes, des animaux et des bactéries indiquées par des flèches vertes, bleues et rouges respectivement. Adapté de Kusano et al. (2008).

La spermidine est ultérieurement catabolisée en putrescine par un mécanisme semblable à la dégradation de la spermine en spermidine grâce aux enzymes SSAT et PAO. La putrescine peut être transformée par une série de réactions en acide γ -aminobutyrique, le neurotransmetteur GABA, sous l'action des enzymes diamine oxydase (DAO) et aldéhyde déshydrogénase; l'acide γ -aminobutyrique peut être à son tour catabolisé en succinate par une série de réactions enzymatiques, laquelle molécule est la voie d'entrée dans le cycle de Krebs (Walters 2003, Moinard et al. 2005).

Chez les plantes, il existe une autre voie par laquelle les polyamines peuvent être catabolisées. L'enzyme PAO catalyse la conversion de la spermine et de la spermidine en *N*-(3-aminopropyle)-4-aminobutanal et en 4-aminobutanal respectivement, tout en produisant une molécule de H_2O_2 et de 1,3-diaminopropane; la molécule de 1,3-diaminopropane est ultérieurement dégradée en β -alanine (Bouchereau et al. 1999).

1.5 Transport des polyamines

Le transport des polyamines à travers les membranes cellulaires, englobant tant l'importation que l'exportation, est un mécanisme participant à la régulation des concentrations cellulaires de polyamine (Wallace 1996). Bien que les systèmes de transport n'aient pas été identifiés chez les animaux et les plantes contrairement aux bactéries, il existe quelques modèles proposés dans la littérature. Chez les cellules animales, un modèle propose que les polyamines soient importées à l'intérieur de la cellule par des transporteurs non-identifiés utilisant un potentiel membranaire, menant à la séquestration des polyamines dans des vésicules par un échange possible de protons grâce à un gradient de pH construit par une enzyme ATPase vacuolaire (Soulet et al. 2004). Dans la plupart des cellules, il existe possiblement deux transporteurs présentant des affinités marquées pour différentes polyamines, un premier pour la putrescine, un second pour la spermidine et la spermine (Seiler et al. 1996). Toutefois, la spécificité des systèmes de transport associés aux polyamines n'est pas trop restrictive, dans la mesure où des molécules analogues aux polyamines peuvent être incorporées par ces mêmes cellules (Thomas et al. 2002).

Les données démontrent que l'exportation cellulaire des polyamines est un mécanisme qui est régulé par le statut de croissance de la cellule, étant activé par une diminution dans le taux de croissance cellulaire et désactivé en réponse à un stimulus de croissance cellulaire (Wallace et Keir 1981). Dans la plupart des cas, la forme acétylée de la spermidine et la putrescine sont les deux polyamines majeures sécrétées par une cellule, alors que la spermine représente habituellement la molécule avec la concentration intracellulaire la plus élevée, spécialement chez les cellules humaines (Wallace et Mackarel 1998). L'exportation des polyamines est considérée comme un

processus sélectif qui est probablement contrôlé par le métabolisme des polyamines, dans la mesure où les protéines de transport des polyamines ainsi que les enzymes participant à leur dégradation sont potentiellement régulées par les mêmes signaux. Il est démontré expérimentalement que les mécanismes d'importation et d'exportation des polyamines utilisent des transporteurs différents (Wallace et al. 2003*b*).

1.6 Homéostasie des polyamines

Les niveaux intracellulaires de polyamines sont régulés simultanément par leurs mécanismes de biosynthèse, de dégradation et de transport. Les concentrations retrouvées naturellement varient entre plusieurs centaines de micromolaires à quelques millimolaires; des concentrations inférieures empêchent la croissance cellulaire alors que des concentrations supérieures induisent l'apoptose, tant par la production de peroxyde d'hydrogène relié à la dégradation des polyamines ou par la perturbation de l'intégrité des mitochondries suite à l'accumulation excessive des polyamines dans le milieu cellulaire. L'homéostasie des polyamines dépend principalement de la régulation de trois enzymes particulières, l'ODC, la SAMDC et la SSTA (Thomas et Thomas 2001, Wallace et al. 2003*b*, Moinard et al. 2005, Kusano et al. 2008).

1.6.1 Ornithine décarboxylase

L'ODC est la principale enzyme régulant la concentration cellulaire des polyamines chez les cellules animales. Le temps de demi-vie de l'enzyme est de 10 à 60 minutes, contrairement à la plupart des enzymes animales qui ont un temps de demi-vie de l'ordre de quelques jours (Heby 1985). Lorsque les niveaux de polyamine sont élevés, la protéine ornithine antizyme (OAZ) se lie à l'enzyme ODC, inhibant l'activité de celle-ci de manière non-compétitive dans un premier temps, et l'amenant dans un second temps au protéasome 26S pour une dégradation indépendante à l'ubiquitination, provoquée par un changement de conformation de l'enzyme exposant sa chaîne C-terminale au protéasome (Hayashi et al. 1996).

Le niveau de transcription du gène de la protéine OAZ n'est pas régulé par les polyamines, contrairement au niveau de sa traduction. Les concentrations plus élevées

de polyamines produisent un décalage programmé de +1 sur le cadre de lecture de l'ARN messager de la protéine OAZ par le ribosome, décodant ainsi un ARN messager de longueur totale conduisant à la production de la protéine sous une forme mature (Matsufuji et al. 1995). La protéine ornithine antizyme inhibitrice (OAZI) prévient la dégradation de l'enzyme ODC en se liant avec la protéine OAZ lorsque la croissance cellulaire est stimulée, provoquant le détachement de OAZ de ODC car la protéine OAZ possède une affinité plus grande pour la protéine OAZI que pour l'enzyme ODC (Nilsson et al. 2000). La protéine OAZ est également impliquée dans une régulation négative de l'influx des polyamines dans les cellules (Sakata et al. 2000). Il est important de noter que la protéine OAZ est présumée inexistante chez les plantes (Hanfrey et al. 2001).

1.6.2 S-adénosylméthionine décarboxylase

La SAMDC est une enzyme impliquée de près dans la régulation de la concentration cellulaire des polyamines. Le temps de demi-vie de l'enzyme est de 60 à 120 minutes (Pegg et al. 1998). L'enzyme est initialement synthétisée sous forme de proenzyme avant d'être modifiée de manière post-traductionnelle pour devenir fonctionnelle (Kashiwagi et al. 1990). Le taux de modification post-traductionnelle et l'activité enzymatique de la SAMDC sont accrus en fonction de l'augmentation de la concentration en putrescine, produisant ainsi une quantité plus élevée de SAM décarboxylée nécessaire à l'enzyme SPDS (Xiong et al. 1997). Cependant, le produit de la réaction enzymatique modifie de façon irréversible l'enzyme pour causer son inactivation (Li et al. 2001*b*).

Chez les mammifères, l'enzyme est également régulée au niveau traductionnel en fonction des concentrations cellulaires de polyamines. Le transcrit du gène contient une petite séquence codante ouverte en amont du cadre de lecture principal produisant l'hexapeptide MAGDIS. L'interaction des polyamines avec l'hexapeptide entraîne l'immobilisation du ribosome près du codon stop de la séquence codante pour ce peptide (Ruan et al. 1996). Chez les plantes, la séquence en amont du cadre de lecture principal contient deux séquences codantes relativement bien conservées entre les espèces. La

première séquence est qualifiée de minuscule et code pour 3 à 4 peptides, alors que la seconde séquence est qualifiée de petite et code pour 50 à 54 peptides. Le produit de la séquence minuscule est requis pour induire la traduction du cadre de lecture principal dans des conditions de faibles concentrations de polyamines, alors que le produit de la petite séquence est responsable de la répression de la traduction de ce même cadre lorsque les polyamines sont présentes en fortes concentrations (Hanfrey et al. 2005).

1.6.3 Spermidine/spermine N¹-acétyltransférase

La SSAT est l'enzyme limitante dans le processus de dégradation et d'interconversion des polyamines (Bettuzzi et al. 1999). Le temps de demi-vie de l'enzyme est de 20 à 40 minutes. L'augmentation des concentrations intracellulaires de spermine et de spermidine contribue à stabiliser l'enzyme produite de façon constitutive et à induire son expression (Wallace et al. 2003*b*, Seiler 2004). L'acétylation des polyamines neutralise leur charge positive à leur extrémité amino-terminale, diminuant ainsi leur caractère cationique comparativement aux polyamines libres. L'affinité des polyamines acétylées est plus faible que celle des polyamines libres pour les macromolécules biologiques, empêchant ainsi leur liaison aux divers sites intracellulaires. Les polyamines acétylées forment les substrats principaux de l'enzyme polyamine oxydase et sont les polyamines majeures sécrétées par les cellules (Wallace et Mackarel 1998). Le statut de croissance de la cellule régule la compétition entre l'oxydation et l'exportation des polyamines; la croissance cellulaire stimule le recyclage de la spermine en putrescine alors que l'inhibition de la croissance favorise l'exportation des polyamines acétylées (Coleman et Wallace 1990).

1.7 Croissance et polyamines

Les polyamines possèdent plusieurs rôles dans la régulation des processus cellulaires, tant au niveau de la croissance, de la différenciation et de la mort cellulaire, dépendamment des conditions rencontrées. Les polyamines régulent normalement leur propre biosynthèse pour éviter une accumulation excessive (Wallace et al. 2003*b*).

La croissance cellulaire est caractérisée par une régulation cyclique de la quantité des protéines cyclines et kinases cycline-dépendantes (CDKs) (Pines 1994). L'activation appropriée des CDKs et de leurs cyclines partenaires est requise pour une progression continue à travers les phases du cycle cellulaire (Endicott et al. 1999). Initialement, les CDKs sont activées par des signaux hormonaux et des facteurs de croissance pour phosphoryler un réseau de substrats dans le cycle cellulaire. Immédiatement après l'entrée en fonction de ces CDKs, les cyclines associées à ces enzymes sont rapidement dégradées pour contrôler l'activité des CDKs. L'existence d'inhibiteurs cellulaires des CDKs permet également de bloquer l'activité des complexes cyclines/CDKs pour réguler la progression dans le cycle cellulaire (Tsihlias et al. 1999, Pestell et al. 1999). Les processus de transduction des signaux cellulaires qui altèrent la synthèse, la dégradation et l'activité de ces protéines régulatrices contrôlent donc le cycle de croissance cellulaire (Thomas et Thomas 2001).

Parallèlement aux variations de concentration de ces protéines régulatrices, celles des polyamines varient également en fonction des différentes phases de croissance du cycle cellulaire (Heby 1981, Satriano et al. 2001). Les polyamines régulent potentiellement la dégradation des cyclines durant le cycle cellulaire, bien que l'interaction entre les protéines régulatrices et les polyamines n'est pas encore établie avec certitude (Thomas et Thomas 2001). Les polyamines régulent vraisemblablement plusieurs points de contrôle importants des phases de croissance du cycle cellulaire, expliquant en partie pourquoi leurs concentrations sont apparemment régulées à travers ce cycle (Ordesson 2003). L'utilisation d'une panoplie d'inhibiteurs ciblant les enzymes responsables de la biosynthèse des polyamines a permis de déterminer le rôle important de ces molécules pour la croissance cellulaire. L'inhibition de la biosynthèse des polyamines conduit à un ralentissement ou à une inhibition complète de la croissance cellulaire à diverses phases du cycle. L'ajout de polyamines exogènes permet toutefois de prévenir l'inhibition de la croissance cellulaire induite par les différents inhibiteurs enzymatiques (Thomas et Thomas 2001, Wallace et al. 2003*b*). Les concentrations des enzymes ODC, SSAT et de la protéine OAZ varient également en fonction des phases de croissance cellulaire tout comme celles des polyamines. L'augmentation de l'activité de

l'enzyme ODC et conséquemment des concentrations en polyamines est essentielle pour la répliquation de l'ADN, alors que la dégradation subséquente des polyamines par l'induction de l'enzyme SSAT est nécessaire pour la mitose cellulaire (Bettuzzi et al. 1999).

Les polyamines sont nécessaires à la croissance cellulaire pour plusieurs aspects. La réduction des concentrations intracellulaires en polyamines causée par l'inhibition des enzymes de biosynthèse des polyamines conduit à une augmentation de l'expression du gène p53 et de la stabilité de son ARN messager, provoquant une inhibition de la croissance cellulaire (Li et al. 2001*a*). La protéine p53 est reconnue comme un facteur de transcription qui est instable dans les conditions normales et qui est incapable d'atteindre une concentration intracellulaire assez élevée pour induire la transcription, puisque dégradée suite à sa polyubiquitination rapide par l'enzyme Mdm2 (Kubbutat et al. 1997). La stabilisation de p53, par phosphorylation, permet d'activer la transcription de plusieurs gènes impliqués dans l'inhibition de la croissance cellulaire dont celui de la protéine p21, laquelle se lie aux complexes cyclines/kinases cyclines-dépendantes pour inhiber leur activité. La protéine p53 est également impliquée dans l'induction de gènes impliqués dans les mécanismes d'apoptose lorsque l'ADN cellulaire est endommagé. Les rôles simultanés de la protéine p53 dans l'inhibition de la croissance cellulaire et dans l'induction de l'apoptose sont essentiels à la survie des organismes vivants, dans la mesure où les cellules cancéreuses présentent très fréquemment des mutations dans les deux allèles du gène (Burns et El-Diery 1999). Les polyamines sont également impliquées dans la formation de l'hypusine, un acide aminé particulier indispensable à la modification post-traductionnelle du facteur d'initiation eucaryote elf5, nécessaire à la formation du complexe ribosomique de traduction des ARN messagers (Park 2006).

1.8 Cancer et polyamines

Chez les animaux, les concentrations intracellulaires des polyamines sont augmentées dans les cellules cancéreuses comparativement aux cellules saines (Fair et al. 1975, Lipton et al. 1975, Kingsnorth et al. 1984*a*, Kingsnorth et al. 1984*b*, Nowels et al. 1986, Loser et al. 1990). L'accumulation des polyamines dans les cellules

cancéreuses est reliée dans la plupart des cas à une diminution de la capacité des cellules à exporter les polyamines (Wallace et al. 2003*b*). La régulation de l'enzyme ODC est également altérée dans plusieurs tumeurs, dans la mesure où l'enzyme est surexprimée. L'accroissement de l'activité enzymatique de l'ODC et des concentrations intracellulaires en polyamines est un événement qui se déroule tôt dans la carcinogenèse (Wallace et al. 2001). L'enzyme ODC est considérée comme un proto-oncogène, puisque l'enzyme est activée de façon constitutive pendant les transformations cellulaires associées aux carcinogènes, aux virus et aux oncogènes (Haddox et al. 1980, Gilmour et al. 1987, Sistonen et al. 1990). Le métabolisme des polyamines est aussi affecté par une élévation de l'activité de l'enzyme SSAT couplée à une diminution de l'activité de l'enzyme PAO dans certaines cellules cancéreuses (Wallace et al. 2000).

Les polyamines sont essentielles pour la croissance cellulaire, dans la mesure où une carence en polyamines peut mener à un arrêt prématuré dans le cycle de croissance cellulaire, à une transformation ou à une mort cellulaire. L'élévation des concentrations en polyamines dans les cellules cancéreuses a fait de la voie de biosynthèse des polyamines une cible idéale pour le développement de produits antiprolifératifs. Les enzymes de biosynthèse des polyamines possèdent quelques molécules inhibitrices synthétiques qui ciblent spécifiquement chaque enzyme, réduisant ainsi les concentrations de certaines polyamines produites et la prolifération cellulaire en général (Criss 2003, Wallace et al. 2003*b*). Cependant, la plupart de ces inhibiteurs se révèlent très toxiques pour l'humain *in vivo*, à l'exception de l'inhibiteur de l'enzyme ODC nommé α -difluorométhylornithine (DFMO) qui est considéré comme relativement non toxique (Wallace et Fraser 2003*a*). L'utilisation isolée de ces inhibiteurs comme agents thérapeutiques anticancéreux n'est pas efficace à long terme puisque les mécanismes de régulation des polyamines sont complexes; les cellules parviennent à compenser leurs carences en polyamines en modifiant leur métabolisme (Marton et Pegg 1995). Les altérations engendrées permettent de maintenir l'homéostasie cellulaire, dans la mesure où la plupart des cellules eucaryotes sont capables d'absorber des polyamines de nature exogène; le traitement des cellules cancéreuses avec le DFMO produit donc principalement un effet cyostatique et non cytotoxique (Alhonen-Hongisto et al. 1980).

La création de molécules capables de cibler plusieurs réactions enzymatiques simultanément s'est donc avérée nécessaire, puisque les inhibiteurs spécifiques des enzymes de biosynthèse sont inaptes à contrôler efficacement les niveaux intracellulaires des polyamines. Les polyamines analogues, des molécules dérivées des polyamines naturelles, ont donc été fabriquées comme substituts aux polyamines naturelles pour inhiber plusieurs réactions dans le métabolisme des polyamines (Wallace et Fraser 2003a). Les polyamines analogues sont réparties en deux catégories spécifiques, les analogues imitatrices et les analogues antimétabolites. Les polyamines analogues antimétabolites sont incorporées dans les cellules par le système de transport des polyamines, lesquelles induisent une diminution des concentrations intracellulaires des polyamines, grâce à la régulation négative des enzymes de biosynthèse ODC et SAMDC, ainsi qu'à la régulation positive de l'enzyme de dégradation SSAT et de l'exportation des polyamines; les polyamines analogues antimétabolites freinent la croissance cellulaire et provoquent la mort cellulaire (Seiler et al. 1998). Les polyamines analogues imitatrices sont également transportées à l'intérieur des cellules par le système de transport des polyamines, lesquelles déplacent les polyamines naturelles de leurs sites de liaison et provoquent l'inhibition de leurs fonctions, sans toutefois diminuer les concentrations intracellulaires des polyamines; les polyamines analogues imitatrices sont cytotoxiques (Fraser et al. 2002).

Dans tous les cas, les polyamines analogues n'induisent pas les compensations de charges observées dans le métabolisme comme dans le cas des inhibiteurs monoenzymatiques, étant donc plus efficaces pour arrêter la croissance cellulaire et provoquer l'apoptose (Porter et Bergeron 1988). Cependant, le manque de connaissances liées aux processus de transport des polyamines limite vraisemblablement la spécificité et l'efficacité des tests effectués; les polyamines analogues induisent souvent des effets différents selon le type de cellule traitée (Wallace et Fraser 2004). Les mécanismes d'action des polyamines analogues au niveau moléculaire restent encore à être élucidés (Thomas et Thomas 2003). Les résultats d'études préliminaires démontrent que l'utilisation combinée de polyamines analogues et d'inhibiteurs monoenzymatiques tel que le DMFO est positive (Hahm et al. 2001).

1.9 Stress et polyamines

Chez les plantes, les polyamines se retrouvent autant dans le cytoplasme des cellules, que dans les organelles telle que les vacuoles, les mitochondries et les chloroplastes (Kumar et al. 1997). Les polyamines possèdent plusieurs rôles clés notamment au niveau de la croissance cellulaire, de l'embryogenèse, de la morphogenèse, du développement des organes et de la sénescence des feuilles (Evans et Malmberg 1989, Galston et Kaur-Sawhney 1990, Walden et al. 1997, Bais et Ravishankar 2002). Les polyamines sont également responsables de certaines caractéristiques agro-économiques importantes tel que la qualité des fruits et le contenu en phytonutriments des plantes (Mehta et al. 2002, Matto et al. 2006). Les polyamines sont impliquées dans la réponse des plantes aux diverses conditions environnementales de stress biotiques et abiotiques (Walters 2003, Groppa et Benavides 2008).

Les conditions de stress abiotiques telles que les carences minérales, le stress osmotique créé par des périodes de sécheresse et par des accumulations de sels, la présence des métaux lourds dans les sols, l'augmentation des niveaux d'irradiation UV et l'élévation des concentrations des polluants atmosphériques tel que l'ozone contribuent à réduire annuellement la superficie des cultures végétales essentielles pour l'alimentation (Alcázar et al. 2006). Les diverses conditions de stress énumérées induisent toutes un stress de nature oxydatif et provoquent une élévation des concentrations intracellulaires des polyamines (Liu et al 2007, Groppa et Benavides 2008). Les polyamines possèdent un rôle antioxydant au sein des cellules sur plusieurs niveaux, notamment dans la réduction de la propagation des composés réactifs de l'oxygène (ROS), dans l'inhibition de la peroxydation des lipides membranaires, et dans l'inhibition des réactions oxydatives catalysées par des métaux (Kitada et al. 1979, Tadolini 1988, Bors et al. 1989). Cependant, l'excès de polyamines est à même d'induire un stress oxydatif en produisant un surplus de peroxyde d'hydrogène lors de leur catabolisme, situation particulière rencontrée dans des conditions de stress biotiques; le peroxyde d'hydrogène est normalement une molécule de signalisation impliquée dans la chaîne de transduction des signaux initiant une réponse antioxydative pour protéger les cellules des stress abiotiques (Rhee et al. 2007, Groppa et Benavides 2008).

L'ajout de polyamines exogènes aux plantes soumises à plusieurs conditions de stress abiotiques confère une tolérance accrue aux plantes face à ces mêmes conditions de stress (Borrel et al. 1996, Velikova et al. 2000, Navakoudis et al. 2003, Wang et al. 2006). La surexpression de nature transgénique des enzymes de biosynthèse des polyamines confère également une tolérance accrue aux plantes traitées (Capell et al. 1998, Kumria et Rajam 2002, Roy et Wu 2002, Kasukabe et al. 2004). L'analyse des transcriptomes de ces plantes mutantes démontre une modification de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans les mécanismes de protection contre les stress abiotiques. L'observation suggère que les polyamines jouent probablement un rôle de molécule signal dans la réponse des plantes aux stress. Cependant, la croissance et le développement de certaines de ces plantes mutantes étaient affectés (Alcázar et al. 2006). La localisation spécifique des polyamines à l'intérieur des cellules, les mécanismes de transport cellulaire, les protéines impliquées dans la distribution des polyamines, la régulation des processus cataboliques au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel et traductionnel sont toujours des points à être clarifiés pour comprendre le mode d'action des polyamines au niveau moléculaire, avant de pouvoir améliorer par la biotechnologie les capacités naturelles des cultures végétales à survivre dans les conditions de stress de plus en plus importantes (Groppa et Benavides 2008).

L'implication des polyamines dans la réponse des plantes face aux stress abiotiques est omniprésente au niveau de la photosynthèse. Les polyamines sont retrouvées en association avec les membranes de thylacoïdes, tout particulièrement au niveau des complexes des antennes photocollectrices de lumière et du PSII; la spermine est retrouvée en plus grande concentration que les polyamines putrescine et spermidine dans les différents complexes (Kotzabasis et al 1993, la Mae et al. 2004). Les polyamines régulent la structure et le fonctionnement de l'appareil photosynthétique (Beigbeder et al. 1995, Kotzabasis et al. 1999a, Kotzabasis et al. 1999b, Sfichi et al. 2004). Les stress abiotiques contribuent à modifier la structure et la fonction de l'appareil photosynthétique de façon semblable aux mécanismes de photoadaptation (Walters 2005); l'ajout de polyamines exogènes contribue à renverser les dommages subis par l'appareil photosynthétique (Navakoudis et al. 2007).

Les polyamines sont réputées pour stabiliser les structures protéiques et participer à la formation des complexes importants tel que les antennes photocollectrices de lumière; l'incorporation des polyamines dans la membrane thylakoïde est catalysée par une enzyme glutaminase plastidique (Besford et al. 1993, Del Duca et al. 1994). Les concentrations intracellulaires de polyamines sont régulées lors de la synthèse de l'appareil photosynthétique; la biosynthèse des polyamines est contrôlée par la lumière lors du photodéveloppement des chloroplastes (Kramer et al. 1992, Dörnemann et al. 1996, Andreadakis et Kotzabasis 1996). Les polyamines peuvent induire une photoadaptation de l'appareil photosynthétique similaire à des conditions de faible ou de forte luminosité, et ce, indépendamment des véritables conditions environnementales de lumière; la régulation du ratio spermine/putrescine permet aux plantes de tolérer diverses conditions de stress abiotiques, tout particulièrement en modifiant la structure des antennes photocollectrices de lumière (Sfakianaki et al. 2006, Navakoudis et al. 2007). Les polyamines sont intrinsèquement impliquées dans la bioénergétique de la photosynthèse, dans la mesure où la putrescine stimule la synthèse de l'ATP alors que la spermidine et la spermine activent la photoprotection (Ioannidis et Kotzabasis 2007).

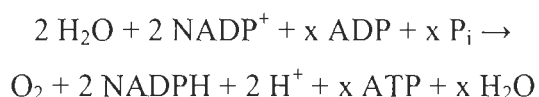
1.10 Photosynthèse

La photosynthèse est le phénomène qui fournit la base énergétique de presque tous les processus biologiques du monde vivant grâce à l'énergie solaire. Les végétaux, les algues ainsi que certaines bactéries et cyanobactéries sont les organismes vivants capables de photosynthèse (Balows et al. 1992, Bryant 1994, Van den Hoek et al. 1996, Taiz et Zeiger 1998). L'énergie lumineuse est transformée en énergie chimique via la biosynthèse de molécules biologiques qui forment la base de la chaîne alimentaire. Les organismes photosynthétiques sont responsables de l'incorporation de l'azote et du soufre dans les molécules organiques, mais c'est évidemment la formation des molécules d'hexoses à partir des molécules inorganiques de dioxyde de carbone (CO₂) et d'eau (H₂O) qui fait de la photosynthèse un processus unique selon la réaction suivante (Bamford et al. 2002, Blankenship 2002, Foyer et Noctor 2002) :

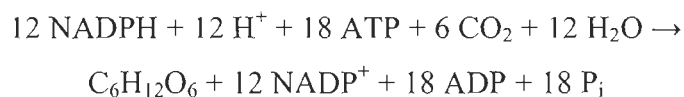


1.10.1 Phases énergétiques

La photosynthèse est un processus qui se déroule en deux grandes phases : la phase lumineuse et la phase obscure. Initialement, ce n'est que lors de la phase dite lumineuse que l'énergie solaire est absorbée au niveau des membranes des thylacoïdes au sein des chloroplastes pour subir une transduction en énergie chimique. L'eau est le substrat primaire qui, via les photosystèmes, sert de donneur d'électrons pour la synthèse des molécules de NADPH et d'ATP, au niveau du complexe FNR et de l'ATP synthase. Le mécanisme global est nommé photophosphorylation :



Dans un second temps, l'énergie chimique produite par photophosphorylation lors de la phase lumineuse est utilisée pour la synthèse des hexoses dans le stroma des chloroplastes pendant la phase dite obscure. La synthèse est catalysée lors du cycle de Calvin par la protéine rubisco qui fixe le dioxyde de carbone atmosphérique nécessaire à la formation des hexoses. Le dioxyde de carbone et l'eau forment la paire primaire de substrats de la réaction de biosynthèse des hexoses (Garret et Grisham 2000) :



1.10.2 Membranes photosynthétiques

La photosynthèse est un processus d'origine membranaire pour tous les organismes photosynthétiques sans exception. Chez les procaryotes phototrophes, ces membranes remplissent l'intérieur de la cellule, tandis que chez les eucaryotes phototrophes, les membranes photosynthétiques sont localisées au niveau des chloroplastes, un organe particulier des végétaux. Le chloroplaste contient le pigment coloré nommé chlorophylle, la molécule essentielle au niveau de la photosynthèse. La forme générale des chloroplastes varie sensiblement d'un organisme à un autre, mais sa composition reste pratiquement identique. Le chloroplaste est composé de trois

membranes distinctes : une membrane externe liée à une membrane interne formant l'enveloppe de l'organite, avec un système membranaire continu interne dans la lumière de l'organite appelé membrane thylacoïde (voir figure 1.4).

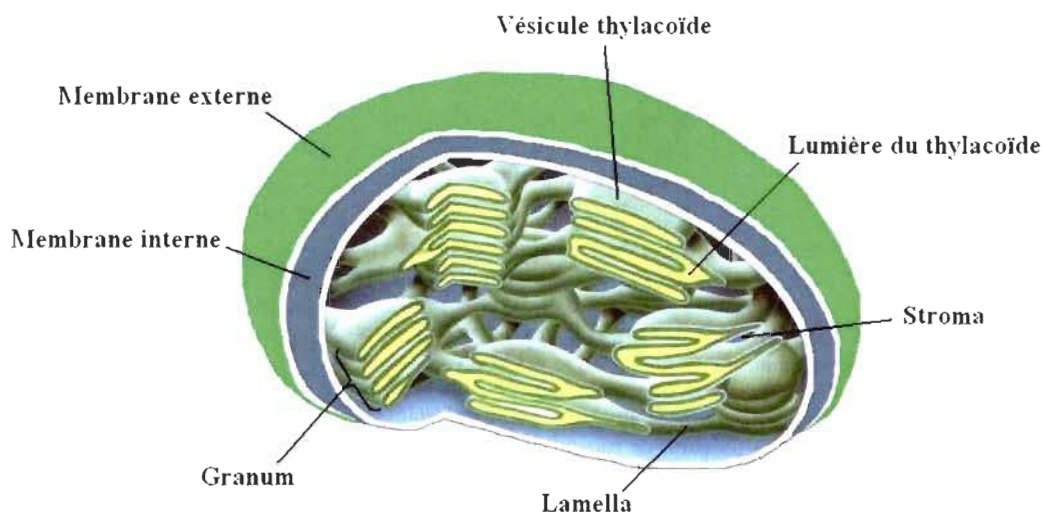


Figure 1.4: Structure des chloroplastes. Adapté de Garret et Grisham (2000).

La membrane thylacoïde est repliée sur elle-même le long de son axe pour donner une structure en paire de feuillets appelé lamellae. L'empilement de ces paires de feuillets forme des structures plissées appelées vésicules thylacoïdes, lesquelles vésicules s'empilent de nouveau pour former des structures compactes appelées granas. Les granas sont reliées par les lamelles en un système membranaire continu dans la phase aqueuse interne du chloroplaste dénommée stroma, où se situent les enzymes impliquées dans la phase obscure de la photosynthèse. Le milieu aqueux compris à l'intérieur des repliements et empilements membranaires est dénommé lumen. Les complexes protéiques responsables des processus photosynthétiques attribués à la phase lumineuse ne se situent pas dans le lumen, mais bien dans la membrane de thylacoïde imperméable à la plupart des molécules organiques et inorganiques (Campbell 1995).

1.10.3 Appareillage photosynthétique

La membrane thylacoïde est composée d'une double couche lipidique contenant une multitude de protéines et de molécules pigmentaires. Il existe deux importants systèmes dits complexes photocollecteurs au sein de la membrane thylacoïde : le

photosystème I (PSI) et le photosystème II (PSII). L'activité photosynthétique est initiée au niveau du PSII et non du PSI; la nuance provient du fait que le PSI a été découvert et caractérisé avant le PSII. Le rôle du PSII est d'arracher les électrons des molécules d'eau en les scindant grâce à l'énergie solaire, pour permettre au PSI de fournir un pouvoir réducteur sous forme de NADPH nécessaire à la synthèse cellulaire d'énergie chimique sous forme d'ATP (voir figure 1.5); l'oxygène dégagé lors de la réaction photochimique n'est qu'un sous-produit de la photolyse de l'eau.

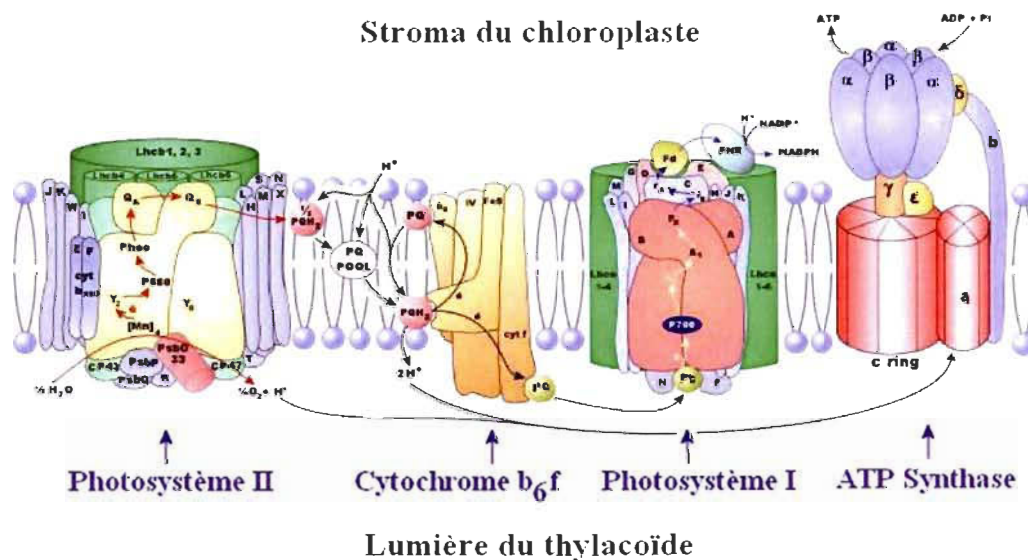


Figure 1.5: Représentation schématique de la structure de la membrane thylacoïde. Adapté de Joly (2007).

Les électrons en provenance du PSII sont acheminés indirectement vers le PSI grâce à des molécules hydrophobes transporteuses d'électrons au sein de la membrane thylacoïde nommées plastoquinones (PQ). Le pool de PQ amène les électrons à un complexe protéique transitoire appelé cytochrome b_6f ou plastiquinol plastocyanine oxydoréductase. Les électrons sont finalement acheminés du cytochrome b_6f vers le PSI par une autre navette membranaire appelée plastocyanine (PC). Les électrons transitant par le PSI sont transférés sur la ferredoxine, une protéine soluble située dans le stroma du chloroplaste, laquelle transporte les électrons vers l'enzyme ferredoxine-NADP⁺-réductase (FNR) liée à la surface externe des lamellae de la membrane thylacoïde. La FNR catalyse la réaction de synthèse du NADPH, une molécule énergétique avec un

pouvoir réducteur importante dans les processus de fixation du gaz carbonique par la plante. La synthèse de l'ATP par l'ATP synthase est possible grâce au gradient de proton produit à partir de la photolyse de l'eau lors du transport des électrons au sein de la membrane thylacoïde (Lodish et al. 2004).

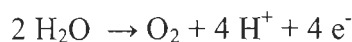
1.10.4 Pigments photocollecteurs

La photosynthèse est un processus qui dépend de la réactivité des molécules photocollectrices associées aux photosystèmes dans les membranes des chloroplastes. Les complexes protéiques responsables de capter la lumière incidente et de transférer cette énergie par résonance vers les centres photoréactifs sont les antennes collectrices de lumière (LHC; light harvesting complex). Les principaux pigments responsables de la captation de la lumière par les antennes sont les chlorophylles (Chl) *a* et *b*, et les caroténoïdes dans une moindre mesure. L'énergie lumineuse captée est ensuite transformée en énergie chimique nécessaire pour initier le transport des électrons au sein des photosystèmes (Green et Parson 2003).

Les LHC se distinguent en deux types, les LHCI et les LHCII. Les LHCII forment les antennes les plus abondantes à travers les photosystèmes, lesquelles se retrouvent principalement en périphérie du PSII. Les LHCII sont des complexes protéines-pigments sous forme trimérique, dans lequel chaque protéine monomérique Lhcb lie environ de 13 à 15 Chl *a* et *b* au total, et de 3 à 4 caroténoïdes (Liu et al. 2004). Contrairement aux LHCII, les LHCI sont des antennes uniques aux PSI. Les LHCI sont des complexes protéines-pigments sous forme dimérique, dans lequel chaque protéine monomérique Lhca lie 13 molécules de Chl *a* et *b* au total (Ben-Shem et al. 2003).

1.10.5 Photosystème II

Le PSII est composé de trois grands domaines protéiques comprenant plus d'une vingtaine de sous-unités protéiques (voir figure 1.6): l'antenne, le centre réactionnel et le complexe d'oxydation de l'eau (COE). Le PSII catalyse la réaction suivante :



L'antenne du PSII est composée de deux parties distinctes, la partie distale et la partie proximale. La partie distale est composée de plusieurs LHCII responsables de l'absorption d'une large portion du spectre électromagnétique situé dans la zone du rayonnement visible et uv. Les complexes LHCII des protéines Lhcb 1, 2 et 3 forment les complexes majeurs de l'antenne distale et servent à capter la lumière incidente. La radiation absorbée est transférée vers les complexes protéiques CP47 et CP43 de l'antenne proximale. Les complexes LHCII des protéines Lhcb 4, 5 et 6 forment les complexes mineurs de l'antenne distale, lesquels servent à l'assemblage du PSII en un supercomplexe et à maintenir l'organisation de ce supercomplexe dans la membrane de thylacoïde; les protéines Lhcb 4, 5 et 6 forment les complexes monomériques mineurs CP29, CP26 et CP24 respectivement, contrairement aux complexes trimériques majeurs des protéines Lhcb 1, 2 et 3 (Yakushevskaya et al. 2003).

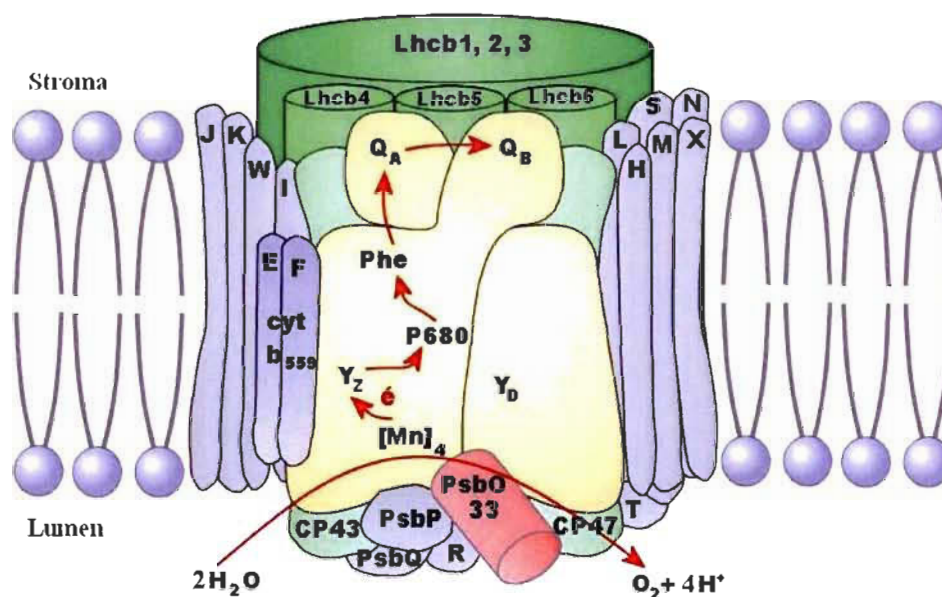


Figure 1.6: Représentation schématique de la structure du photosystème II. Adapté de Joly (2007).

Les protéines transmembranaires CP47 et CP43 composent l'antenne proximale, lesquelles sont liées au centre réactionnel du PSII situé à l'intérieur de la membrane thylacoïde; les protéines CP47 et CP43 sont complexées, au niveau de la surface donnant sur le stroma, avec des Chl a et des β -carotènes, dans une proportion semblable à ceux des LHCII. L'antenne proximale est nécessaire pour faciliter le transfert de

l'excitation entre l'antenne distale et le centre réactionnel du PSII, de par sa nature transmembranaire et étroitement reliée avec le PSII. L'énergie lumineuse absorbée par l'antenne est transférée entre les structures de résonance des différents pigments jusqu'à l'atteinte du centre réactionnel du PSII (le dimère de chlorophylle P680) par le phénomène de transduction d'énergie, lors duquel l'énergie lumineuse est à la base du mouvement d'électron excité entre les molécules (Minagawa et Takahashi 2004).

Le centre réactionnel du PSII est un imposant complexe protéique transmembranaire au niveau de la membrane thylacoïde, comprenant 17 protéines transmembranaires, 3 protéines extrinsèques et près de 80 cofacteurs, incluant des Chl, des caroténoïdes, des PQ, des atomes de fer et de manganèse (Kamiya et Shen 2003, Ferreira et al. 2004, Loll et al. 2005). Le centre réactionnel du PSII est principalement composé d'un hétérodimère protéique constitué des protéines D1 (PsbA) et D2 (PsbD), chacune des protéines contenant une molécule de phéophytine (Phéo1 et Phéo2 respectivement). La molécule ultime du centre réactionnel du PSII est un homodimère de chlorophylle a nommée P680 situé à l'interface des protéines D1 et D2. P680 est le site donneur initial d'électron au niveau du PSII suite à la transduction d'énergie émergeant de l'antenne. Les cofacteurs tel que les Chl, caroténoïdes, PQ et atomes de fer ont des rôles intermédiaires dans la transduction de l'énergie et le transport des électrons, alors que le cytochrome b559 est considéré avoir un rôle de photoprotection au sein du photosystème; le complexe de 4 atomes de manganèse, situé à la périphérie du côté lumen de la membrane, détient le rôle de stabiliser les états d'oxydation de l'eau dans le but de fournir des électrons au système photosynthétique. Les autres protéines transmembranaires secondaires possèdent potentiellement divers rôles accessoires au bon fonctionnement du PSII qui restent à être déterminés (Barber 2006).

Le COE est l'arrangement des 3 protéines extrinsèques du PSII situé du côté du lumen du PSII près de D1, lequel inclue également le complexe de quatre atomes de manganèse ainsi qu'un atome de calcium et un atome de chlore (Roose et al. 2007, Suorsa et Aro 2007). La protéine PsbO (33kDa) est la plus importante du COE, servant au maintien structurel du complexe tout en participant à la régulation des atomes de

calcium et de chlore nécessaires au dégagement d'oxygène; la protéine PsbO limite l'accès des molécules d'eau au niveau du complexe de manganèse (Gregor et al. 2005). Chez *Arabidopsis thaliana*, la protéine PsbO est encodée par deux gènes, PsbO-1 et PsbO-2. L'isoforme PsbO-1 est exprimé majoritairement et possède la fonction décrite précédemment, alors que l'isoforme minoritaire PsbO-2 est également impliqué dans le processus de dégradation du PSII dépendant de la lumière; PsbO-2 est une GTPase qui déphosphoryle la protéine D1 du PSII, rendant D1 plus accessible aux phosphatases et aux protéases pour sa dégradation (Lundin et al. 2007a, Lundin et al. 2007b).

La protéine PsbP (23kDa) permet également de maintenir la structure du COE en séquestrant les atomes de calcium et de chlore nécessaires au dégagement d'oxygène, tout en protégeant le complexe de manganèse des agents réducteurs exogènes (Roose et al. 2007); la protéine PsbP participe à l'assemblage du complexe de manganèse lors de la photoactivation suivant le recyclage du PSII (Bondarava et al. 2005). La protéine PsbQ (16kDa) permet de stabiliser le COE en absence de chlore et de calcium (Summerfield et al. 2005). Les protéines PsbP et PsbQ participent également à la régulation de l'empilement des granas dépendamment des conditions de lumière (Suorsa et Aro 2007). Le chlore et le calcium sont des ions importants dans le COE, puisqu'ils stabilisent les produits intermédiaires de la réaction d'oxydation de l'eau. L'arrangement spatial du complexe de manganèse n'est pas connu avec certitude, plusieurs modèles étant encore envisagés (Sauer et Yachandra 2004, Renger 2007).

1.10.6 Transport des électrons

Dans le PSII, l'énergie lumineuse captée par l'antenne est transférée au donneur primaire d'électrons qu'est la paire de chlorophylle spéciale appelée P680, à cause de son pic d'absorption à 680 nm, située dans le centre réactionnel du PSII. L'énergie absorbée permet à un électron de quitter P680, lequel transite par une molécule de phéophytine pour aller réduire une molécule de PQ fixe particulière située sur un site de liaison sur D1 appelée Q_A ; le transfert d'électrons amène P680 dans un état oxydé $P680^+$. L'électron sur Q_A est ultérieurement transféré sur une PQ mobile située dans un site de liaison sur D2 appelée Q_B , laquelle provient du pool de PQ situé à l'intérieur de

la membrane thylacoïde entre le PSII et le cytochrome b_6f . La PQ au site Q_B accepte successivement deux électrons en provenance du site Q_A pour être réduite sous forme de PQ^{2-} , avant de réagir dans un second temps avec deux protons H^+ en provenance du stroma pour être transformée sous forme de plastoquinol (PQH_2), lesquelles étapes sont nécessaires pour permettre le départ de PQH_2 du site Q_B vers le cytochrome b_6f .

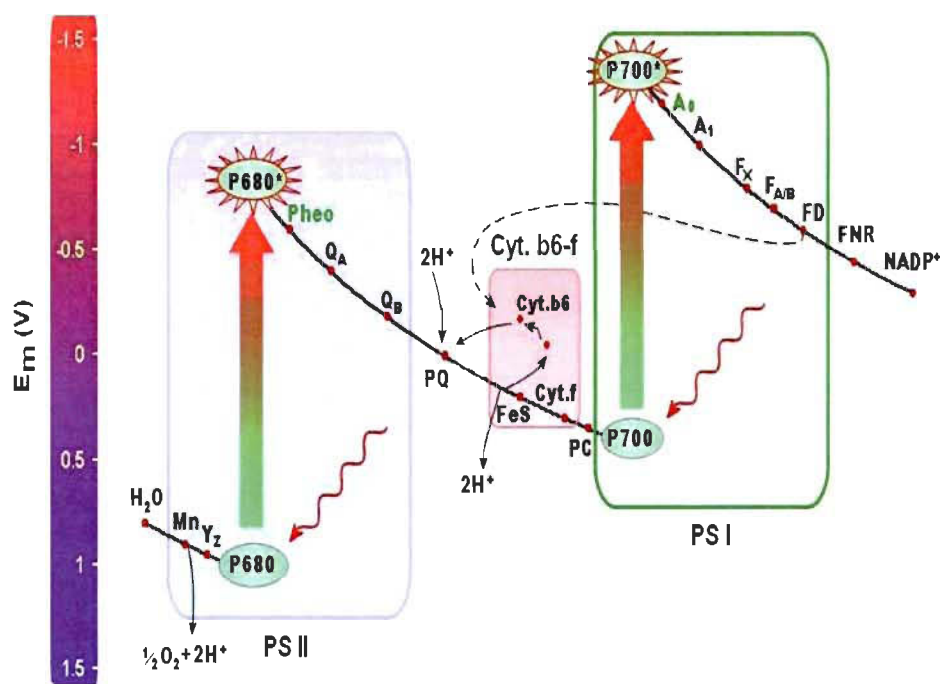
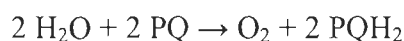


Figure 1.7: Schéma en Z du transport des électrons dans la membrane de thylacoïde. Adapté de Joly (2007).

Parallèlement à ceci, la paire de chlorophylle spéciale oxydée $P680^+$, de par son potentiel redox très élevé, arrache un électron à la tyrosine Z de D1 (résidu 161) pour retrouver sa forme réduite; la tyrosine Z extrait ensuite un électron du complexe de manganèse du COE pour recouvrer également son état réduit, lequel complexe arrache ultimement des électrons aux molécules d'eau en relâchant des protons et du dioxygène. Globalement, entre le COE et le cytochrome b_6f (voir figure 1.7), le transport d'électrons via la photooxydation de l'eau se fait selon la réaction suivante grâce à l'énergie radiative absorbée au niveau de l'antenne du PSII (Nelson et Ben-Shem 2004) :



1.10.7 Cytochrome b_6f

Le cytochrome b_6f est un complexe protéique dimérique transmembranaire de près de 220 kDa situé entre le PSII et le PSI dans la membrane de thylacoïde, dont chaque monomère contient de 8 à 9 sous-unités protéiques. Un monomère du cytochrome b_6f est composé de quatre protéines principales, le cytochrome b_6 , le cytochrome f , la protéine FeS Rieske, la protéine sous-unité IV, et de quatre protéines secondaires nommées PetG, PetL, PetM et PetN; le complexe dimérique du cytochrome b_6f lie également une FNR. Le rôle principal du cytochrome b_6f est de servir d'intermédiaire dans les réactions d'oxydoréduction au niveau du transport des électrons entre le PSII et le PSI. Les électrons acheminés par les PQH₂ en provenant du PSII sont transférés sur des molécules de plastocyanine (PC) avant d'être acheminés vers le PSI. L'échange des électrons entre les PQH₂ et les PC au niveau du cytochrome b_6f amène une translocation de protons du stroma vers le lumen à travers la membrane de thylacoïde; la translocation de protons crée un gradient chimiosmotique indispensable pour fournir l'énergie nécessaire à l'ATP synthase pour la synthèse ultérieure d'ATP (Dekker et Boekema 2005). Le cytochrome b_6f est également connu pour participer à un transfert cyclique d'électrons autour du PSI, dans une voie alternative distincte du transport linéaire d'électrons du PSII au PSI; le transfert cyclique d'électrons permet d'atteindre un ratio ATP/NADPH optimal pour les réactions de fixation du carbone. (Bukhov et Carpentier 2004).

1.10.8 Photosystème I

Le PSI est un complexe protéique transmembranaire comprenant un centre réactionnel de 12 sous-unités protéiques entouré d'une antenne composée de deux dimères LHCI (voir figure 1.8); le PSI comprend plus de 170 cofacteurs, principalement des molécules de Chl. Le centre réactionnel du PSI ressemble à celui du PSII, puisque c'est un hétérodimère protéique transmembranaire composé des protéines PsaA et PsaB contenant une paire de Chl a spéciale appelée P700, à cause de son pic d'absorption à 700 nm, qui sert de cœur du centre réactionnel (Ben-Shem et al. 2003).

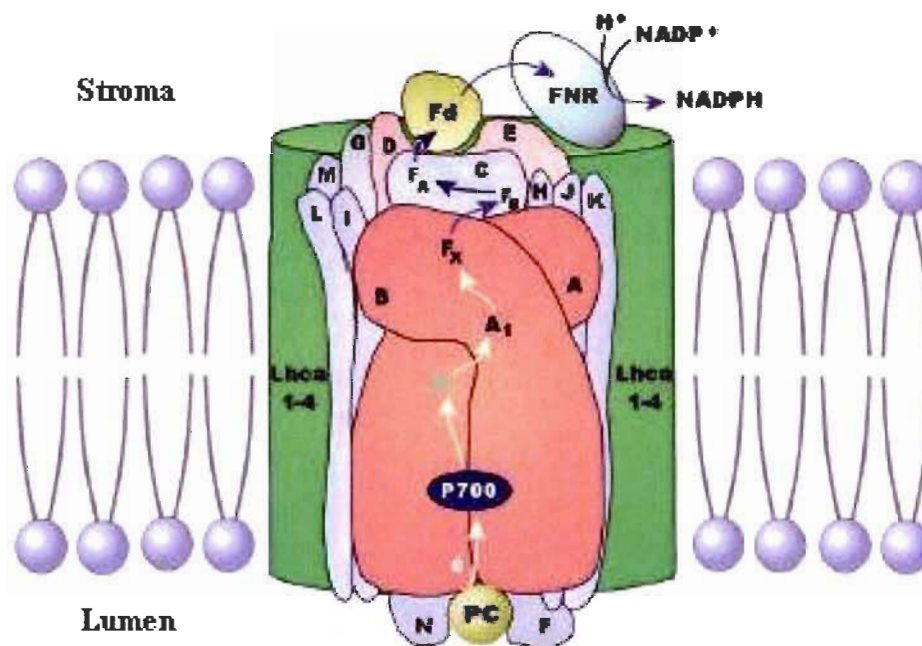


Figure 1.8: Représentation schématique de la structure du photosystème I. Adapté de Joly (2007).

L'énergie lumineuse captée par l'antenne du PSI est acheminée au donneur primaire d'électron P700, lequel transfère un électron via la Chl A sur l'accepteur primaire du PSI qui est une autre Chl appelée A₀; l'électron sur A₀ transite ensuite vers une molécule de phylloquinone nommée A₁, avant d'être transféré sur une série de trois complexes fer-soufre (FeS), F_x, F_A et F_B respectivement. L'électron présent sur le complexe F_B, situé à l'interface de la membrane thylacoïde du côté stroma, réduit le transporteur protéique soluble appelé ferrédoxine. L'électron présent sur la ferrédoxine est acheminé jusqu'à l'enzyme FNR qui transforme le NADP⁺ en NADPH₂. Le NADPH₂ est une forme d'énergie essentielle à la plante pour la fixation du gaz carbonique de l'air lors de la synthèse ultérieure des hexoses. Parallèlement à ceci, la forme oxydée de P700 retourne à sa forme réduite grâce à un électron en provenance d'une PC. Fait intéressant, la symétrie structurale entre les protéines PsaA et PsaB conduit à une symétrie des cofacteurs redox du transport des électrons, de telle sorte que deux branches de transfert des électrons sont possibles dans le PSI (Fromme et al. 2006).

1.11 Problématique et objectifs du projet

Bien que les polyamines soient reconnues pour être indispensables à la croissance et la différenciation cellulaire chez les eucaryotes, plusieurs de leurs mécanismes moléculaires sont toujours inconnus, tout particulièrement au niveau des mécanismes de transport intracellulaire ainsi que de la régulation des processus cataboliques au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel et traductionnel (Wallace et Fraser 2004, Grappa et Benavides 2008).

L'observation que les concentrations intracellulaires des polyamines sont augmentées dans les cellules cancéreuses des animaux, comparativement aux cellules saines, provoque un intérêt grandissant à l'égard des polyamines dans le combat contre le cancer; la diminution de la capacité des cellules à exporter les polyamines, couplée à la surexpression de plusieurs enzymes de biosynthèse des polyamines, a mené au développement de produits pharmaceutiques prometteurs capables de réguler négativement les niveaux intracellulaires des polyamines naturelles *in vitro*: les polyamines analogues. Néanmoins, le manque de connaissance sur les processus de transport intracellulaire et sur les mécanismes d'actions au niveau moléculaire limite l'efficacité des tests effectués; les polyamines analogues actuels induisent souvent des effets différents dépendamment des cellules traitées (Thomas et Thomas 2003, Wallace et Fraser 2003a, Wallace et al. 2003b, Wallace et Fraser 2004).

Les concentrations intracellulaires des polyamines sont également augmentées dans les cellules des plantes soumises à des conditions de stress abiotiques, lesquelles conditions mènent fréquemment à un stress de nature oxydatif; les polyamines possèdent un rôle antioxydant empêchant la propagation des ROS et la peroxydation des lipides membranaires. Cependant, l'excès de polyamines est à même d'induire un stress oxydatif en produisant un surplus de peroxyde d'hydrogène lors de leur catabolisme (Alcázar et al. 2006, Liu et al 2007, Rhee et al. 2007, Groppa et Benavides 2008). L'implication des polyamines dans la réponse des plantes face aux stress abiotiques est omniprésente au niveau de la photosynthèse. Les stress abiotiques contribuent à modifier la structure et la fonction de l'appareil photosynthétique, alors que les polyamines sont

réputées pour stabiliser les structures protéiques et participer au développement des chloroplastes, l'organe contenant les membranes photosynthétiques. Les polyamines sont intrinsèquement impliquées dans la bioénergétique de la photosynthèse, dans la mesure où la putrescine stimule la synthèse de l'ATP alors que la spermidine et la spermine activent la photoprotection (Sfichi et al. 2004, Walters 2005, Ioannidis et Kotzabasis 2007, Navakoudis et al. 2007). Néanmoins, même si les polyamines sont naturellement bénéfiques pour les plantes et les chloroplastes, l'interaction directe des polyamines spermidine et spermine avec des fractions membranaires isolées de PSII conduit à une forte inhibition du dégagement d'oxygène. Le mécanisme d'action de cette inhibition n'a toutefois pas été décrit (Bograh et al. 1997).

La présente étude a deux buts principaux, soit i) de caractériser les interactions entre des polyamines analogues possédant une activité antitumorale *in vitro* avec HSA, la principale protéine de transport dans le plasma sanguin chez l'humain, et ii) de déterminer le mécanisme d'action au niveau moléculaire de l'inhibition du dégagement d'oxygène du PSII causé par l'interaction des polyamines naturelles avec les protéines du photosystème.

Les objectifs spécifiques consistent, dans un premier temps, à caractériser les interactions entre les polyamines analogues et la protéine HSA par spectroscopie UV-visible, CD et FTIR, afin d'examiner les effets de la complexation des analogues sur la structure de la protéine de transport, pour ensuite comparer les résultats obtenus avec ceux déjà publiés de la complexation des polyamines naturelles avec HSA (Ahmed Ouameur et al. 2004). Dans un second temps, l'inhibition du dégagement d'oxygène du PSII causé par les polyamines naturelles est étudié par spectroscopie FTIR et par dégagement d'oxygène standard, mais également par induction de fluorescence, par thermoluminescence, par cinétique de déclin de fluorescence induite par flash, par électrophorèse, par détermination du manganèse et par dégagement d'oxygène après flash, afin de déterminer le mécanisme d'action au niveau moléculaire de cette inhibition de l'activité du PSII.

CHAPITRE II

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

2.1 Matériel utilisé

La fraction V de l'albumine humaine a été obtenue commercialement (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada, produit A3782) et utilisée sans purification supplémentaire. Les polyamines analogues 333, BE-333 et BE-3333 ont été synthétisées dans le laboratoire du docteur Akira Shirahata (Josai University, Saitama, Japan) et utilisées sans purification supplémentaire.

Les polyamines naturelles tel que les diamines diaminopropane, putrescine et cadaverine ont été obtenues commercialement (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) et utilisées sans purification supplémentaire, tout comme la spermidine et la spermine.

Les feuilles d'épinards ont été achetées commercialement dans un marché local (Trois-Rivières, Québec, Canada) et utilisées immédiatement pour l'isolation des fractions membranaires photosynthétiques.

2.2 Préparation des solutions stocks

La protéine HSA a été dissoute dans une solution aqueuse (40 mg/mL ou 0,5 mM) contenant un tampon Tris-HCl de 10 mM à pH 7.2. La concentration protéique a été déterminée spectrophotométriquement en utilisant le coefficient d'extinction molaire (ϵ) de $36\,500\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ à 280 nm selon Painter et al. (1998). La protéine HSA a été utilisée sans enlever ses molécules d'acides gras, ce qui représente une situation plus proche de la réalité *in vivo*; 0,1 à 2 acides gras sont liés à l'albumine dans des conditions physiologiques normales selon Carter et Ho (1994) et Curry et al. (1999).

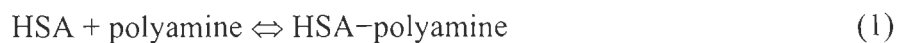
Les solutions de polyamines analogues (1 μM à 2 mM) et de polyamines naturelles (20 μM à 40 mM) ont été préparées dans l'eau distillée.

2.3 Isolation des fractions membranaires enrichies en PSII

Les fractions membranaires des PSII ont été isolées à partir de feuilles d'épinards (*Spinacea oleracea* L.) selon la méthode de Berthold et al. (1981) avec les modifications de Rashid et al. (1991). Les feuilles fraîches ont été homogénéisées dans un tampon contenant 50 mM Tricine-NaOH (pH 7.6), 0,4 M sorbitol, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 6 mM ascorbate et 1 mM fluorure de phénylmétanesulfonyle (PMSF). L'homogénat a été filtré à l'aide de 12 couches de gaze, alors que le filtrat a été centrifugé pendant 5 minutes à 2000g. Le culot a été suspendu dans le même tampon mais sans sorbitol et PMSF pour être centrifugé sous les mêmes conditions. Le culot résultant a été suspendu dans un tampon contenant 20 mM Mes-NaOH (pH 6.5), 1,5 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ et 4% Triton X-100 avec une concentration de Chl de 1 mg/mL; la concentration en Chl a été déterminée selon Porra et al. (1989). Suite à une incubation sous agitation constante de 20 minutes à la noirceur à 4°C, la mixture a été centrifugée pendant 10 minutes à 3600g. Les fractions membranaires de PSII ont été recueillies du surnageant en centrifugeant pendant 30 minutes à 3600g; la préparation de PSII a été suspendue dans un tampon comprenant 20 mM Mes-NaOH (pH 6.5), 1,5 mM NaCl et 10 mM MgCl₂, à une concentration de Chl 2 mg/mL.

2.4 Spectroscopie d'absorption UV-visible pour HSA

Les spectres d'absorption UV-visible ont été mesurés avec un spectrophotomètre Perkin Elmer Lambda 40 (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) en utilisant une cuvette en quartz avec un parcours optique de 1 cm; les spectres ont été mesurés pour la protéine HSA libre (12,5 µM) et pour chacun des complexes formés avec une polyamine analogue (1 µM à 1 mM). Pour calculer la constante de liaison K protéine-polyamine, les données ont été traitées avec l'équation suivante:



$$K = [\text{HSA-polyamine}] / [\text{HSA libre}] \cdot [\text{polyamine libre}] \quad (2)$$

Les valeurs des constantes de liaison K ont été obtenues à partir de l'absorbance de HSA à 280 nm selon les méthodes publiées par Stephanos (1996a) et Stephanos et al.

(1996*b*), où divers ligands se liant à l'hémoglobine ont été décrits. Pour des liaisons à faible affinité, les résultats ont été traités avec un tracé réciproque linéaire basé sur l'équation suivante :

$$\frac{1}{A - A_0} = \frac{1}{A_{\infty} - A_0} + \frac{1}{K(A_{\infty} - A_0)} \cdot \frac{1}{C_{\text{ligand}}} \quad (3)$$

où A_0 est l'absorbance de la protéine à 280 nm en absence de ligand, A_{∞} est l'absorbance finale du complexe protéine-ligand, alors que A est l'absorbance mesurée de la protéine à différentes concentrations de ligand. Le tracé de la double réciproque de $1/(A-A_0)$ vs $1/C_{\text{ligand}}$ est linéaire et la constante de liaison K peut être estimée par le ratio de l'ordonnée à l'origine à la pente selon Stephanos (1996*a*) et Stephanos et al. (1996*b*).

2.5 Spectroscopie de dichroïsme circulaire pour HSA

Les spectres de CD ont été mesurés avec un spectropolarimètre Jasco J-720 (Jasco, Easton, Maryland, USA) en utilisant une cuvette en quartz avec un parcours optique de 0,01 cm; les spectres ont été mesurés pour la protéine HSA libre (12,5 μM) et pour chacun des complexes formés avec une polyamine analogue (0,25, 0,5 et 1mM) dans une atmosphère d'azote. Les spectres comptent 5 balayages accumulés avec une vitesse de 50 nm par minute recueillant des données à tous les nm de 178 à 260 nm; le débit d'azote utilisé a été de 8L/min et la température des échantillons a été gardée à 25°C grâce à un bain thermostaté Neslab RTE-111 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) connecté à la cuvette en quartz. Noter que le signal enregistré dans ces conditions expérimentales n'est excellent qu'à partir de 190 nm. Les spectres de CD ont été corrigés avec le signal du tampon, tandis que leur conversion en unité Mol CD ($\Delta\epsilon$) a été effectuée avec le programme Jasco Standard Analysis (Jasco, Easton, Maryland, USA).

2.5.1 Analyse de la structure secondaire par CD pour HSA

La structure secondaire de la protéine HSA a été calculée en utilisant des prédictions de différentes portions de structure secondaire, soit en comparant plusieurs gammes de protéines possédant toutes des données de diffraction de rayons X de haute

qualité selon Johnson (1999) et Sreerama et Woody (2000), grâce au programme CDSSTR fourni dans le logiciel CDPro disponible sur le site internet <http://lamar.colostate.edu/~sreeram/CDPro>. La gamme protéique SP29 a été utilisée pour déterminer la structure secondaire de la protéine, puisque HSA est une protéine soluble (SP signifiant « soluble protein ») et que les données CD utilisées couvrent de 180 à 260 nm (SP29 possédant des valeurs pour chaque nm de 178 à 260 nm). Noter que l'efficacité des analyses statistiques effectuées par CDSSTR est évaluée par une mesure déterminée par le programme appelée NRMSD « normalized root mean square deviation » (un écart type normalisé), laquelle compare le spectre CD calculé avec le spectre CD expérimental; la moyenne des valeurs obtenues de NRMS pour les présents travaux est de 0,045 (soit 4,5%).

2.6 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier pour HSA

Les spectres de FTIR ont été mesurés avec un spectrophotomètre Nicolet Impact 420 FTIR (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) équipé d'un détecteur de type DTGS (deuterated triglycine sulfate) et d'un séparateur de faisceau de KBr utilisant des fenêtres de AgBr. Les spectres comptent 100 balayages acquis avec une résolution de 4 cm^{-1} recueillant des données entre $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$; les spectres ont été mesurés pour la protéine HSA libre (0,25 mM) et pour chacun des complexes formés avec une polyamine analogue (0,125, 0,25, 0,5 et 1 mM). Les spectres ont été acquis à partir de films hydratés uniformes, créés par une incubation de deux heures à la température pièce de 100 μl des solutions des échantillons sur des fenêtres de AgBr; la solution de polyamine a été initialement ajoutée goutte-à-goutte à la solution de HSA en agitant constamment pour assurer la formation d'un mélange homogène.

Les spectres de différence [(HSA + polyamine) – (HSA)] ont été générés en utilisant les bandes d'étirement C-H symétriques et asymétriques des polypeptides localisées entre $2900\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$; ces bandes ne subissent pas de décalage ou de variation d'intensité lors de la formation d'un complexe et sont donc généralement utilisées comme standard interne selon Krimm et Bandekar (1986). En produisant les spectres de différence, les bandes d'étirement C-H sont ajustées au niveau de la ligne de base pour

normaliser les spectres de différence tel que décrit par Ahmed Ouameur et al. (2004). La précision de cette méthode de soustraction a été testée en utilisant plusieurs échantillons contrôles possédant les mêmes concentrations de HSA et de polyamine, lesquels ont démontré la formation d'une ligne de base semblable. Une échelle d'absorption similaire a été utilisée pour les spectres de HSA libre, de HSA complexé avec des polyamines et pour les spectres de différences produits ici; cette méthode permet d'obtenir des différences spectrales significatives entre HSA libre et ses complexes de polyamine pour différentes concentrations en polyamine, ces différences spectrales étant alors employées pour caractériser la nature de l'interaction HSA-polyamine.

2.6.1 Analyse de la structure secondaire par FTIR pour HSA

L'analyse de la structure secondaire de HSA et de ses complexes avec les polyamines analogues a été effectuée sur la base de la procédure publiée par Byler et Susi (1986). La structure secondaire de HSA est déterminée selon la forme de la bande amide I localisée vers $1650\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$. L'autodéconvolution par transformée de Fourier et l'augmentation de la résolution de la dérivée seconde ont été appliquées pour augmenter la résolution du spectre dans la région de $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$. Les dérivées secondes ont été obtenues en utilisant un point de convolution de 11 ou 13. L'amélioration de la résolution résultant de l'autodéconvolution et de la dérivée seconde est telle que le nombre et la position des bandes à être adaptées sont déterminés.

La quantification des aires des différentes composantes de la bande amide I, révélées par autodéconvolution et dérivée seconde, a été possible grâce à un ajustement de courbe itératif du moindre carré utilisé pour adapter la forme de la ligne Gaussienne au spectre entre $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$. Les manipulations spectrales reliées à l'ajustement de la courbe sont décrites en détails par Ahmed Ouameur et al. (2004). L'analyse de cet ajustement de courbe a été faite en utilisant le programme GRAMS/AI Version 7.01 (Galactic Industries Corporation, Salem, New Hampshire, USA).

Avant de faire l'ajustement à la courbe, une ligne de base passant à travers les coordonnées à 1700 et 1600 cm^{-1} a été soustraite. La ligne de base a ensuite été modifiée

par un ajustement de courbe itératif du moindre carré, permettant l'ajustement d'une ligne de base horizontale utilisée comme paramètre additionnel afin d'obtenir le meilleur ajustement de courbe possible; aucun ajustement de courbe significatif ne peut être effectué par le simple examen des spectres infrarouges originaux, raison pour laquelle le procédé de déconvolution doit être effectué au préalable.

La courbe résultante a été analysée en assignant chaque bande à une structure secondaire selon la fréquence de son maximum : feuillet β parallèle ($1610\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$), structure désordonnée ou pelote statistique ($1641\text{-}1648\text{ cm}^{-1}$), hélice α ($1650\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$), coude β ($1660\text{-}1680\text{ cm}^{-1}$) et feuillet β antiparallèle ($1680\text{-}1692\text{ cm}^{-1}$). L'aire de chacune des bandes assignées à une conformation donnée a été additionnée et ensuite divisée individuellement par l'aire totale; le nombre obtenu correspond à la proportion de la protéine dans cette conformation. Les attributions de structure secondaire sont consistantes avec les valeurs déterminées théoriquement par Krimm et Bandekar (1986) et expérimentalement par Byler et Susi (1986).

Il est à noter que l'autodéconvolution par transformée de Fourier et l'augmentation de la résolution de la dérivée seconde sont des procédures qui peuvent introduire plusieurs artefacts dans la détermination des structures secondaires d'une protéine, puisque ces procédures peuvent amplifier certaines bandes d'absorption qui ne sont pas de nature protéique dans la région amide I. Les principaux artefacts sont le bruit de l'appareil, l'existence de vapeurs d'eau dans l'air, ainsi que la présence de contaminants ou de contre-ions qui ne font pas partie intégrante de la protéine. Pour mitiger les deux premiers artefacts de mesure, il a été vérifié qu'aucune bande d'absorption n'était amplifiée dans les régions où il n'y a pas de bandes protéiques tel que décrit par Surewicz et al. (1993). Finalement, le dernier artefact est négligeable, dans la mesure où la compagnie Sigma-Aldrich stipule que la protéine HSA (produit A3782) est pure à 99% et que celle-ci a été dissoute dans un simple tampon Tris-HCl lors de la préparation des films humides.

2.7 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier pour PSII

Les spectres de FTIR ont été mesurés avec un spectrophotomètre Perkin-Elmer spectrum 2000 (Perkin-Elmer, USA) équipé d'un détecteur de type HgCdTe (mercury cadmium telluride) et d'un séparateur de faisceau de KBr utilisant des fenêtres de AgBr. Les spectres comptent 100 balayages acquis avec une résolution de 2 cm^{-1} recueillant des données entre $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$; les spectres ont été mesurés pour le PSII non traité (1 mg Chl/mL) et pour chacun des complexes formés avec une diamine (0,01, 0,1, 1, 5, 10 et 20 mM). Les spectres ont été acquis à partir de films hydratés, créés par une incubation de deux heures à la température pièce sous lumière verte de 100 μl des solutions des échantillons sur des fenêtres de KBr; la solution de polyamine a été initialement ajoutée goutte-à-goutte à la solution de PSII en agitant constamment pour assurer la formation d'un mélange homogène.

Les spectres de différence [(PSII + diamine) – (PSII)] ont été générés en utilisant la bande du Triton à 1285 cm^{-1} ; cette bande ne subit pas de décalage ou de variation d'intensité lors de la formation d'un complexe et s'annule lors de la soustraction spectrale, étant ainsi utilisée comme référence externe selon Bograh et al. (1999). La précision de cette méthode de soustraction a été testée en utilisant plusieurs échantillons contrôles possédant les mêmes concentrations de PSII et de diamines, lesquels ont démontré la formation d'une ligne de base similaire. Une échelle d'absorption similaire a été utilisée pour les spectres de PSII libre, pour les spectres de PSII complexé avec les diamines et pour les spectres de différences produits ici, permettant d'obtenir ainsi une soustraction spectrale significative. L'absorption IR typique de la forme libre des diamines à 1597 cm^{-1} a également été soustraite lorsque nécessaire. Les différences spectrales produites ont été utilisées dans le but d'analyser la nature de l'interaction diamine-protéine, tel qu'au niveau des différents modes de liaison peptidiques C=O et C-N, aussi bien qu'au niveau de la complexation diamine-lipide et diamine-tyrosine. Les détails concernant les manipulations spectrales et les traitements de données ont été décrits par Nahar et Tajmir-Riahi (1996) et Bograh et al. (1997).

2.7.1 Analyse de la structure secondaire par FTIR pour PSII

L'analyse de la structure secondaire du PSII et de ses complexes avec les diamines a été effectuée sur la base de la procédure publiée par Byler et Susi (1986), Goormaghtigh et al. (1990), He et al. (1991), Nahar et al. (1994) et Ahmed et al. (1995). La structure secondaire du PSII est déterminée selon la forme de la bande amide I localisée vers $1650\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$. L'autodéconvolution par transformée de Fourier et l'augmentation de la résolution de la dérivée seconde ont été appliquées pour augmenter la résolution du spectre dans la région de $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$. L'amélioration de la résolution a été réalisée en utilisant une ligne de forme Lorentzienne pour l'autodéconvolution et une ligne de forme Gaussienne pour l'apodisation.

La quantification des aires des différentes composantes de la bande amide I, révélées par autodéconvolution et dérivée seconde, a été possible grâce à un ajustement de courbe itératif du moindre carré utilisé pour adapter la forme de la ligne Lorentzienne au spectre entre $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$. Les manipulations spectrales liées à l'ajustement de la courbe sont décrites en détail par Ahmed et al. (1995). L'analyse de cet ajustement a été faite en utilisant le programme Spectra Calc (Galactic Industries Corporation, Salem, New Hampshire, USA).

Avant de faire l'ajustement à la courbe, une ligne de base passant à travers les coordonnées à 1700 et 1600 cm^{-1} a été soustraite. La ligne de base a ensuite été modifiée par un ajustement de courbe itératif du moindre carré, permettant l'ajustement d'une ligne de base horizontale utilisée comme paramètre additionnel afin d'obtenir le meilleur ajustement de courbe possible; aucun ajustement de courbe significatif ne peut être effectué par le simple examen des spectres infrarouges originaux, raison pour laquelle le procédé de déconvolution doit être effectué au préalable. L'amélioration de la résolution résultant de l'autodéconvolution est telle que le nombre et la position des bandes à être adaptées sont déterminés. Le premier ajustement de courbe a été réalisé sur un spectre déconvolué avec un $K = 1,5\text{-}2,5$ avec les paramètres initiaux suivants : la fréquence a été ajustée manuellement en déplaçant le curseur sur l'écran de l'ordinateur, l'intensité a été calculée pour être aux deux tiers de l'intensité réelle du spectre à la fréquence choisie,

alors que la largeur totale à la mi-hauteur a été utilisée à la mesure de la déconvolution appliquée; aucun de ces paramètres n'a été gardé constant durant la procédure d'ajustement à la courbe.

Dans la seconde étape, les mêmes paramètres initiaux, mais avec une largeur totale agrandie à la mi-hauteur, ont été employés sur les spectres non déconvolués pour un nouvel ajustement à la courbe, afin d'obtenir des résultats exempts de tout artefact possible introduit par le processus de déconvolution dans les intensités intégrées. La courbe résultante a été analysée en assignant chaque bande Lorentzienne à une structure secondaire selon la fréquence de son maximum : feuillet β parallèle ($1626-1640\text{ cm}^{-1}$), structure désordonnée ou pelote statistique ($1641-1648\text{ cm}^{-1}$), hélice α ($1655-1658\text{ cm}^{-1}$), coude β ($1670-1678\text{ cm}^{-1}$) et feuillet β antiparallèle ($1685-1691\text{ cm}^{-1}$). L'aire de chacun des bandes assignées à une conformation donnée ont été additionnées et ensuite divisées individuellement par l'aire totale; le nombre obtenu correspond à la proportion de la protéine dans cette conformation. Les attributions de structure secondaire sont consistantes avec les valeurs déterminées théoriquement par Krimm et Bandekar (1986) et expérimentalement par Byler et Susi (1986).

2.8 Dégagement d'oxygène standard

Le taux de dégagement d'oxygène (TDO) dans les fractions membranaires de PSII a été mesuré à 22°C , en utilisant le système Oxylab (Hansatech Instruments, Norfolk, England). Les échantillons ont été éclairés avec une lumière blanche continue. Le milieu d'analyse d'un volume de 1,5mL contenait 400 mM sucrose, 20 mM MES-NaOH (pH 6.3), 1 mM NaCl, 0,5 mM MgCl_2 , 0,35 mM de 2,5-dichlorobenzoquinone (DCBQ) comme accepteur d'électrons du PSII, 25 μg Chl/mL et la concentration spécifiée de polyamine. Les échantillons contrôles avaient un TDO de 700-800 μmol d'oxygène par mg de Chl par heure.

2.9 Induction de fluorescence

Les mesures d'induction de fluorescence dans les fractions membranaires de PSII ont été effectuées à la température pièce en utilisant le Plant Efficiency Analyser

(Hansatech, King' Lynn, Norfolk, UK). Le milieu d'analyse d'un volume de 4 mL contenait 400 mM sucrose, 20 mM MES-NaOH (pH 6.3), 15 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 25 µg Chl/mL de PSII et la concentration spécifiée de polyamine. Les échantillons adaptés dans le noir pendant 1 minute à température pièce ont été excités avec une lumière actinique rouge ($\lambda = 655$ nm et intensité de 3000 µmol m⁻²s⁻¹) fourni par des diodes émettrices de lumière. Comme le signal de fluorescence obtenu dans les 40 premières µs est attribué à des artéfacts dû au temps de réponse de l'instrument, ces données ne sont pas incluses dans l'analyse des courbes d'induction de fluorescence. Le signal à 40 µs est pris comme F_0 , la fluorescence initiale. La fluorescence variable, F_v (la différence entre F_0 et la fluorescence maximale, F_m dans les échantillons adaptés dans le noir), a été utilisée pour calculer les ratios F_v/F_m et F_v/F_0 .

2.10 Thermoluminescence

Les mesures de thermoluminescence dans les fractions membranaires de PSII ont été effectuées avec un équipement construit en laboratoire et décrit par Ducruet (2003) et Gauthier et al. (2006). Le milieu d'analyse d'un volume de 200 µL, contenant 400 mM sorbitol, 50 mM Tricine-NaOH (pH 7.8), 10 mM KCl, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 25 µg Chl/mL de PSII et la concentration spécifiée de polyamine, a été ajouté sur le puits de l'échantillon d'un diamètre de 15 mM positionné juste au-dessus de la plaque Peltier. Les échantillons adaptés dans le noir ont été incubés pendant 2 minutes à 20°C. La température a ensuite été amenée à 0°C à l'intérieur de 5 à 10 secondes puis conservée pour 60 secondes; cette température d'incubation a été choisie pour éviter de causer des dommages par le gel au CDO, lesquels provoquent habituellement des artéfacts de mesure selon Ducruet (2003). Un seul flash blanc sursaturant d'une durée de 1-µs (arrangement 10) du XE-ST Pump Flash unit (Walz, Effeltrich, Germany) a été utilisé pour initier la séparation de charge dans le PSII. Le chauffage linéaire subséquent des échantillons dans le noir total a activé la recombinaison des paires de charge du PSII, lesquelles sont détectables par l'apparence de bandes d'émissions à des optimums caractéristiques de température. Les données ont été analysées avec ThermoLite, un programme développé dans notre laboratoire pour les besoins associés avec le système

d'exploitation Windows OS; le programme est une version réformée de l'original selon Ducruet et Miranda (1992) et Gauthier et al. (2006).

2.11 Cinétique de déclin de fluorescence induite par flash

Les mesures de la montée de fluorescence de la Chl et sa relaxation dans le noir, dans les fractions membranaires de PSII, ont été effectuées avec un fluorimètre modulé par double impulsion (PAM, Walz, Effeltrich, Germany) comme décrit par Ono et al. (1995) et Putrenko et al. (1999), dans le but de détecter les cinétiques de réduction et d'oxydation de Q_A . Le milieu d'analyse d'un volume de 1 mL, contenant 400 mM sucrose, 20 mM MES-NaOH (pH 6.3), 15 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 25 μg Chl/mL de PSII et la concentration spécifiée de polyamine, a été incubé pour 3 minutes à la température pièce dans le noir total d'avant d'initier les mesures de fluorescence. La réduction de Q_A a été obtenue en utilisant un seul flash saturant généré par le XST 103 flash lamp (Walz, Effeltrich, Germany). Le flash a atteint son maximum d'intensité à l'intérieur de 8 μs et s'est dissipé complètement avant 50 μs . Comme le signal actuel de fluorescence se stabilise 100 μs après l'application du flash, les données concernant cette période de temps ne sont pas utilisées pour l'analyse des cinétiques d'oxydation de Q_A . Le signal de fluorescence a été mesuré avec le système d'acquisition des données PDA 100 avec le logiciel WinControl (Walz, Effeltrich, Germany) en utilisant une fenêtre de mesure de 20 μs par donnée et une lumière de mesure modulée à 100 kHz. La durée du temps de mesure avec la faible lumière modulée à une fréquence de 1,6 kHz et avec la lumière de mesure modulée à 100 kHz était de moins de 290 ms. Le rapport signal-bruit a été amélioré en mesurant la montée de la fluorescence de la Chl et sa relaxation dans le noir à partir de neuf échantillons indépendants de la même préparation. Les tracés ont été ramenés à une moyenne avec le logiciel WinControl en estimant les temps de demi-vie et les amplitudes des composantes de la cinétique de déclin de fluorescence en utilisant la fonction tri-exponentielle suivante :

$$F(t) - F' = A_1 e^{-k_1 t} + A_2 e^{-k_2 t} + A_3 e^{-k_3 t} \quad (4)$$

où $F(t)$ est la valeur de fluorescence au temps t , k_n est le taux de la constante, A_n est l'amplitude des phases de relaxation de la fluorescence, et F' est la fluorescence minimale stable à la fin du déclin. Les courbes de mesure des échantillons contrôle n'ont pu être analysées correctement avec une fonction bi-exponentielle.

2.12 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

Les fractions membranaires de PSII ont été incubées 5 minutes dans la noirceur à la température pièce en présence ou non de polyamine, afin de déterminer par électrophorèse si des polypeptides sont relâchés par les polyamines; les échantillons de PSII sont immédiatement prélevés après traitement par une centrifugation de 5 minutes à 12 400 rpm dans une microcentrifugeuse à eppendorf. Les culots ont été lavés deux fois dans 400 mM sucrose et 20 mM MES-NaOH (pH 6.2) avant d'être utilisés pour l'analyse des polypeptides. Les premiers surnageants ont également été centrifugés à 12 400 rpm pendant 5 minutes pour enlever les fragments membranaires restants. L'extraction par Tris-alkali des polypeptides de 17, 23 et 33 kDa a été effectuée selon la méthode proposée par Nakatani (1984). Les supernageants des fractions membranaires de PSII traités avec les polyamines ou par Tris-Alkali ont été concentrés contre le sucrose en utilisant des membranes Spectra/Por munies de pores moléculaires (Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA, USA) avant l'analyse des polypeptides par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. L'électrophorèse a été exécutée à température pièce en utilisant des gels miniatures en galette (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) contenant 13% d'acrylamide et 6 M d'urée. Les gels ont été colorés avec le bleu brillant de Coomassie et le contenu en polypeptide a été analysé avec le système Gel-Doc 2000 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

2.13 Détermination du manganèse

Le contenu en manganèse a été déterminé dans les culots et les supernageants des fractions membranaires de PSII traités avec des polyamines en utilisant le spectrophomètre d'absorption atomique Analyst 100 (Perkin Elmer, Wellesley, Massachusetts, USA) à une $\lambda = 279,5$ nm avec une flamme produite à partir d'un mélange d'air et d'acétylène comme décrit par Boisvert et al. (2007).

2.14 Taux de dégagement d'oxygène induit par flash

Le TDO induit par flash chez les thylacoïdes a été mesuré à 25°C en utilisant un équipement construit par le laboratoire. Cet instrument est composé d'une électrode de mesure de taux d'oxygène couplé à un système d'illumination par flash. Le courant électrique mesuré dans l'électrode est proportionnel à la concentration d'oxygène dans l'échantillon testé, lequel courant est amplifié, puis transmis par un convertisseur analogique-numérique à un ordinateur personnel pour l'enregistrement des données à une fréquence de 0.5 kHz. La description complète de l'appareil est détaillée par Zeinalov (2002). Le compartiment supérieur de l'électrode (où est situé l'anode d'argent) était rempli d'un tampon électrolyte composé de 400 mM de sucrose, 40 mM de Hepes-NaOH (pH 7.6), 100 mM de KCl, 10 mM de NaCl et 5 mM de $MgCl_2$, tandis que l'échantillon de thylacoïdes (déposé sur la cathode en platine) était suspendu dans un tampon de mesure composé de 400 mM de sucrose, 40 mM de Hepes-NaOH (pH 7.6), 10 mM de NaCl, 5 mM de $MgCl_2$ et des concentrations spécifiées de polyamines, de CCCP ou de NH_2OH ; lorsque utilisé, le CCCP a été ajouté d'une solution mère d'éthanol, pour une concentration finale d'éthanol de 1% (v/v) dans chacun des échantillons de thylacoïdes. La concentration de Chl dans chaque échantillon était de 200 $\mu g/mL$ pour un volume final de 100 μL . Les échantillons ont été incubés 3 minutes à la noirceur sur l'électrode avant le début de la mesure. Les échantillons ont ensuite été exposés à un train de 12 flashes lumineux actiniques de 4 joules, d'une durée de 10 μs par flash, avec une fréquence de base de 2 Hz pour illuminer l'échantillon. Le premier flash a été donné 2 secondes après le début de l'acquisition des données.

2.14.1 Analyse de la distribution des paramètres des états S

Les probabilités de transition des états S (γ = simple coup, α = coup manqué, β = double coup, δ = transition arrière, ε = inactivation) ainsi que la répartition initiale des populations des différents états d'oxydation ($S_n = S_{-2} + S_{-1} + S_0 + S_1 + S_2 + S_3 = 100\%$) du complexe de manganèse ont été déterminées mathématiquement, avec les TDO expérimentaux suivant les douze premiers flashes lumineux, selon un modèle de résolution d'équations avec matrice proposé par Shinkarev (2005b), avec une modification incluant les états S inférieurs décrits par Messinger et al. (1991).

CHAPITRE III

POLYAMINE ANALOGUES BIND HUMAN SERUM ALBUMIN

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en 2007 dans le journal *Biomacromolecules* : Beauchemin, R., N'soukpoé-Kossi, C.N., Thomas, T.J., Thomas, T., Carpentier, R., Tajmir-Riahi, H.A., Polyamine analogues bind human serum albumin, vol. 8 : 3177-3183

3.1 Résumé

Les molécules analogues aux polyamines naturelles démontrent une activité anti-tumorale dans plusieurs modèles expérimentaux, dont une habileté, bien documentée, à altérer l'activité des agents thérapeutiques cytotoxiques dans les cancers du sein. Le mode d'action des polyamines est basé sur leur association avec des acides nucléiques et des protéines. Le but de cette étude est donc d'examiner les interactions de l'albumine humaine, une protéine sérique de transport contenue dans le sang, avec des molécules analogues aux polyamines naturelles, tel que 1,11-diamino-4,8-diazaundécane (333), 3,7,11,15-tétrazaheptadécane·4HCl (BE-333), et 3,7,11,15,19-pentazahenicosane·5HCl (BE-3333), en solution aqueuse à conditions physiologiques en utilisant une concentration constante de protéines et plusieurs concentrations différentes de polyamines (μM à mM). Les méthodes spectroscopiques de FTIR, UV-visible, ainsi que du DC sont utilisées pour déterminer le mode de liaison des polyamines avec l'albumine humaine, ainsi que les effets de cette liaison sur la stabilité et la structure secondaire de la protéine. Les analyses structurales démontrent que les polyamines se lient de façon non spécifique (pont H) via les groupes polaires polypeptidiques avec des constantes de liaison de $K_{333} = 9.30 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, $K_{\text{BE-333}} = 5.63 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ et $K_{\text{BE-3333}} = 3.66 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$. La protéine subit un changement de conformation majeur au niveau de sa structure secondaire avec la réduction de la proportion des hélices- α de 55% (protéine libre) à 43-50%, et avec l'augmentation de la proportion des feuillets- β de 17% (protéine libre) à 29-36% dans les différents complexes protéine-polyamine, le tout indiquant une déstabilisation partielle de la structure protéique en interaction avec les polyamines. La structure de l'albumine humaine est moins perturbée par les polyamines analogues comparativement aux polyamines naturelles.

Polyamine analogues bind human serum albumin

¹R. Beauchemin, ¹C. N. N'soukpoé-Kossi, ²T. J. Thomas, ²T. Thomas,
¹R. Carpentier¹ and ¹H. A. Tajmir-Riahi^{1*}

¹ Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, C. P. 500, Trois-Rivières (Québec), G9A 5H7, Canada.

² Department of Medicine and Environmental and Occupational Medicine, and the Cancer Institute of New Jersey, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, Robert Wood Johnson Medical School, New Brunswick, New Jersey 08903 USA.

Key words: polyamine analogues, protein, HSA, binding mode, secondary structure, FTIR, CD spectroscopy.

Abbreviations: HSA; human serum albumin; 333: 1,1-diamino-4,8-diazaundecane.4HCl; BE-333: 3,7,11,15-tetrazaheptadecane.4HCl; BE-3333: 3,7,11,15,19-pentazahenicosane.5HCl; FTIR: Fourier transform infrared spectroscopy; CD: circular dichroism.

* Corresponding author: Fax: 819-376-5084; Tel: 819-376-5011 (ext. 3310);
 e-mail: tajmirri@uqtr.ca

3.2 Abstract

Polyamine analogues show antitumor activity in experimental models, and their ability to alter activity of cytotoxic chemotherapeutic agents in breast cancer is well documented. Association of polyamines with nucleic acids and protein is included in their mechanism of action. The aim of this study was to examine the interaction of human serum albumin (HSA) with several polyamine analogues, such as 1,11-diamino-4,8-diazaundecane (333), 3,7,11,15-tetrazaheptadecane·4HCl (BE-333), and 3,7,11,15,19-pentazahenicosane·5HCl (BE-3333), in aqueous solution at physiological conditions using a constant protein concentration and various polyamine contents (μM to mM). FTIR, UV-visible and CD spectroscopic methods were used to determine the polyamine binding mode and the effects of polyamine complexation on protein stability and secondary structure. Structural analysis showed that polyamines bind non-specifically (H-bonding) via polypeptide polar groups with binding constants of $K_{333} = 9.30 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, $K_{\text{BE-333}} = 5.63 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ and $K_{\text{BE-3333}} = 3.66 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$. The protein secondary structure showed major alterations with a reduction of α -helix from 55% (free protein) to 43-50% and an increase of β -sheet from 17% (free protein) to 29-36% in the 333-, BE-333- and BE-3333 complexes, indicating partial protein unfolding upon polyamine interaction. HSA structure was less perturbed by polyamine analogues compared to those of the biogenic polyamines.

3.3 Introduction

Polyamines are essential for cell growth and differentiation.¹ It has been shown that polyamine levels are increased in malignant tissues and this indicated that polyamine metabolic pathway is a target for antineoplastic therapy.²⁻⁵ Structural polyamine analogues (Figure 3.1) can mimic the natural polyamines in their self-regulatory role but are unable to substitute for biogenic polyamines in terms of supporting cell growth and differentiation.⁶⁻⁸ The analogues have shown major antitumor activity in multiple experimental model systems including breast cancer.⁹⁻¹³ The growth of several breast cancer cell lines is inhibited by synthetic polyamine analogues *in vitro*.^{5,14} New synthetic polyamines were also found to be effective against AIDS-associated infection.¹⁵ Interactions of biogenic polyamine and polyamine analogues with

DNA and RNA are extensively investigated.¹⁶⁻¹⁸ Complexation of biogenic polyamines, for example, spermine, spermidine and putrescine with human serum albumin has been studied, and the effect of polyamine-HSA complexation on protein secondary structure was recently reported.¹⁹

Human serum albumin (Figure 3.2)²⁰ is a transport protein and the principal extracellular protein with a high concentration in blood plasma.^{21,22} HSA is a globular protein composed of three structurally similar domains (I, II and III), each containing two subdomains (A and B), and stabilized by 17 disulphide bridges.²¹⁻²⁷ Aromatic and heterocyclic ligands were found to bind within two hydrophobic pockets in subdomains IIA and IIIA, namely, site I and site II.²¹⁻²⁷ Seven binding sites are localized for fatty acids in subdomains IB, IIIA, IIIB and on the subdomain interfaces.²⁰ HSA has also a high affinity metal binding site at the N-terminus.²¹ These multiple binding sites underlie the exceptional ability of HSA to interact with many organic and inorganic molecules and make this protein an important regulator of intercellular fluxes as well as the pharmacokinetic behavior of many drugs.²¹⁻²⁸ Therefore, it was of interest to study the interaction of polyamine analogues with HSA in aqueous solution and to examine the effects of polyamine complexation on protein stability and secondary structure.

In this report we present FTIR, CD and UV-visible spectroscopic results on the interaction of HSA with synthetic polyamine analogues 333, BE-333 and BE-3333 in aqueous solution at physiological conditions using constant protein concentration and various drug contents. Structural information regarding the polyamine binding mode and the effects of polyamine-HSA complexation on the protein stability and secondary structure are provided. Furthermore, we compared polyamine analogue-HSA adducts with those of the corresponding biogenic polyamine-protein complexes.

3.4 Experimental procedures

3.4.1 Materials

Human serum albumin fraction V was purchased from Sigma Chemical Company and used as supplied. Polyamine analogues, 333, BE-333, and BE-3333 were synthesized in the laboratory of Dr. Akira Shirahata (Josai University, Saitama, Japan). Other chemicals were of reagent grade and used without further purification.

3.4.2 Preparation of stock solutions

Human serum albumin was dissolved in aqueous solution (40 mg/ml or 0.5 mM) containing Tris-HCl buffer (pH 7.2). The protein concentration was determined spectrophotometrically using the extinction coefficient of $36\,500\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ at 280 nm.²⁹ In this study, HSA did not have its fatty acids removed, thus being in a situation closer to that which occurs *in vivo*. Under normal physiological conditions, between 0.1 to 2 fatty acid molecules are bound to albumin.^{21,25} The polyamine solutions (1 μM to 2 mM) were prepared in distilled water.

3.4.3 Absorption spectroscopy

The absorption spectra were recorded on a Perkin Elmer Lambda 40 Spectrophotometer. Quartz cuvettes of 1 cm were used. The absorption spectra were recorded for free HSA (12.5 μM) and for its complexes with each polyamine analogue (1 μM to 1 mM). To calculate the polyamine-protein binding constant, the data are treated according to the following equations:



$$K = [\text{HSA: polyamine}] / [\text{HSA}] [\text{polyamine}] \quad (2)$$

The values of the binding constants K were obtained from the protein absorption at 280 nm according to the methods published in the literature,^{30,31} where the bindings of various ligands to hemoglobin were described. For weak binding affinities the data were treated using linear reciprocal plots based on the following equation:

$$\frac{1}{A - A_0} = \frac{1}{A_{\infty} - A_0} + \frac{1}{K(A_{\infty} - A_0)} \cdot \frac{1}{C_{\text{ligand}}} \quad (3)$$

where, A_0 is the absorbance of protein at 280 nm in the absence of ligand, A_{∞} is the final absorbance of the ligated-protein, and A is the recorded absorbance at different ligand concentrations. The double reciprocal plot of $1/(A-A_0)$ vs. $1/C_{\text{ligand}}$ is linear and the binding constant (K) can be estimated from the ratio of the intercept to the slope.^{30,31}

3.4.4 CD spectroscopy

Spectra of HSA and its polyamine complexes were recorded with a Jasco J-720 spectropolarimeter. For measurements in the far-UV region (178-260 nm), a quartz cell with a path length of 0.01 cm was used in nitrogen atmosphere. HSA concentration was kept constant (12.5 μM) while varying each polyamine analogue concentration (0.25, 0.5, and 1 mM). Five scans were accumulated at a scan speed of 50 nm per minute, with data being collected at every nm from 178 to 260 nm. Sample temperature was maintained at 25 °C using a Neslab RTE-111 circulating water bath connected to the water-jacketed quartz cuvettes. Spectra were corrected for buffer signal, and conversion to the Mol CD ($\Delta\epsilon$) was performed with the Jasco Standard Analysis software. The protein secondary structure was calculated using predictions of the different assignments of secondary structures by comparison with different ranges of proteins from high quality X-ray diffraction data.³²⁻³³ The program CDSSTR used is provided in the CDPro software package, which is available at <http://lamar.colostate.edu/~sreeram/CDPro>.

3.4.5 FTIR spectroscopic measurements

Infrared spectra were recorded on a FTIR spectrometer (Impact 420 model), equipped with DTGS (deuterated triglycine sulfate) detector and KBr beam splitter using AgBr windows. Solution of polyamine was added dropwise to the protein solution with constant stirring to ensure the formation of homogeneous solution and to attain the desired polyamine concentrations of 0.125, 0.25, 0.5, and 1 mM with a final protein concentration of 0.25 mM (20 mg/ml). Spectra were collected after 2h incubation of HSA with polyamine solution at room temperature, using the hydrated films of samples

containing various concentrations of polyamine with the same protein content. Interferograms were accumulated over the spectral range 4000-600 cm^{-1} with a nominal resolution of 4 cm^{-1} and a minimum of 100 scans. The difference spectra [(protein solution + polyamine solution) – (protein solution)] were generated using the polypeptide antisymmetric and symmetric C-H stretching bands,³⁴ located at 2900-2800 cm^{-1} , as internal standard. These bands, which are due to C-H stretching vibrations, do not undergo any spectral changes (shifting of intensity variation) upon complexation and therefore are commonly used as internal standard. When producing difference spectra, these bands are adjusted to the baseline level in order to normalize difference spectra. Details regarding infrared spectral treatment are given in our recent publication.¹⁹

3.4.6 Analysis of protein secondary structure

Analysis of the secondary structure of HSA and its polyamine analogue complexes was carried out on the basis of the procedure already reported.³⁵ The protein secondary structure is determined from the shape of the amide I band, located at 1650-1660 cm^{-1} . Fourier self-deconvolution and second derivative resolution enhancement were applied to increase the spectral resolution in the region of 1700-1600 cm^{-1} . The second derivatives were obtained using a point convolution 11 or 13. The resolution enhancement resulting from self-deconvolution and the second derivative is such that the number and the position of the bands to be fitted are determined. In order to quantify the area of the different components of amide I contour, revealed by self-deconvolution and second derivative, a least-square iterative curve fitting was used to fit the Gaussian line shapes to the spectra between 1700-1600 cm^{-1} . The details of spectral manipulation regarding curve-fitting are previously reported.^{19,36,37} The curve-fitting analysis was performed using the GRAMS/AI Version 7.01 software of the Galactic Industries Corporation.

3.5 Results and discussion

3.5.1 FTIR spectra of polyamine-HSA adducts

Evidence regarding polyamine-HSA complexes comes from infrared spectroscopic results. Since there was no major spectral shifting for the protein amide I band at 1656 cm^{-1} (mainly C=O stretch) and amide II band at 1543 cm^{-1} (C-N stretching coupled with N-H bending modes),^{34,35} upon polyamine interaction, the difference spectra [(protein solution + polyamine solution) – (protein solution)] were obtained in order to monitor the intensity variations of these vibrations and the results are shown in Figures 3.3, 3.4 and 3.5. Similarly, the infrared self-deconvolution with second derivative resolution enhancement and curve-fitting procedures³⁵ were used to determine the protein secondary structures in the presence of polyamine analogues (Figure 3.6 and Table 3.1). CD spectroscopy was also used to obtain additional information on protein conformational changes, and the results are shown in Figure 3.7 and Table 3.2.

At low polyamine concentration ($250\text{ }\mu\text{M}$), major intensity changes were observed for the protein amide I and amide II bands at 1656 and 1543 cm^{-1} , respectively, in the difference spectra shown in Figures 3.3, 3.4, and 3.5 (Diff.). The positive features at 1659 and 1540 cm^{-1} (Figure 3.3, Diff. HSA-333), 1657 , and 1543 cm^{-1} (Figure 3.4, Diff. HSA-BE-333), and 1658 and 1542 cm^{-1} (Figure 3.5, Diff. HSA-BE-3333) in the difference spectra of polyamine-protein complexes are related to increase in intensity of the amide I and amide II bands at 1656 and 1543 cm^{-1} , upon polyamine analogue interaction (Figures, 3.3, 3.4, and 3.5, Diff. $250\text{ }\mu\text{M}$). The increase in intensity of the amide I and amide II bands is due to polyamine binding to protein C=O and C=N groups. As analogue concentration increased to 1 mM , strong negative features were observed at 1654 and at 1544 cm^{-1} (HSA-333), at 1656 and 1545 cm^{-1} (HSA-BE-333), and at 1652 and 1543 cm^{-1} (HSA-BE-3333), upon polyamine-protein interaction (Figures 3.3, 3.4, and 3.5, Diff. 1 mM). The observed decrease in intensities of the amide I and amide II bands is due to the alteration of protein conformation (reduction of α -helix) at high polyamine concentration.

A quantitative analysis of the protein secondary structure for the free HSA and its polyamine analogue adducts in hydrated films has been carried out, and the results are shown in Figure 3.6 and Table 3.1. The free protein contained major α -helix 55% (1657 cm^{-1}), β -sheet 17% (1616 , 1625 and 1634 cm^{-1}), turn structure 14% (1677 cm^{-1}), β -antiparallel 7% (1688 cm^{-1}), and random coil 7% (1643 cm^{-1}) (Figure 3.6 and Table 3.1). The β -sheet structure is composed of three components at 1616 (inter β -strand), 1625 (intra β -strand), and 1634 cm^{-1} (hydrated) that are consistent with the spectroscopic studies of human serum albumin.^{38,39} At low polyamine analogue concentration, no major alterations of protein conformation were observed. Consistent with the decrease of intensity in the difference spectra mentioned above around 1654 and 1544 cm^{-1} , at high drug content, the α -helix structure was reduced from 55% to 51% (HSA-333), 50% (HSA-BE-333), and to 43% (HSA-BE-3333), while the β -sheet structure increased from 17% to 30% (HSA-333), to 29% (HSA-BE-333), and to 36% (HSA-BE-3333), upon polyamine analogue interaction (Figure 3.6 and Table 3.1). The decrease in α -helix and increase in β -sheet structure are evidence for some degree of protein unfolding at high polyamine concentration (1 mM).

3.5.2 CD spectra

The CD spectroscopic results shown in Figure 3.7 and Table 3.2 exhibit marked similarities with those of infrared data. Major reduction of α -helix from 54% (free HSA) to 48% (HSA-BE-333), 49% (HSA-BE-3333), and to 49% (HSA-333) with increase in β -turn from 14% (free HSA) to 15-18% (complexes) and other components from 21% (free HSA) to 23-26% (complexes) were observed (Figure 3.7 and Table 3.2). The CD data related to conformational changes are consistent with the infrared results that show a major reduction of α -helix and an increase of β -structure, upon polyamine-protein interaction (Figure 3.6 and Table 3.1). The conformational changes observed in CD and IR results are indicative of a partial protein unfolding upon polyamine analogue-HSA complexation. It should be noted that there are some minor differences between IR versus CD results regarding protein conformation (Tables 3.1 and 3.2). The reason for the differences is the sample preparation because IR measurements were performed in hydrated films, whereas CD were conducted in aqueous solutions. Similarly, polyamines

to HSA concentration ratios were different in the two cases. Similar differences were also observed between IR and CD measurements for several proteins where sample preparations were different for IR and CD measurements.⁴⁰

3.5.3 Stability of polyamine analogue-HSA complexes

The polyamine-HSA binding constants were determined using UV-visible spectroscopic method (described in Experimental procedures). The double reciprocal plot of $1/(A - A_0)$ vs $1/(\text{polyamine concentration})$ is linear and the binding constant (K) can be estimated from the ratio of the intercept to the slope (Figure 3.8). A_0 is the initial absorbance of the free HSA at 280 nm, and A is the recorded absorbance at different polyamine concentrations. One binding site was observed for each polyamine-protein complex, and the overall binding constants estimated were $K_{333} = 9.30 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, $K_{\text{BE-333}} = 5.63 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$, and $K_{\text{BE-3333}} = 3.66 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ (Figure 3.8). The association constants calculated for the polyamine-HSA adducts show nonspecific analogue-protein interaction with respect to the other strong ligand-protein complexes with binding constants ranging from 10^6 M^{-1} to 10^8 M^{-1} .⁴¹⁻⁴⁵

3.5.4 Comparison Between Polyamine Analogue-HSA and Biogenic Polyamine-HSA Interactions

The polyamine-HSA binding generally occurred at protein surface via H-bonding interactions. However, in our previous article,¹⁹ using UV-visible absorption spectroscopy, stronger affinity was observed for biogenic polyamine-HSA with binding constants of $K_{\text{spermine}} = 1.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $K_{\text{spermidine}} = 5.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, and $K_{\text{putrescine}} = 3.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ with respect to those of the polyamine analogue-HSA complexes $K_{333} = 9.30 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, $K_{\text{BE-333}} = 5.63 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$, and $K_{\text{BE-3333}} = 3.66 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$. The number of positive charges associated with biogenic polyamine contributed to the stability of the complexes formed in the order spermine > spermidine > putrescine, while it did not play a similar role for polyamine analogue-protein complexation with an order of 333 > BE-333 > BE-3333. In general, different perturbations of protein secondary structure were observed for biogenic polyamine compared with polyamine analogues: (1) major reduction of α -helix from 55% (free HSA) to 40% (spermine), 43% (spermidine), and 40% (putrescine)

(Table 3) than those of the polyamine analogues with reduced α -helix of 51% (333), 50% (BE-333), and 43% (BE-3333) (Table 3.1); (2) bigger increase of β -structure induced by polyamine analogues than by biogenic polyamines (Table 3.1 vs Table 3.3); and (3) disappearance of random coil with polyamine analogues, and it seems to be converted to β -sheet structure. The observed structural changes could be indicative of a larger protein unfolding induced by biogenic polyamines compared to that by polyamine analogues.

In conclusion, as could be noticed from preceding results, the binding constants of natural polyamines (spermine, spermidine, and putrescine) remain in the millimolar to micromolar range, in spite of the decrease in the number of positive charges. However, binding constants decrease more drastically when the spacing of positive charges (as in 333) and end groups (as in BE-333) change, compared to the value of spermine.

The conformational changes induced by 1 mM spermine, spermidine, and putrescine seem to be in the comparable range. This is reminiscent of the well-known ability of polyamines to compensate for each other when one of them is in short supply, when an inhibitor is used to selectively decrease one of the natural polyamines. However, the polyamine analogues, 333 and BE-333 have lost the ability to influence conformation as compared to spermine at 1 mM concentration. In addition, BE-3333 was as effective as spermine, probably because part of the interaction sites lost by the occupation of end groups is compensated by the presence of additional positive charge as a pentamine. Interestingly, this effect was not reflected in the binding constant, which remained low compared to that of spermine, suggesting that even with low affinity interactions, there could be significant conformational changes. HSA-polyamine-polyamine analogue interactions thus provide a model for learning about the influence of polyamines on protein structure and conformation.

3.6 Acknowledgement

This work was supported by grants from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the National Institute of Health (CA080163) of USA. We highly appreciate the help of Dr. C. D. Kanakis from Agricultural University of Athens, with the curve-fitting analysis.

3.7 References

- (1) Tabor, C. W.; Tabor, H. H. *Annu. Rev. Biochem.* **1984**, *53*, 749.
- (2) Pegg, A. E. *Cancer Res.* **1988**, *48*, 759.
- (3) Thomas, T.; Thomas, T. J. *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 244.
- (4) Childs, A. C.; Mehta, D. J.; Gerner, E. W. *Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, *60*, 1394.
- (5) Hahm, H. A.; Dunn, V. R.; Butash, K.A.; Deveraux, W. L.; Woster, P. M.; Casero, R. A., Jr.; Davidson, N. E. *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 391.
- (6) Bergeron, R. J.; Neims, A. J.; McManis, J. S.; Hawthorne, T. R.; Vinson, J. R. T.; Bortell, R.; Ingeno, M. J. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1183.
- (7) Bergeron, R. J.; McMains, J. S.; Liu, C. Z.; Frng, Y.; Weimar, W. R.; Luchetta, G. R.; Wu, Q.; Ortiz-Ocasio, J.; Vinson, J. R. T.; Kramer, D.; Porter, C. W. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3464.
- (8) Davidson, N. E.; Mank, A. R.; Prestigiacomo, L. J.; Bergeron, J. R.; Casero, R. A., Jr. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 2071.
- (9) McCloskey, D. E.; Yang, J.; Woster, P. A.; Davidson, N. E.; Casero, R. A., Jr. *Clin. Cancer Res.* **1996**, *55*, 441-446.
- (10) McCloskey, D. E.; Casero, R. A., Jr.; Woster, P.A.; Davidson, N. E. *Cancer Res.* **1995**, *55*, 3233
- (11) Shah, N.; Thomas, T.; Shirahata, A.; Sigal, L. H.; Thomas, T. J. *Biochemistry* **1999**, *38*, 14763.
- (12) Thomas, T.; Thomas, T. J. *J. Cell Mol. Med.* **2003**, *7*, 113.

- (13) McCloskey, D. E.; Pegg, A. E. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 13881.
- (14) Ha, H. C.; Woster, P. A.; Yager, J. D.; Casero, R. A., Jr. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 11557.
- (15) Bacchi, C. J.; Weiss, L. M.; Lane, S.; Frydman, B.; Valasinas, A.; Reddy, V.; Sun, J. S.; Marton, L. J.; Khan, I. A.; Moretto, M.; Yarlett, N.; Wittner, M. *Antimicrobial Agents and Chemother.* **2002**, 46, 55.
- (16) Ahmed Ouameur, A.; Tajmir-Riahi, H. A. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 42041.
- (17) D'Agostino, L.; di Pietro, M.; Di Luccia, A. *FEBS J.* **2005**, 272, 3777.
- (18) Venkiteswaran, S.; Vijayanathan, V.; Shirahata, A.; Thomas, T.; Thomas, T. J. *Biochemistry* **2005**, 44, 303
- (19) Ahmed Ouameur, A.; Mangier, E.; Diamantoglou, S.; Rouillon, R.; Carpentier, R.; Tajmir-Riahi, H. A. *Biopolymers* **2004**, 73, 503.
- (20) Sugio, S.; Kashima, A.; Mochizuki, S.; Noda, M.; Kobayashi, K. *Protein Eng.* **1999**, 12, 439.
- (21) Carter, D. C.; Ho, J. X. *Adv. Protein Chem.* **1994**, 45, 153.
- (22) Peters, T. All about albumin. *Biochemistry, Genetics and Medical Applications*; Academic Press: San Diego, CA, 1996.
- (23) He, H. M.; Carter, D. C. *Nature* **1992**, 358, 209.
- (24) Peters, T. *Adv. Protein Chem.* **1985**, 37, 161.
- (25) Curry, S.; Brick, P.; Frank, N. P. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1441, 131.
- (26) Petitpas, I.; Grune, T.; Battacharya, A. A.; Curry, S. *J. Mol. Biol.* **2001**, 314, 955.
- (27) Grelamo, E. L.; Silva, C. H. T. P.; Imasato, H.; Tabak, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, 1594, 84.
- (28) Chuang, V. T. G.; Otagiri, M. *Biochim. Biophys. Acta* 2001, 1546, 337.
- (29) Painter, L.; Harding, M. M.; Beeby, P. J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans* **1998**, 18 3041.

- (30) Stephanos, J. J. *J.Inorg. Biochem.* **1996**, 62, 155.
- (31) Stephanos, J. J.; Farina, S. A.; Addison, A. W. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, 1295, 209.
- (32) Johnson, W. C. *Struct. Funct. Genet.* **1999**, 35, 307.
- (33) Sreerama, N.; Woody, R. W. *Anal. Biochem.* **2000**, 287, 252.
- (34) Krimm, S.; Bandekar, J. *Adv. Protein Chem.* **1986**, 38, 181.
- (35) Byler, D. M.; Susi, H. *Biopolymers* **1986**, 25, 469.
- (36) Ahmed, A.; Tajmir-Riahi, H. A.; Carpentier, R. *FEBS Lett.* **1995**, 363, 65.
- (37) Beauchemin, R.; Harnois, J.; Rouillon, R.; Tajmir-Riahi, H. A.; Carpentier, R. *J. Mol. Struct.* **2007**, 833, 169.
- (38) Boulkanz, L.; Balcarand, N.; Baron, M. H. *Appl. Spectrosc.* **1995**, 49, 1737.
- (39) Bramanti, E.; Benedetti, E. *Biopolymers* **1996**, 38, 639.
- (40) Goormaghtigh, E., Cabiaux, V., Ruyschaert, J.M. *Eur. J. Biochem.* **1990**, 193, 409.
- (41) Gaudreau, S.; Neault, J. F.; Tajmir-Riahi, H. A. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2002**, 19, 1007.
- (42) Neault, J. F.; Novetta_Delen, A.; Arakawa, H.; Malonga, H.; Tajmir-Riahi, H. A. *Can. J. Chem.* **2000**, 78, 291.
- (43) Sulkowska, A. *J. Mol. Struct.* **2002**, 614, 227.
- (44) Liu, J.; Tian, J.; Hu, Z.; Chen, X. *Biopolymers* **2004**, 73, 443.
- (45) Kragh-Hansen, U. *Dan. Med. Bull.* **1990**, 37, 57.

3.8 Figure captions

Figure 3.1 Polyamine Analogues

Figure 3.2 Chemical structure of human serum albumin

Figure 3.3 FTIR spectra in the region of $1800\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ of hydrated films (pH 7.2) for free HSA (0.25 mM) and 333-HSA adducts (top three curves) and difference spectra (Diff.) of polyamine-HSA complexes (bottom two curves) obtained at different polyamine concentrations (indicated on the figure).

Figure 3.4 FTIR spectra in the region of $1800\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ of hydrated films (pH 7.2) for free HSA (0.25 mM) and BE-333-HSA adducts (top three curves) and difference spectra (Diff.) of polyamine-HSA complexes (bottom two curves) obtained at different polyamine concentrations (indicated on figure).

Figure 3.5 FTIR spectra in the region of $1800\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ of hydrated films (pH 7.2) for free HSA (0.25 mM) and BE-3333-HSA adducts (top three curves) and difference spectra (Diff.) of polyamine-HSA complexes (bottom two curves) obtained at different polyamine concentrations (indicated on figure).

Figure 3.6 Second derivative resolution enhancement and curve-fitted amide I region ($1700\text{-}1612\text{ cm}^{-1}$) for free HSA and its polyamine adducts in aqueous solution with 1 mM polyamine and 1.5 mM protein concentrations.

Figure 3.7 Circular dichroism of the free HSA and its polyamine analogue complexes in aqueous solution with protein concentration of $12.5\text{ }\mu\text{M}$ and polyamine concentrations of 0.25, 0.5, and 1 mM.

Figure 3.8 Plot of $1/(A-A_0)$ vs $(1/L)$ and the binding constant K for polyamine-HSA complexes, where A_0 is the initial absorbance of HSA (280 nm), and A is the recorded absorbance at different polyamine concentrations (L).

Table 3.1 Secondary structure analysis (Infrared) for the free HSA and its polyamine analogue complexes in H₂O at pH 7.2^a

amide I components (cm ⁻¹)	Free HSA (%) 0.25 mM	HSA-333 (%) 1 mM	HSA-BE333 (%) 1 mM	HSA-BE3333 (%) 1 mM
1692-1680 <i>β</i> -anti	7 ± 1	4 ± 1	6 ± 1	3 ± 1
1680-1660 turn	14 ± 1	15 ± 2	15 ± 2	18 ± 1
1660-1650 <i>α</i> -helix	55 ± 1	51 ± 1	50 ± 1	43 ± 1
1648-1641 random coil	7 ± 1	-	-	-
1640-1610 <i>β</i> -sheet	17 ± 1	30 ± 1	29 ± 1	36 ± 1

^aThe mean deviation was ± 1.0% to ± 2.0% for the free protein and its polyamine complexes.

Table 3.2 Secondary structure of HSA complexes with polyamine analogues calculated by CDSSTR software (CD spectra)^a

polyamine concentration (mM)	α -helix ($\pm 3\%$)	β -strand ($\pm 2\%$)	β -turn ($\pm 2\%$)	others ($\pm 2\%$)
(Free HSA)	54	11	14	21
333-HSA (1 mM)	48	12	16	24
BE-333-HSA (1 mM)	49	10	18	23
BE-3333-HSA (1 mM)	49	10	15	26

^a HSA concentration in free and in complexes was 12.5 μM .

Table 3.3 Secondary structure analysis (infrared) for the free HSA and its biogenic polyamine complexes in H₂O at pH 7.2^a

amide I components (cm ⁻¹)	Free HSA (%)	HSA- spermine (%) 1 mM	HSA- spermidine (%) 1 mM	HSA- putrescine (%) 1 mM
1692-1680 β -anti	7 \pm 2	10 \pm 1	3 \pm 1	5 \pm 1
1680-1660 turn	14 \pm 1	20 \pm 2	23 \pm 2	22 \pm 1
1660-1650 α -helix	55 \pm 1	40 \pm 1	43 \pm 1	40 \pm 1
1648-1641 random coil	7 \pm 1	7 \pm 1	7 \pm 1	-
1640-1610 β -sheet	17 \pm 1	23 \pm 1	24 \pm 1	33 \pm 1

^aThe mean deviation was \pm 1.0% to \pm 2.0% for the free protein and its polyamine complexes.¹⁹

Figure 3.1

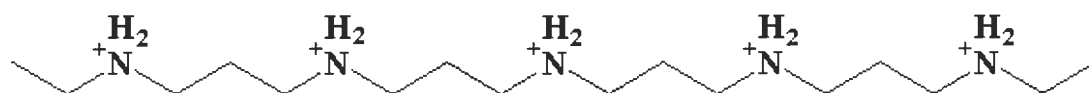
**333****BE-333****BE-3333**

Figure 3.2

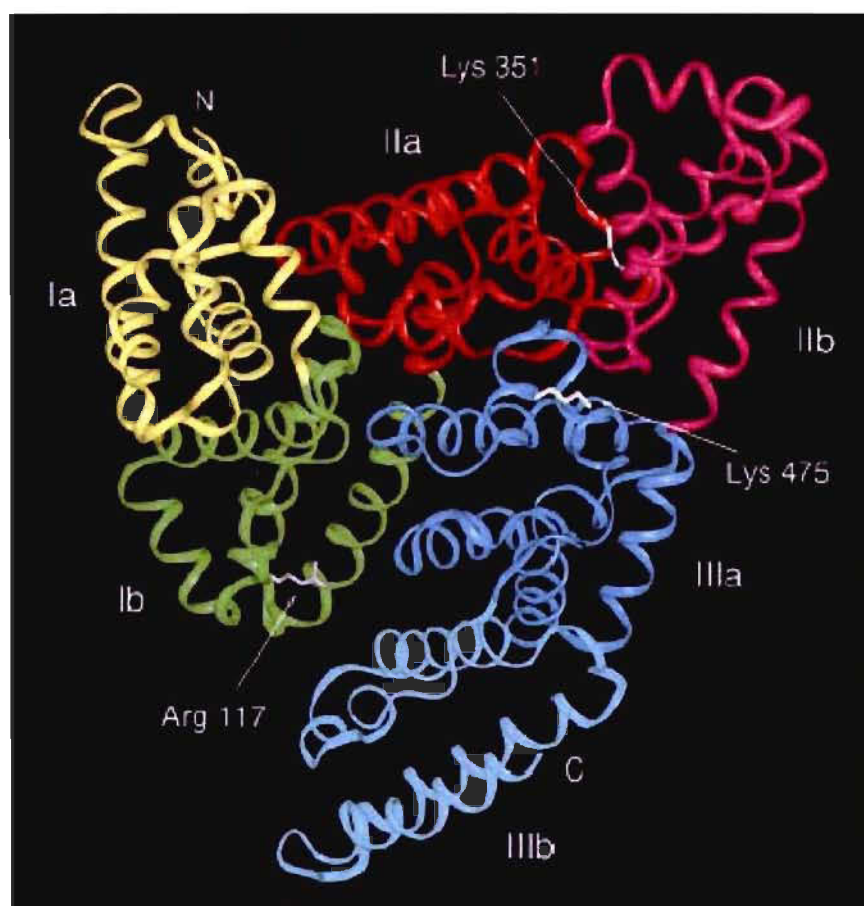


Figure 3.3

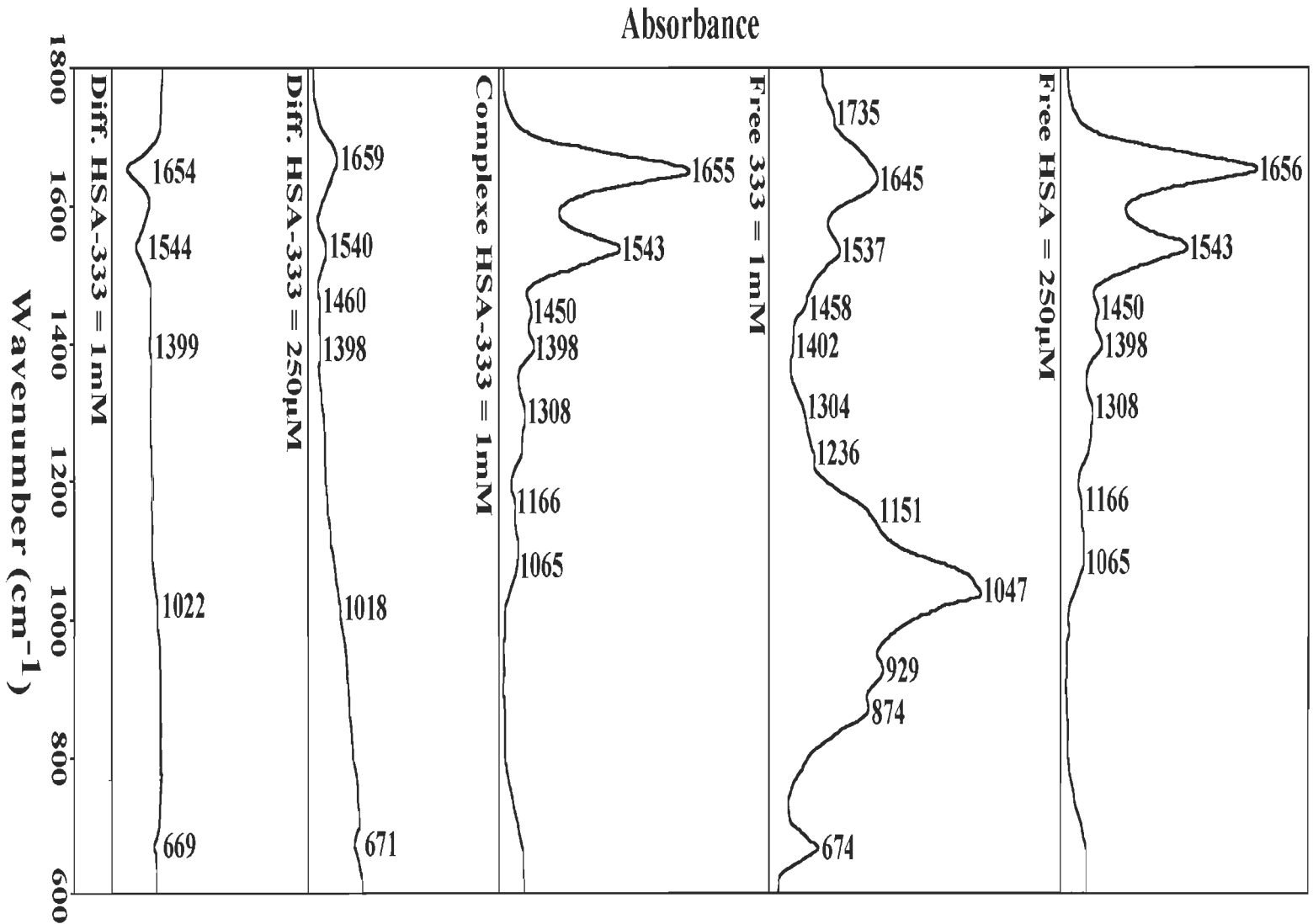


Figure 3.4

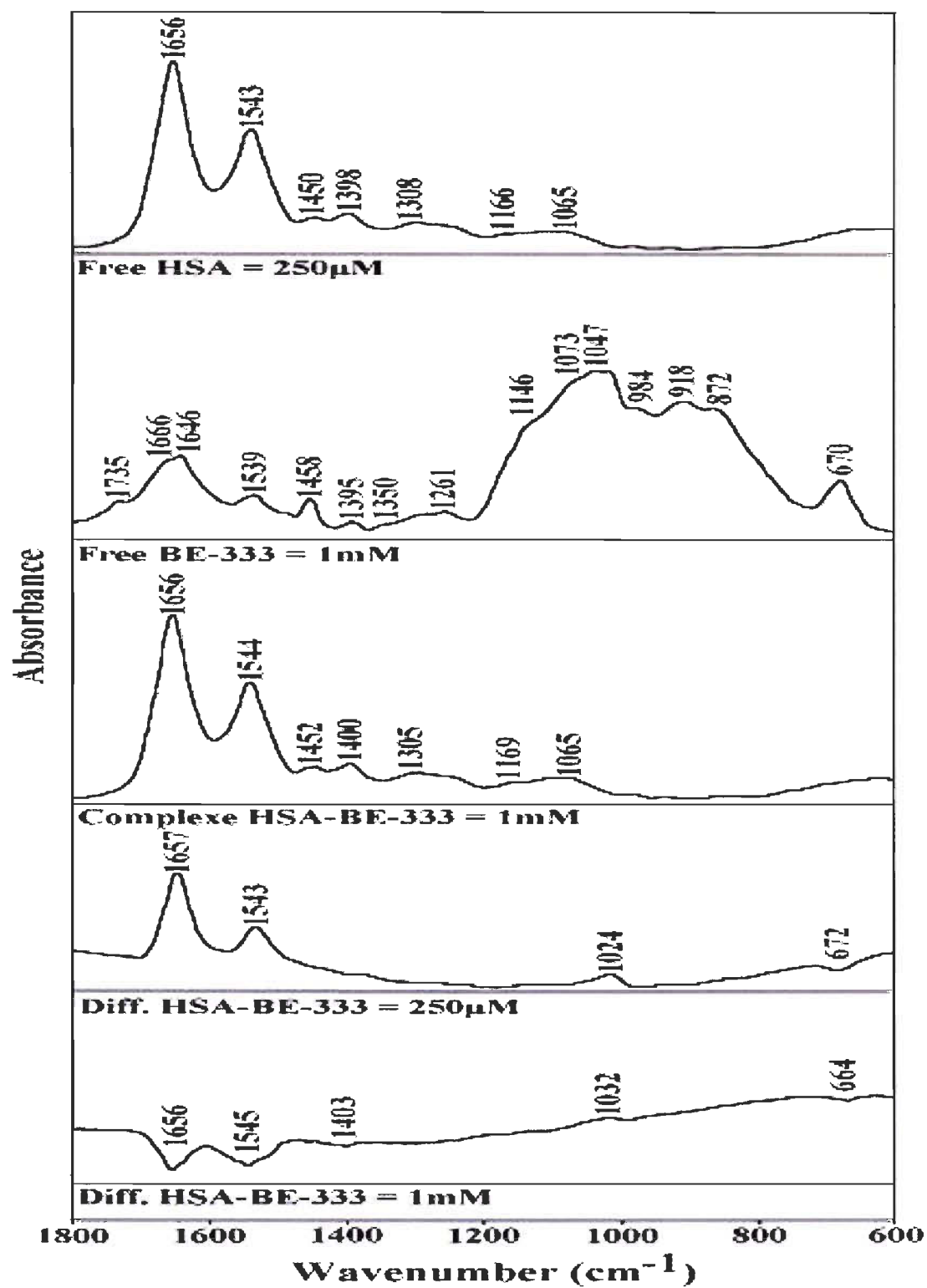


Figure 3.5

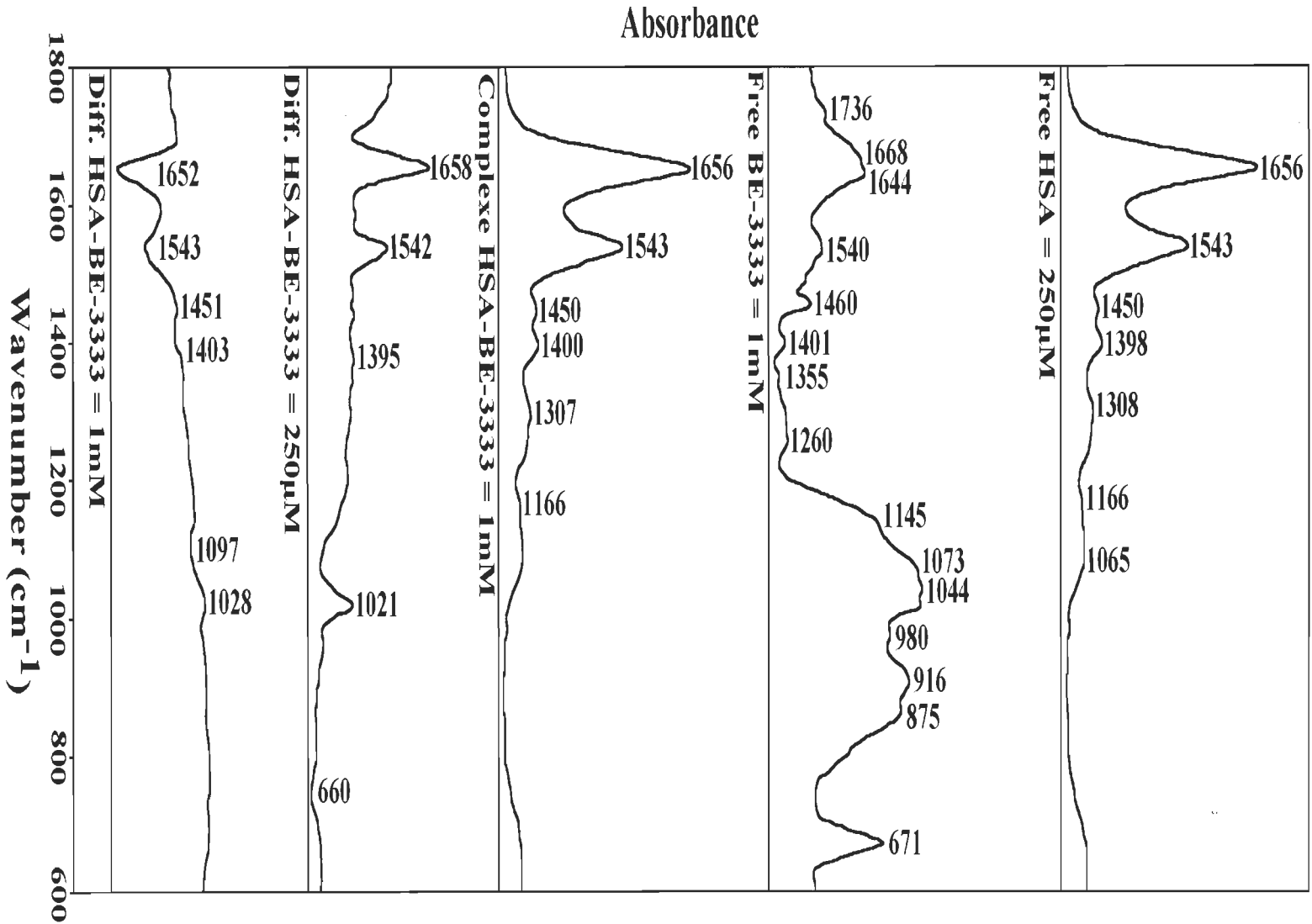


Figure 3.6

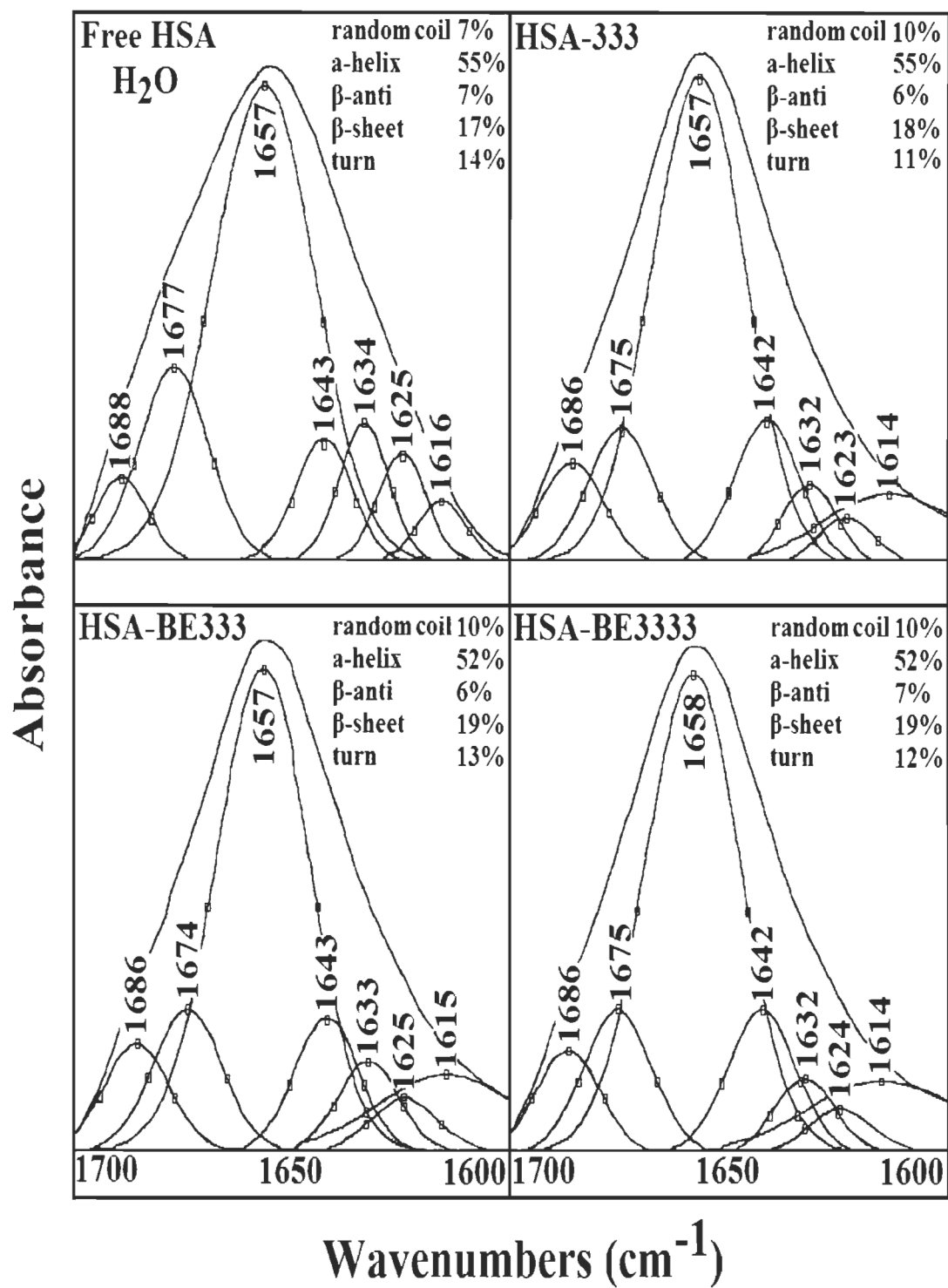


Figure 3.7

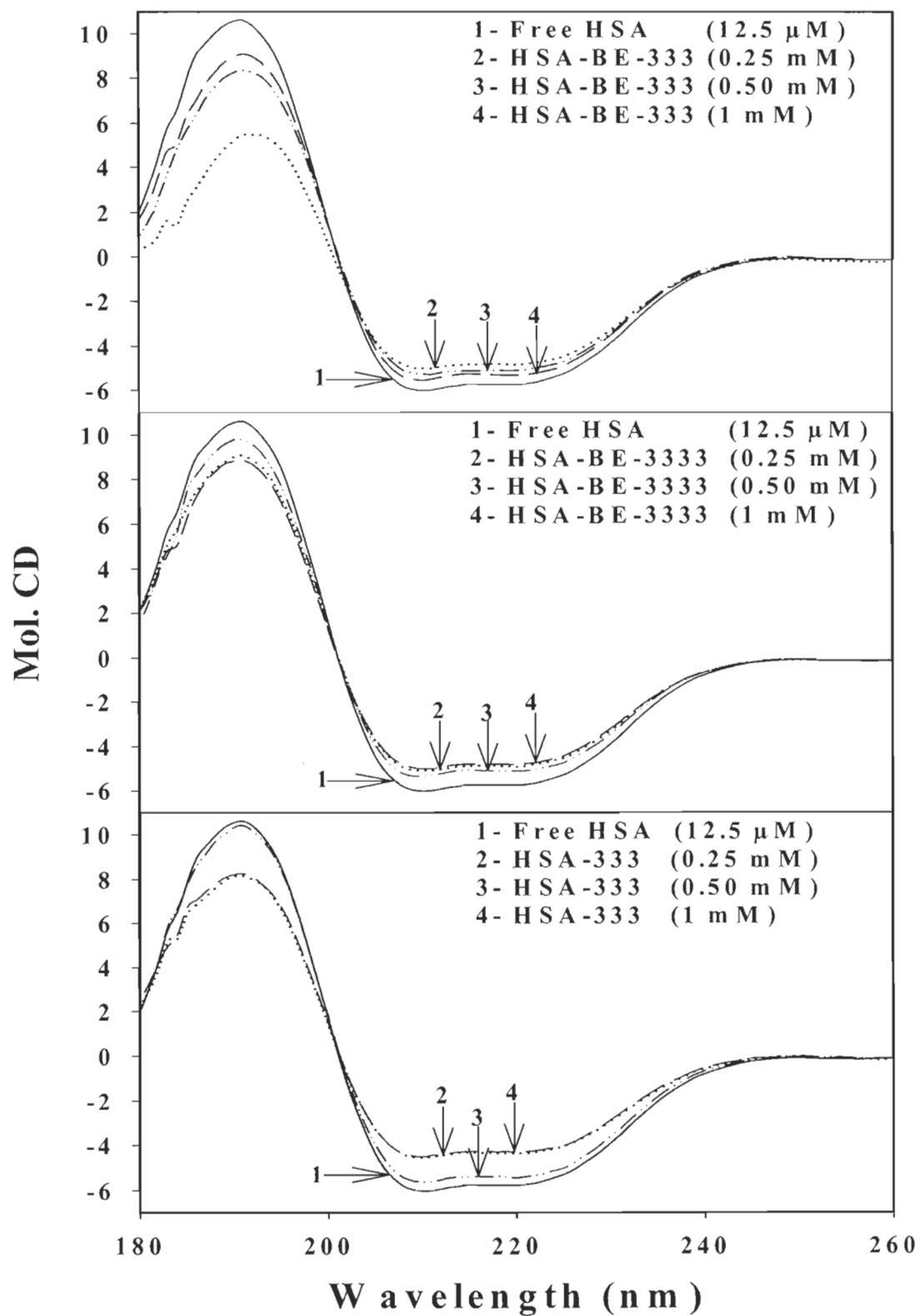
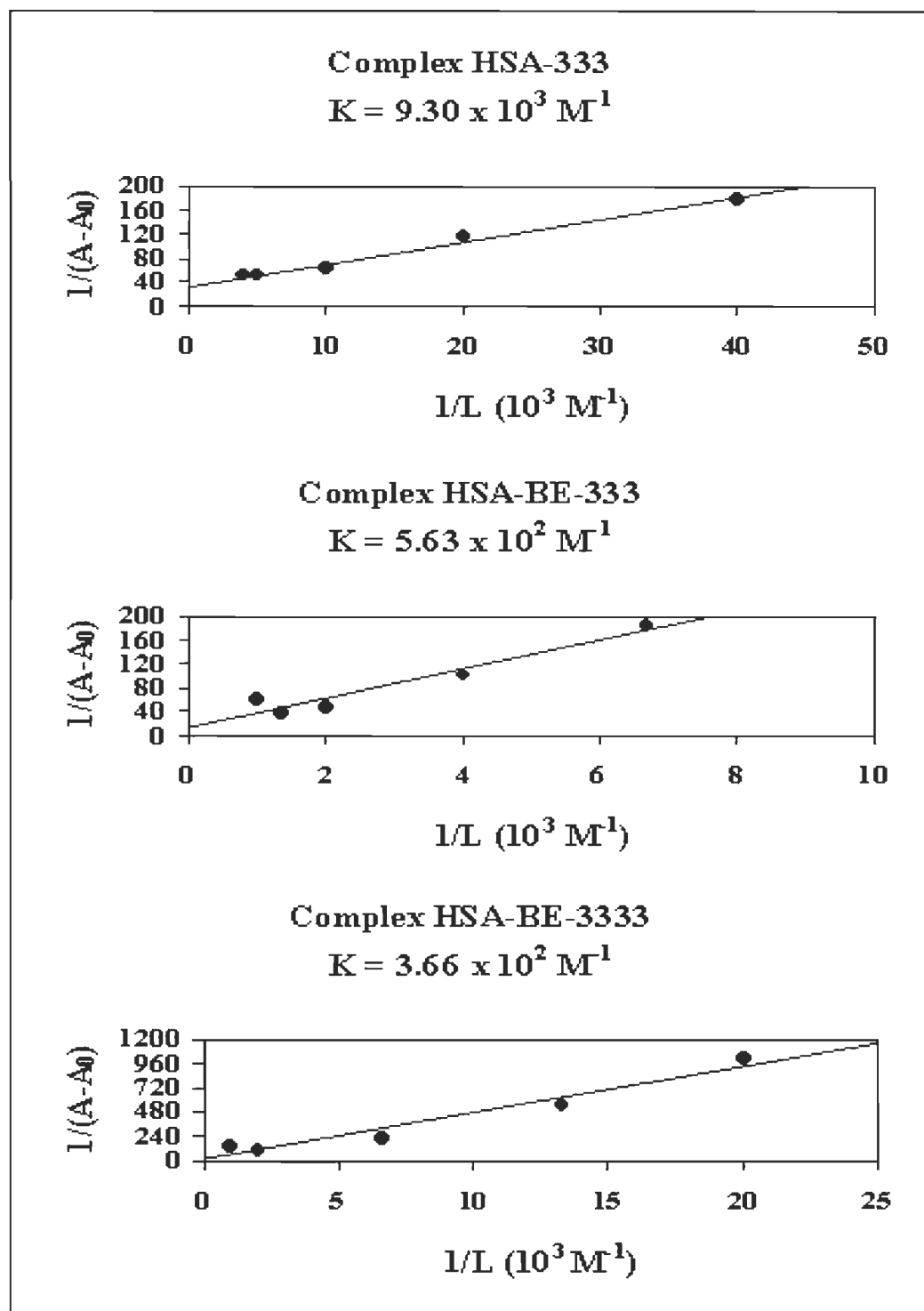


Figure 3.8



CHAPITRE IV
INTERACTION OF POLYAMINES WITH PROTEINS OF PHOTOSYSTEM II :
CATION BINDING AND PHOTOSYNTHETIC OXYGEN EVOLUTION

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en 2007 dans le journal *Journal of molecular structure* : Beauchemin, R., Harnois, J., Rouillon, R., Tajmir-Riahi, H.A., Carpentier, R., Interaction of polyamines with proteins of photosystem II : cation binding and photosynthetic oxygen evolution, vol. 833 : 169-174

4.1 Résumé

Les polyamines sont des cations organiques ayant diverses fonctions dans les processus physiologiques liés de près à la prolifération cellulaire et à la croissance. Les polyamines affectent également l'activité photosynthétique de dégagement d'oxygène et par conséquent, cette étude est désignée pour déterminer la nature de l'interaction des molécules cationiques de 1,3-diaminopropane, 1,4-diaminobutane (putrescine), et 1,5-diaminopentane (cadaverine) avec des protéines du PSII en utilisant des fractions membranaires enrichies de PSII avec des concentrations de diamine entre 0,01 et 20 mM. L'analyse par FTIR de spectres de différence par déconvolution et par résolution de la dérivée seconde, aussi bien que par procédure de lissage, a été utilisée pour déterminer le mode de liaison des diamines, le changement de conformation des protéines et les propriétés structurales des complexes diamine-protéine. Les résultats spectroscopiques démontrent que les diamines interagissent avec les protéines (via pont H) au niveau des groupes de polypeptides C=O sans perturber de façon majeure la structure secondaire des protéines. À faible concentration de diamine (0,01mM), aucune inhibition de l'activité du dégagement d'oxygène ne survient, alors qu'à forte concentration de diamine (5-10mM), 100% d'inhibition est observée. Les mesures d'induction de fluorescence dans les fractions membranaires de PSII démontrent que cette inhibition affecte principalement le complexe de dégagement d'oxygène du PSII. L'accroissement de la charge positive démontre des modifications majeures dans la structure secondaire des protéines du PSII lorsque l'on compare les effets des polyamines diaminopropane, putrescine et cadaverine, des cations organiques divalents, avec ceux des cations métalliques divalents, et ceux des polyamines spermine et spermidine, des cations organiques plurivalents.

Interaction of polyamines with proteins of photosystem II: cation binding and photosynthetic oxygen evolution

**R. Beauchemin^a, J. Harnois^a, R. Rouillon^b, H. A. Tajmir-Riahi^a
and R. Carpentier^a**

^aGroupe de Recherche en Biologie Végétale, Université du Québec à Trois-Rivières,
C.P. 500, Trois-Rivières, Qué. G9A 5H7, Canada

^bCentre de Phytopharmacie, Université de Perpignan, 52 Av. de Villeneuve 66860,
Perpignan, France

*Corresponding author: *E-mail* : Robert.Carpenteir@uqtr.ca *Fax*: (1) 819-376-5057.

Abbreviations: Chl, chlorophyll; DCBQ, 2,5-dichlorobenzoquinone; FTIR, Fourier transform infrared; OEC, oxygen evolving complex; PMSF, Phenylmethylsulfonylfluoride; PSII, photosystem II.

Key Words : polyamines; photosystem II; oxygen-evolution; protein secondary structure; FTIR spectroscopy.

4.2 Abstract

Polyamines are organic cations that function in diverse physiological processes that share as a common thread a close relationship to cell proliferation and growth. Polyamines also affect photosynthetic oxygen evolution and therefore, this study was designed to investigate the interaction of 1,3-diaminopropane, 1,4-diaminobutane (putrescine) and 1,5-diaminopentane (cadaverine) cations with proteins of photosystem II (PSII) using PSII-enriched submembrane fractions with diamine concentrations of 0.01 to 20 mM. Fourier transform infrared (FTIR) difference spectroscopy with its self-deconvolution and second derivative resolution enhancement as well as curve-fitting procedures were applied in order to determine the diamine binding mode, the protein conformational changes, and the structural properties of diamine-protein complexes. Spectroscopic evidence showed that diamines interact with proteins (H-bonding) through the polypeptides C=O groups with no major perturbations of the protein secondary structure. At very low diamine concentration (0.01 mM), no inhibition of the oxygen-evolution occurs, while at higher diamine content (5-10 mM), 100% inhibition was observed. Chloophyll fluorescence measurements demonstrated that the inhibition mainly affect the oxygen evolving complex of PSII. Comparisons of the effects of these dipositive organic cations with divalent metal cations on one hand and with polyvalent spermine and spermidine on the other hand, show major alterations of the protein secondary structure as positive charge increases.

4.3 Introduction

Polyamines are organic cations produced by the decarboxylation of basic amino acids [1]. Putrescine (Put), spermine (Spm), and spermidine (Spd) are widely distributed in bacteria, plants, and animals [2-4]. They occur in three different forms: (i) in the free form as cations, (ii) conjugated with small molecules such as phenolic acids, and (iii) bound to various macromolecules such as nucleic acids, phospholipids, and proteins. Polyamines function in diverse physiological processes that share as a common thread a close relationship to cell proliferation and growth. Their mechanism of action is based on their chemical properties as polycations and is possibly connected to their chemical and physical interactions with macromolecules [2]. The binding of polyamines to

biological molecules is considered to take part in regulation of basic processes in plants such as cell division, morphogenesis, stability, as well as responses to environmental and stress conditions [4]. Although some of their effects are similar to those of the inorganic cations Mg^{2+} and Ca^{2+} , polyamines can not be substituted by inorganic cations [5].

In recent years, several studies have been concentrated on the proposed positive effects of polyamines during photodevelopment, senescence, and various stress conditions [5-12]. While these investigations were concerned with the influence of polyamines on the structural organization and functional activity of thylakoid membranes in general, little attention has been focused on the exact cation binding mode and on the effects of polyamine interaction on the structural point of view. We have reported the interaction of spermine and spermidine with proteins of photosystem II (PSII) submembrane fractions in which the polyamines induced major protein secondary structural changes and inhibited photosynthetic oxygen evolution [13]. Similarly, the complexation of divalent $Hg(II)$, $Cd(II)$ and $Pb(II)$ cations with proteins of PSII also resulted into major protein conformational changes [14].

Here, we report the FTIR study of the interaction of 1,3-diaminopropane, 1,4-diaminobutane (putrescine), and 1,5-diaminopentane (cadaverine) cations with proteins of PSII submembrane fractions using diamine concentrations of 0.01 to 20 mM. The structure of the three diamines is presented in Fig. 4.1. The influence of the length of the carbon chain located between the end amino groups on the binding properties of the diamines was evaluated. Spectroscopic evidence regarding the diamine binding mode and the effects of cationic complexation on the protein secondary structure are provided. Furthermore, comparisons between the effects of polyamines and divalent metal ions on the protein secondary structure are made and the correlation with the effects of polycations on the photosynthetic activity of PSII is discussed.

4.4 Materials and methods

Isolation of PSII-enriched submembrane fractions from spinach leaves was carried out by a standard method with minor modifications [15]. Fresh leaves were

homogenized in a medium containing 50 mM Tricine-NaOH (pH 7.6), 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.4 M sorbitol, 6 mM ascorbate, and 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonylfluoride). The homogenate was filtered through 12 layers of cheesecloth and the filtrate was centrifuged for 5 min at 2000g. The pellet was suspended in the same buffer but without sorbitol and PMSF and then centrifuged under the same conditions. The resulting pellet was suspended in a buffer containing 20 mM Mes-NaOH (pH 6.5), 1.5 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, and 4% Triton X-100 with a chlorophyll (Chl) concentration of 1 mg/ml. After incubation for 20 min in the dark at ice-cold temperature with constant stirring, the mixture was centrifuged for 10 min at 3600g. The PSII submembrane fractions were collected from the supernatant by centrifugation for 30 min at 3600g and suspended in the same buffer (without Triton X-100) at a Chl concentration of 2 mg/ml. The Chl content was determined as reported [16].

Diamines were obtained from Sigma Chemical Co. and used as supplied. Diamine-PSII complexes were prepared by the addition of an appropriate amount of diamine solution to PSII submembrane fractions to obtain the desired concentrations of 0.01, 0.1, 1, 5, 10 and 20 mM diamine. 100 µl of each diamine-PSII complex solution was then transferred onto an AgBr window and air dried at room temperature under green light to form a uniform (hydrated) film.

The rate of oxygen evolution in the PSII submembrane fractions was measured at 22 °C, using a Clark-type electrode [17]. Continuous saturating white light was employed to illuminate the samples. The medium contained 20 mM MES-NaOH, 0.35 mM DCBQ (2,5-dichlorobenzoquinone) as PSII electron acceptor, 15 µg Chl/ml and the mentioned additives. In the absence of additive, the oxygen evolution rate (100%) was between 600 and 700 µmol O₂/mg Chl # h.

Fluorescence induction (FI) measurements were performed at room temperature using Plant Efficiency Analyser (Hansatech, King' Lynn, Norfolk, UK). The assay medium contained 400 mM sucrose, 20 mM MES-NaOH (pH 6.3), 15 mM NaCl, 10

mM MgCl_2 , 25 $\mu\text{g Chl ml}^{-1}$ and the specified concentrations of diamine. Dark-adapted samples were excited with saturating red actinic light (655 nm and intensity of 3000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) provided by light emitting diodes. As the fluorescence signal during the first 40 μs is ascribed for artifacts due to delay in response time of the instrument, these data were not included in analyses of FI traces. The signal at 40 μs is taken as F_0 , the initial fluorescence. Variable fluorescence, F_v (the difference between F_0 and the maximal fluorescence, F_m in dark adapted samples), was used to calculate the F_v/F_m and F_v/F_0 ratios.

The infrared spectra were recorded on a Perkin-Elmer spectrum 2000 Fourier transform infrared spectrometer equipped with an HgCdTe detector and a KBr beam splitter. The spectra were taken with a resolution of 2 cm^{-1} . The difference spectra [(PSII + diamine) - (PSII)] were generated, using the sharp band of Triton at 1285 cm^{-1} as external references [18]. This vibration exhibited no spectral changes (shifting or intensity variations) on diamine complex formation and is cancelled, upon spectral subtraction. The accuracy of this method of subtraction was tested by using several control samples of the same PSII and diamine concentrations, which resulted in a similar flat baseline formation. A similar absorption scale was used for the spectra of free PSII and their diamine complexes, as well as for the difference spectra produced here. This allowed us to obtain a meaningful spectral subtraction. The typical IR absorption form free diamine peaking at 1597 cm^{-1} was also subtracted when necessary. Such generated spectral differences were used in order to analyze the nature of diamine-protein interaction, in regard to different binding modes (such as protein C=O and C-N) as well as diamine-lipid and diamine-tyrosine complexation. The detail spectral manipulations and data treatments were given in our previous publications [13,14]. The spectra presented here were not smoothed.

The secondary structure of PSII proteins was determined from the shape of the amide I band at 1657 cm^{-1} [19-25]. Fourier self-deconvolution and second derivative resolution enhancement and curve-fitting procedures were applied to determine

quantitatively the protein conformation in both the uncomplexed PSII and their diamine complexes. The detailed spectral treatments and calculations of protein secondary structure were reported previously [22] and will not be described here. The spectral manipulations were performed with Spectra Calc program (Galactic Industries Co., Salem, NH).

4.5 Results and discussion

The infrared spectrum of uncomplexed (untreated) PSII submembrane fractions shows a strong and broad band at 3298 cm^{-1} , which is assigned to the polypeptide amide A (N-H stretching vibrations) [26]. The symmetric and antisymmetric C-H stretchings [26] of the peptide groups are observed as three sharp absorption bands at 2955, 2926 and 2870 cm^{-1} , in the spectrum of PSII submembrane fractions (spectrum not shown). The protein amide I band (polypeptides C=O stretchings [26]) is observed as a strong band at 1655 cm^{-1} , while a band with medium intensity at 1547 cm^{-1} is attributed to the amide II (C-N stretching and N-H bending modes) vibrations (Fig. 4.2). A weak absorption frequency at 1515 cm^{-1} is assigned to the tyrosine amino acid side-chain vibrations [27-29]. Lipid ester carbonyl stretching vibrations [30] are also observed as a band with medium intensity at 1735 cm^{-1} (Fig. 4.2).

Diamine-PSII interaction resulted in no major shifting of amide I, amide II, tyrosine, and lipid vibrational modes ($1740\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$). Hence, the difference spectra [(PSII + diamine) - (PSII)] were produced in order to measure the intensity variations of these vibrational frequencies in the presence of diamine cations.

At low concentration of 1,3-diaminopropane, putrescine and cadaverine (0.01 mM), a weak positive feature was observed at $1650\text{-}1661\text{ cm}^{-1}$, in the difference spectra [(PSII + diamine) - (PSII)], which is attributed to an increase in the intensity of the amide I band at 1655 cm^{-1} as a result of cation-protein interaction (H-bonding) through polypeptides C=O groups (Fig. 4.2, 0.01 mM). As diamine concentration increased, the

positive feature around 1650 cm^{-1} in the difference spectra gained intensity and a component at 1629 cm^{-1} also increased. Further, a new positive peak emerged at about $1568\text{-}1563\text{ cm}^{-1}$ (Fig. 4.2, 20 mM). The increase in the intensity of the amide I band is due to a major diamine interaction with the polypeptides C=O groups at high diamine concentration, while the presence of a positive feature at $1568\text{-}1563\text{ cm}^{-1}$ is related to modification of the amide II band (Fig. 4.2, 20 mM).

A quantitative secondary structure analysis of the uncomplexed proteins of PSII and its diamine complexes with various diamine concentrations is presented in Table 4.1. The untreated PSII proteins showed α -helix 51% ($1655\text{-}1658\text{ cm}^{-1}$), β -sheet 16% (1626 and 1690 cm^{-1}), turn 14% (1670 cm^{-1}), and random 19% (1640 cm^{-1}) (Table 4.1). No major protein secondary structural changes occurred upon diamine-PSII complex formation (Table 4.1). A minor reduction of the turn structure (14 -12%) in favor of β -sheet (10-14.50 %) is due to an increase of the protein ordered structure in the PSII submembrane fractions as the result of a minor structural stabilization in the presence of 1,3-diaminopropane, putrescine, or cadaverine (Table 4.1). This increase in β -sheet structures is observable as an increased IR absorbance at 1629 cm^{-1} in the difference spectrum measured in the presence of 20 mM diamines (Fig. 4.2). It is important to note that major secondary structural changes were reported upon spermine and spermidine cations complexation with proteins of PSII [13]. The major conformational changes were associated with the α -helix component (47% in the apo protein to 35-37% in polyamine-protein complexes) in favor of β -sheet structures (11% in the apo protein to 20-21% in polycation-protein complexes) [13]. The observed structural differences are related to the greater positive charges associated with spermine and spermidine cations with respect to the diamines used in this investigation. The greater positive charges result in stronger electrostatic cation-protein interaction, which induce larger perturbations of the protein secondary structure. However, the interaction of divalent cations such as Hg(II), Cd(II), and Pb(II) with proteins of PSII also induced major secondary structural alterations such as a decline of the α -helix structural component by 10-20% and an increase in β -sheet structures by 5-10% [14]. The larger

alterations of the protein secondary structure induced by divalent metal ions are due to the bigger charge/size distributions on metal cations (small ionic radius) with respect to 1,3-diaminopropane, putrescine, and cadaverine (large chains) in these dipositive cation-protein complexes.

At low diamine concentration (0.01 to 0.1 mM), there is no major effect of cation-protein complexation on the rate of oxygen evolution, whereas at higher diamine content (1 to 20 mM), major inhibition occurs with an optimal effect (100%) between 7.5 and 10 mM (Fig. 4.3 and Table 4.1). This is indicative of some degree of protein structural stabilization by diamines at low concentration, while major structural perturbations occur at high concentration. There was no significant difference between the actions of the three studied diamines irrespective of their different carbon chain length (Fig. 4.1). It is important to note that major inhibition of oxygen evolution was reported (55 to 74%) in the presence of spermine and spermidine even at low polyamine concentrations (0.1 to 1 mM) [13]. The major inhibition of the oxygen evolution induced by spermine and spermidine is related to greater positive charges, 3+ (spermidine) and 4+ (spermine), with respect to 2+ charges of the diamines used in the present investigation. These observations are also consistent with the larger induction kinetics of delayed fluorescence of thylakoid membranes observed for polyamines as cation charges increase with a similar cation concentration [7]. This can be attributed to the greater positive charge distribution on the spermine and spermidine cations with respect to 1,3-diaminopropane, putrescine, and cadaverine. The greater positive charge induces stronger electrostatic interaction with protein donor groups that results in local perturbations of protein structure.

The spectroscopic data presented here show that 1,3-diaminopropane, putrescine, and cadaverine bind proteins of PSII through nonspecific (H-binding) interaction *via* polypeptides C=O groups. This is in contrast with the covalent binding of putrescine and spermidine to thylakoid membrane proteins reported in isolated chloroplasts of *Helianthus tuberosus* where the enzyme transglutaminase is presumably involved [32]. The apo proteins of the PSII light-harvesting complex were proposed as substrates for

transglutaminase [33]. The non specific ionic interaction found here indicates that transglutaminase was either absent from the PSII preparation or it was inactive in the experimental conditions used.

The polypeptides D1 and D2 of the reaction center of PSII were shown to be stabilized against osmotic stress in oat leaves supplemented with polyamines [34] and similar results were obtained for the light-harvesting chlorophyll-binding proteins of PSII in barley leaves disks [12]. In contrast, major inhibition of oxygen evolution was observed in isolated PSII submembrane fractions. The interaction of diamines with PSII submembrane fractions did not induce significant protein conformational changes, but it was sufficient to strongly inhibit oxygen evolution. It is likely that the proteins affected by these polycations are either extrinsic polypeptides or portions of integral polypeptides protruding at the surface of the PSII membranes where they are accessible to polyamines interaction.

To further characterize the inhibitory effect, we have analyzed the Chl fluorescence properties of the photosystem II submembrane fractions. The results are shown in Fig. 4.4 for 1,3-diaminopropane, very similar data were obtained for the two other diamines (not shown). The initial fluorescence F_0 , observed with the reaction centers in open state, was not significantly influenced by the diamines. However, F_m , observed with the reaction centers in closed state, was greatly diminished in the similar concentration range as oxygen evolution. Thus, the maximal PSII photochemical quantum yield, F_v/F_m , where $F_v = F_m - F_0$, was also decreased. Calculation of F_v/F_0 , a parameter that simultaneously takes into account the variations in F_m and F_0 [35], provided similar traces as Fig. 4.4B (not shown). To gain more information on the Chl fluorescence induction properties of diamine-treated PSII, we analyzed the O-J-I-P induction traces. These traces illustrate the progressive reduction of the quinones located at the acceptor side of PSII with three main phases corresponding to O-J, J-I, and I-P [36,37]. In PSII submembrane fractions the J-I phase is very weak and only the two other phases are seen [38]. Such traces are shown in Fig. 4.4C. A typical transient was observed for the control experiment showing two well defined steps (Fig. 4.4C, trace 1).

As expected from the decreased F_v/F_m (Fig. 4.4B), Chl fluorescence intensity decreased as 1,3-diaminopropane concentration was raised and at 6 mM the induction was limited to a weakened O-J phase, further fluorescence rise being strongly inhibited. The decline in F_v/F_m together with the decreased amplitudes of the O-J and I-P phases of the induction indicates that in the presence of 1,3-diaminopropane, the OEC failed to provide electrons for PS II to reduce adequately the quinone acceptors of the photosystem thus decreasing the maximal fluorescence yield. More precisely, the first phase (O-J) was followed by a dip and then only a weak rise was observed for the remaining of the induction (Fig. 4.4C, trace 2). Traces similar to Fig. 4.4 (trace 2) were previously observed in PSII submembrane fractions and were shown to be indicative of a dismantled OEC [37]. This interpretation for diamine-treated PS II is supported by the action of the artificial electron donor diphenylcarbazide that reversed the inhibitory effect of diamines on Chl fluorescence (Fig. 4.4C, trace 3). This electron donor was able to provide electrons to PSII, though at a slower rate compared to a native OEC, with the resulting reduction of quinones. Diphenylcarbazide can donate electrons only when the extrinsic polypeptides associated with the OEC and the functional Mn_4Ca cluster responsible for water splitting are lost from the luminal side of PSII [39].

In conclusion, diamines were shown to interact with the polypeptides of PSII, ligating with C=O groups. Interaction with the extrinsic polypeptides associated with the OEC and with the Mn_4Ca cluster and/or surrounding amino acids was responsible for the strong inhibition of PSII activity. It is likely that the destabilisation of the OEC lead to strong inhibition of oxygen evolution with the resulting impairment of quinone reduction on the acceptor side of PSII. The inhibition was similar for the three polyamines used showing that the variation in the length of the carbon chain (from 3 to 5 carbon atoms) located between the end amino groups did not influence the ionic interaction with the membrane polypeptides.

4.6 Acknowledgments

The authors are indebted for the financial supports of Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

4.7 References

- [1] R.D. Slocum, H.E. Flores (Eds.), *The biochemistry and physiology of polyamines in plants*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1991, pp.23-40.
- [2] C. W. Tabour, H. Tabour, *Annu. Rev. Biochem.* 53 (1984) 749.
- [3] T.A. Smith, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36 (1985) 17.
- [4] T.A. Smith, G.R. Best, *Phytochemistry* 16 (1977) 841.
- [5] T.W. Kim, G. Heinrich, *Photosynthetica* 31 (1995) 315.
- [6] A. Beigbeder, M. Vavarakis, E. Navakoudis, K. Kotzabasis, *J. Photochem. Photobiol. B* 28 (1995) 235.
- [7] I.T. Iordanov, V. Goltsev, V. Doltchinkova, L. Kruleva, *Photosynthetica* 23 (1989) 314.
- [8] A. Beigbeder, K. Kotzabasis, *J. Photochem. Photobiol. B* 23 (1994) 201.
- [9] G. Szalai, T. Janda, T. Bartok, E. Paldi, *Physiol. Plant* 101 (1997) 434.
- [10] K. Kotzabasis, D. Dörnemann, *Z. Naturforsch* 53c (1998) 833.
- [11] K. Kotzabasis, B. Strasser, E. Navakoudis, H. Senger, D. Dörnemann, *J. Photochem Photobiol B* 50 (1999) 45.
- [12] J. Legocka, I. Zajchert, *Acta Physiol. Plant* 21 (1999) 127.
- [13] A. Bograh, Y. Gingras, H.A. Tajmir-Riahi, R. Carpentier, *FEBS Lett.* 402 (1997) 41.
- [14] S. Nahar, H.A. Tajmir-Riahi, *J. Colloid Interf. Sci* 178 (1996) 648.
- [15] D.A. Berthold, G.T. Babcock, C.F. Yocum, *FEBS Lett.* 134 (1981) 231.
- [16] R.J. Porra, W.A. Thompson, F.E. Kriedemann, *Biochim. Biophys. Acta* 975 (1989) 384.
- [17] R. Carpentier, B. Larue, R.M. Leblanc, *Arch. Biochem. Biophys.* 228 (1984) 534.
- [18] A. Bograh, R. Carpentier, H.A. Tajmir-Riahi, *J. Colloid Interface Sci.* 210 (1999) 118.
- [19] D.M. Byler, J. Susi, *Biopolymers* 25 (1986) 469.
- [20] J.K. Kauppinen, D.J. Moffat, D.G. Cameron, H.H. Mantsch, *Appl. Opt.* 20 (1981) 1866.
- [21] S. Nahar, H.A. Tajmir-Riahi, R. Carpentier, *J. Mol. Struct.* 328 (1994) 115.
- [22] A. Ahmed, H.A. Tajmir-Riahi, R. Carpentier, *FEBS Lett.* 363 (1995) 65.

- [23] G. Vandenbussche, A. Celercs, T. Curstedt, J. Johansson, H. Jorvall, J.M. Ruysshaert, *Eur. J. Biochem.* 203 (1992) 201.
- [24] E. Goomaghtigh, V. Cabiaux, J.M. Ruysshaert, *Eur. J. Biochem.* 193 (1990) 409.
- [25] W.Z. He, W.R. Newell, P.I. Haris, D. Chapman, J. Barber, *Biochemistry* 30 (1991) 4552.
- [26] S. Krimm, J. Bandekar, *Adv. Protein Chem.* 38 (1986) 181.
- [27] G.M. MacDonald, B.A. Barry, *Biochemistry* 31 (1992) 9848.
- [28] H. Fabian, C. Schultz, J. Backmann, U. Hahn, W. Saenger, H.H. Mantsch, D. Naumann, *Biochemistry* 33 (1994) 10725.
- [29] T. Noguchi, T.A. Ono, Y. Inoue, *Biochemistry* 31 (1992) 5953.
- [30] M. Jackson, H.H. Mantsch, *Spectrochim. Acta Rev.* 15 (1993) 53.
- [31] D. Lin-Ven, N.B. Colthup, W.G. Fateley, J.G. Grasselli, *The handbook of infrared and raman characteristic frequencies of organic molecules*, Academic Press, New York, NY, 1991, pp.372-373.
- [32] S. Del Duca, S. Benitati, D. Serafini-Fracassini, *Biochem. J.* 305 (1995) 233.
- [33] S. Del Luca, V. Tidu, R. Bassi, C. Esposito, D. Serafini-Fracassini, *Planta* 193 (1994) 283.
- [34] R.D. Besford, C.M. Richardson, J.L. Campos, A.F. Tiburcio, *Planta* 189 (1993) 201.
- [35] F. Babani, H.K. Lichenthaler, *J. Plant Physiol.* 148 (1996) 555.
- [36] D. Lazár, *Func. Plant Biol.* 33 (2006) 9.
- [37] X.-G. Zhu, Govindjee, N.R. Baker, E. deSturler, S.P. Long, *Planta* 223 (2005) 114.
- [38] P. Pospíšil, H. Dau, *Photosynth. Res.* 65 (2000) 41.
- [39] M.L. Ghirardi, T.W. Lutton, M. Seibert, *Biochemistry* 35 (1996) 1820.

4.8 Figure captions

Fig. 4.1 Structure of the diamines (1,3-diaminopropane, putrescine, and cadaverine)

Fig. 4.2 FTIR spectra (top curve) and difference spectra [(PSII + diamine) - (PSII)] (bottom six curves) of uncomplexed PSII and its 1,3-diaminopropane, putrescine, and cadaverine complexes in the region of 1800-1500 cm^{-1} with two diamine concentrations. The FTIR spectrum of diaminopropane alone is also given for comparison, cadaverine and putrescine have similar spectral properties consistent with a major IR absorption around 1600 cm^{-1} also found for propylamine and tert-butylamine [31].

Fig. 4.3 The inhibitory effects of cadaverine (trace 1), 1,3-diaminopropane (trace 2), and putrescine (trace 3), on the rate of photosynthetic oxygen evolution in PSII submembrane fractions.

Fig. 4.4 Effect of increasing diaminopropane concentration in PS II submembrane fractions on the Chl fluorescence parameters (A) F_m , F_0 and (B) F_v/F_m , and (C) Chl *a* fluorescence induction: trace 1, control; trace 2, 6 mM 1,3-diaminopropane; trace 3, 6 mM diaminopropane together with 1 mM diphenylcarbazide.

Table 4.1 Secondary structure determination of PSII proteins in the presence of diamines (cadaverine, 1,3-diaminopropane, putrescine), and inhibition of oxygen evolution in PSII at various diamine concentrations

Amide I (cm ⁻¹)	Conformation	% of conformation cadaverine (mM)					
		0	0.1	1	5	10	20
1655-1658	α -helix	51	50	50	49	49	49
1626-1640	β -sheet	11	11	12	13	14	15
1641-1648	random	19	19	19	19	19	19
1670-1678	turn	14	15	14	14	13	12
1685-1691	β -antiparallel	5	5	5	5	5	5
% of inhibition		-	1	22	72	94	100
Amide I (cm ⁻¹)	Conformation	% of conformation 1,3-diaminopropane (mM)					
		0	0.1	1	5	10	20
1655-1658	α -helix	51	50	50	50	50	50
1626-1640	β -sheet	11	10	11	12	12	13
1641-1648	random	19	21	20	20	19	19
1670-1678	turn	14	14	14	13	13	13
1685-1691	β -antiparallel	5	5	5	5	6	5
% of inhibition		-	0	32	74	100	100
Amide I (cm ⁻¹)	Conformation	% of conformation putrescine (mM)					
		0	0.1	1	5	10	20
1655-1658	α -helix	51	51	51	50	49	49
1626-1640	β -sheet	11	10	10	12	14	15
1641-1648	random	19	20	20	19	19	19
1670-1678	turn	14	14	14	14	12	12
1685-1691	β -antiparallel	5	5	5	5	6	5
% of inhibition		-	1	17	100	100	100

Figure 4.1

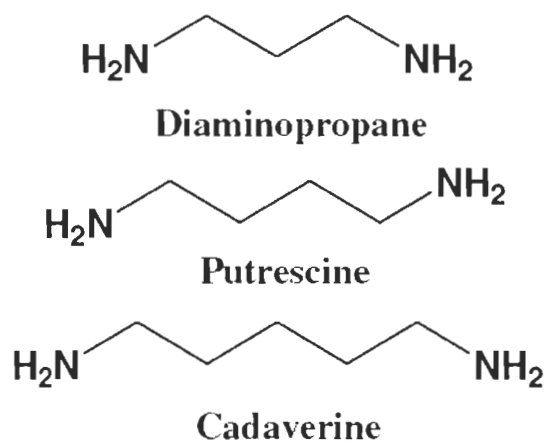


Figure 4.2

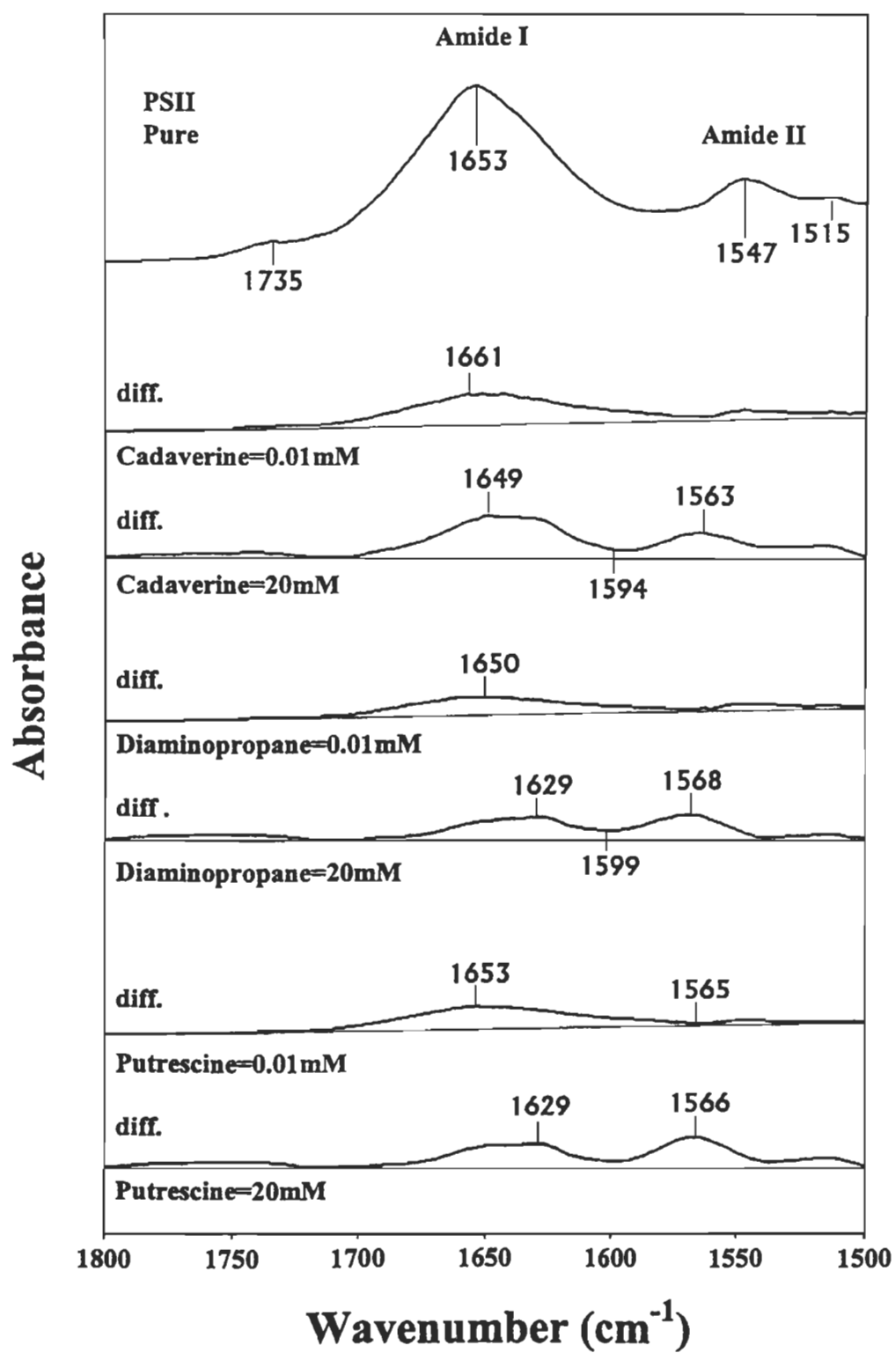


Figure 4.3

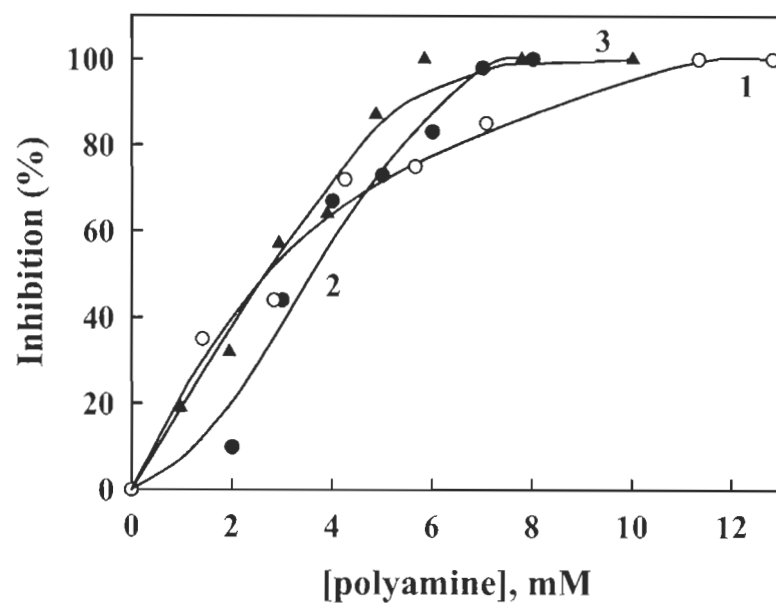
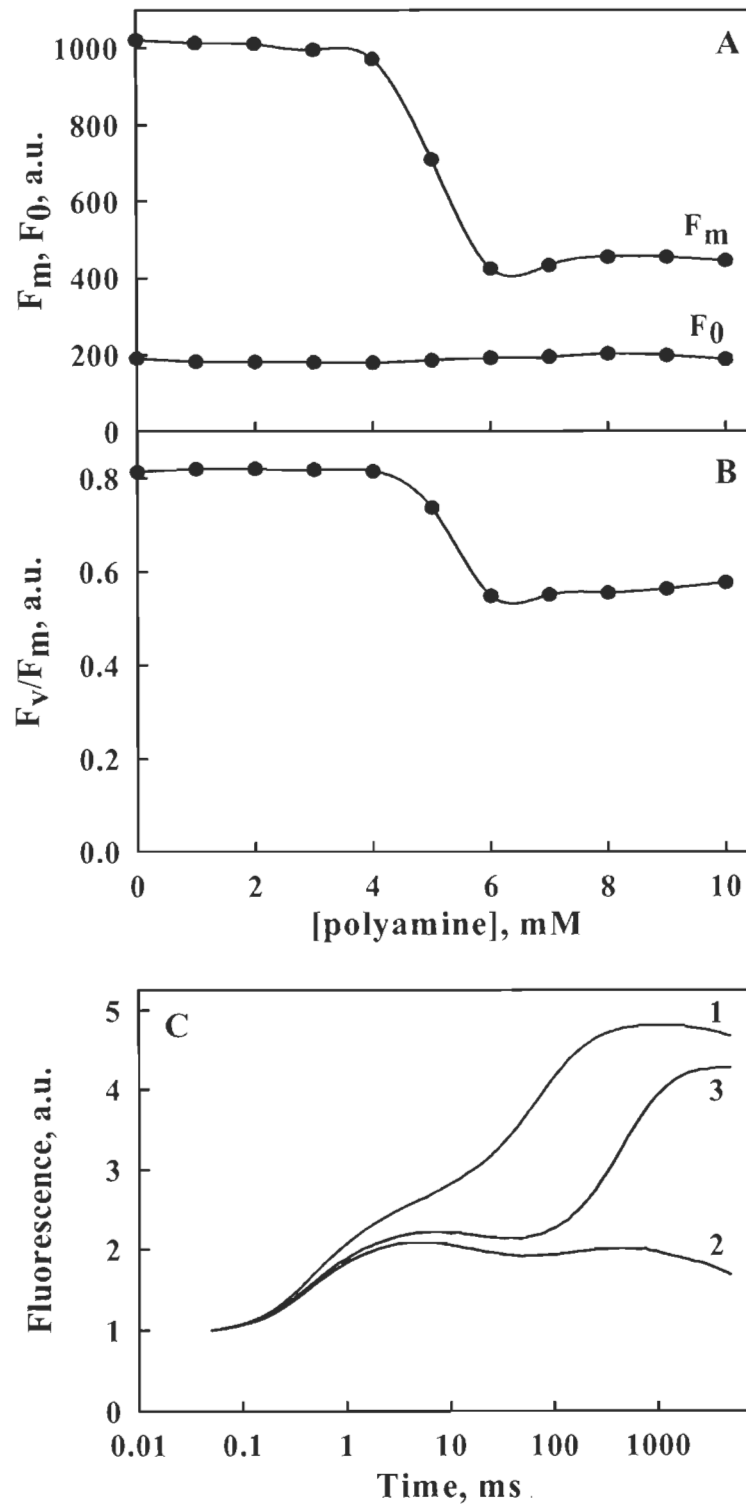


Figure 4.4



CHAPITRE V
SPERMINE AND SPERMIDINE INHIBITION OF PHOTOSYSTEM II :
DISASSEMBLY OF THE OXYGEN EVOLVING COMPLEX AND
CONSEQUENT PERTURBATION IN ELECTRON DONATION
FROM TYR_Z TO P680⁺ AND THE QUINONE ACCEPTORS Q_A⁻ TO Q_B

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en 2007 dans le journal *Biochimica et Biophysica Acta* : Rémy Beauchemin, Alain Gauthier, Johanne Harnois, Steve Boisvert, Sridharan Govindachary, Robert Carpentier, Spermine and spermidine inhibition of photosystem II : cation disassembly of the oxygen evolving complex and consequent perturbation in electron donation, vol. 1767 : 905-912

5.1 Résumé

Les polyamines sont impliquées dans la croissance des plantes et dans la réponse de la plante aux stress. Toutefois, les polyamines spermine et spermidine ont démontré un effet d'inhibition marqué sur des fractions membranaires de PSII. Le mécanisme d'action de cette inhibition est donc étudié en détail. L'inhibition du transport d'électrons dans les fractions membranaires purifiées de PSII traitées avec des concentrations de spermine et de spermidine dans l'ordre du millimolaire conduit à un déclin de la réduction du pool de plastoquinones, lequel effet est renversé avec le donneur d'électrons artificiel nommé diphénylcarbazine. L'inhibition observée provient de la perte des polypeptides extrinsèques associés au complexe de dégagement d'oxygène. Les mesures de thermoluminescence révèlent que les recombinaisons de charges entre les quinones accepteurs du PSII, Q_A et Q_B , et l'état S2 du complexe de manganèse sont abolies. L'affaiblissement à la noirceur du signal de fluorescence de la chlorophylle après un simple flash actinique blanc est grandement retardé indiquant un taux plus faible au niveau de la réoxydation de Q_A^- .

Spermine and spermidine inhibition of photosystem II: disassembly of the oxygen evolving complex and consequent perturbation in electron donation from Tyr_Z to P680⁺ and the quinone acceptors Q_A⁻ to Q_B

Rémy Beauchemin, Alain Gauthier, Johanne Harnois, Steve Boisvert,

Sridharan Govindachary and Robert Carpentier

*Groupe de recherche en Biologie Végétale, Université du Québec à Trois-Rivières,
CP 500, Trois-Rivières (Québec) Canada G9A 5H7*

Corresponding author:

Professor Robert Carpentier

Phone: +1-819-376-5011 Fax: +1-819-376-5057

E-mail address: Robert.Carpentier@uqtr.ca

Key words: Electron transport; Photosystem II; Oxygen evolution; Fluorescence; Extrinsic polypeptides; Polyamines

Abbreviations: Chl, chlorophyll; DCMU, 3-(3',4'-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea; F₀, basal level of chlorophyll fluorescence; F_m, maximal level of chlorophyll fluorescence; F_v, variable fluorescence; OEC, oxygen evolving complex; P680, primary electron donor of photosystem II; PS, photosystem; Q_A and Q_B, primary and secondary quinone acceptors of photosystem II; T_m, temperature of maximal thermoluminescence emission

5.2 Abstract

Polyamines are implicated in plant growth and stress response. However, the polyamines spermine and spermidine were shown to elicit strong inhibitory effects in photosystem II (PSII) submembrane fractions. We have studied the mechanism of this inhibitory action in detail. The inhibition of electron transport in PSII submembrane fractions treated with millimolar concentrations of spermine or spermidine led to the decline of plastoquinone reduction, which was reversed by the artificial electron donor diphenylcarbazide. The above inhibition was due to the loss of the extrinsic polypeptides associated with the oxygen evolving complex. Thermoluminescence measurements revealed that charge recombination between the quinone acceptors of PSII, Q_A and Q_B , and the S_2 state of the Mn-cluster was abolished. Also, the dark decay of chlorophyll fluorescence after a single turn-over white flash was greatly retarded indicating a slower rate of Q_A^- reoxidation.

5.3 Introduction

Polyamines are organic cations widely distributed in bacteria, plants, and animals. They are considered to take part in the regulation of basic processes in plants such as cell division, morphogenesis, stability, as well as responses to environmental and other stress conditions [1]. Polyamines such as putrescine, spermine, and spermidine were shown to be of importance for chloroplast development [2]. They play a major role in protecting thylakoid membrane integrity during senescence and various environmental stress conditions such as chilling, osmotic, UV-B, and photoinhibitory stress [3-7]. Hence, the amount and/or ratio of various polyamines may strongly vary

during stress adaptation. For example, an increase of up to 300-900 % in spermine and spermidine levels was observed in tobacco plants exposed to UV-B irradiation [8]. Also, it was shown that over expression of spermidine synthase in *Arabidopsis* mutants improves tolerance to several stress conditions [9].

Treatment of intact leaves or isolated photosynthetic membranes with exogenous polyamines is usually beneficial for membrane integrity. For example, spermine could prevent lipid peroxidation of thylakoid membranes thus retaining their structural integrity [10]. The release of the manganese stabilizing protein (33 kDa, extrinsic polypeptide) of PSII, plastocyanin, and cytochrome *f* from thylakoid membranes caused by treatments with palmitoleic acid seems to be prevented by spermidine [11].

Polyamines are protonated at physiological pH and thus contain charged amino groups [12]. Due to their delocalized positive charges, they can form electrostatic links with protein, phospholipids, and nucleic acids [13]. In chloroplasts, polyamines also bind covalently to proteins through an enzymatic process that involves a plastidic transglutaminase [14,15]. The chloroplastic transglutaminase is calcium- and light-dependent being almost non functional in the dark [5,14]. Apoproteins of the light-harvesting chlorophyll *a/b* complexes of PSII were proposed as substrates for the transglutaminase reaction [16]. Spermine is the most efficiently conjugated polyamine to bind to isolated light harvesting complex proteins of PSII [14]. Native thylakoid membranes were also found to contain various concentrations of the three main polyamines, putrescine, spermine, and spermidine. Putrescine enrichment was observed

in the antenna complexes of PSII, while spermine accumulates in the PSII reaction center complex [17].

Even though the influence of polyamines in plants and chloroplast were shown to be beneficial in nature, it was reported that interaction of spermine and spermidine with isolated PSII submembrane fractions elicited a strong inhibition of oxygen evolution [18]. However, the mechanism of inhibitory action of polyamines in PSII was not studied previously. Because the polyamine level in leaves can increase considerably under stress conditions, it is important to understand the different modes of action of these cations within the photosynthetic apparatus. In the present work, the interaction of spermine and spermidine with the oxygen evolving complex (OEC) of PSII is analysed in detail. With polyamines, extrinsic polypeptides were released and the Mn_4Cl complex was dysfunctional. Consequently, the electron transport on both donor and acceptor sides of PSII was strongly affected.

5.4 Materials and methods

5.4.1 Isolation of photosystem II submembrane fractions

PSII submembrane fractions were isolated from spinach (*Spinacea oleracea* L.) according to Berthold et al. [19] with the modification described elsewhere [20]. The PSII preparations were finally suspended in 400 mM sucrose and 20 mM MES-NaOH (pH 6.3) and were stored at - 80° C until use.

5.4.2 Oxygen evolution

Oxygen evolution was measured at 22° C using Oxylab system (Hansatech Instruments, Norfolk, England). The assay medium contained 400 mM sucrose, 20 mM MES-NaOH (pH 6.3), 1 mM NaCl, 0.5 mM MgCl₂, 0.35 mM 2,6-dichlorobenzoquinone as PSII electron acceptor, 5 µg Chl ml⁻¹ and the specified concentrations of polyamine. The control oxygen evolution rates were 700-800 µmol O₂ mg·Chl⁻¹ h⁻¹.

5.4.3 Fluorescence induction

Fluorescence induction (FI) measurements were performed at room temperature using Plant Efficiency Analyser (Hansatech, King' Lynn, Norfolk, UK). The assay medium contained 400 mM sucrose, 20 mM MES-NaOH (pH 6.3), 15 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 25 µg Chl ml⁻¹ and the specified concentrations of polyamine. Dark-adapted samples were excited with saturating red actinic light (655 nm and an intensity of 3000 µmol m⁻² s⁻¹) provided by light emitting diodes. 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. The signal at 40 µs is taken as F_0 , the initial fluorescence. Variable fluorescence, F_v (the difference between F_0 and the maximal fluorescence, F_m in dark adapted samples), was used to calculate the F_v/F_m and F_v/F_0 ratios.

5.4.4 Thermoluminescence

Thermoluminescence measurements were carried out with a laboratory built equipment described in details elsewhere [21,22]. Photosystem II submembrane

fractions ($25 \mu\text{g Chl ml}^{-1}$) were used in a medium containing 50 mM Tricine-NaOH (pH 7.8), 400 mM sorbitol, 10 mM KCl, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 and the specified concentrations of polyamine. About 200 μL of the diluted suspension was added to the sample well (15 mm diameter) positioned just above a Peltier plate. All measurements were performed in the dark. Dark-adapted samples were incubated for 120 s at 20°C . Following this step, temperature was brought down to 0°C within 5-10 s and kept for 60 s. This incubation temperature was selected in order to avoid freezing induced damages to the OEC that usually gives rise to artifacts [21]. A probing single turn over saturating white flash of about 1- μs width (setting 10) from XE-ST Pump Flash unit (Walz, Effeltrich, Germany) was applied to initiate charge separation in PSII. During the last step of the measurements, linear warming of samples in total darkness activated the recombination of PSII charge pairs that can be detected by the appearance of emission bands with characteristic temperature optima. The data were analyzed using ThermoLite, a software developed in our laboratory for the purpose of working with Windows OS [22]. This software is an up-graded version of the original one [22,23].

5.4.5 Flash-induced fluorescence decay kinetics

In order to detect the reduction and oxidation kinetics of Q_A , Chl fluorescence rise and its relaxation in the dark were measured with a pulse amplitude double modulated fluorometer (PAM, Walz, Effeltrich, Germany) as described previously [24,25]. PSII submembrane fractions (Chl concentration of $25 \mu\text{g/mL}$) were incubated for 3 min at room temperature in complete darkness without or with polyamines before initiating the fluorescence measurements. Reduction of Q_A was obtained using a single

turn over saturating flash generated from the XST 103 flash lamp (Walz, Effeltrich, Germany). The flash reached its maximum intensity within 8 μ s and decayed completely within 50 μ s. Since the actual fluorescence signal stabilized 100 μ s after the flash was applied, the data pertaining to this time-period was not used for the analyses of Q_A^- oxidation kinetics. The fluorescence signal was collected with the PDA 100 data acquisition system through WinControl software (Walz, Effeltrich, Germany) using a 20 μ s/data point window with measuring light modulated at 100 kHz. The duration of the measuring time with the weak modulated light at a frequency of 1.6 kHz and the measuring light modulated at 100 kHz was less than 290 ms. The signal to noise ratio was improved by measuring the Chl fluorescence rise and its decay in the dark from nine independent samples of the same preparation. The traces were averaged with WinControl software to estimate the half-times and amplitudes of the fluorescence decay components using the following three-exponential function:

$$F(t) - F' = A_1 e^{-k_1 t} + A_2 e^{-k_2 t} + A_3 e^{-k_3 t}$$

where $F(t)$ is the fluorescence value at time t , k_n is the rate constant, A_n is the amplitude of the fluorescence relaxation phases, and F' is the stable minimal fluorescence at the end of the decay. The fluorescence decay curves from control samples could not be fit with a bi-exponential function.

5.4.6 Polyacrylamide gel electrophoresis

To determine the polypeptides released by the polyamines, the PSII preparations were incubated 5 min in the dark at room temperature in the presence of spermine or spermidine and harvested immediately after treatment by a 5-min centrifugation (12,400

rpm) in an Eppendorf microcentrifuge. The pellets were washed twice in 400 mM sucrose, 20 mM MES-NaOH (pH 6.2) and were used for polypeptide analysis. The first supernatants were further centrifuged (12,400 rpm for 5 min) to remove remaining membrane fragments. Tris-alkali extraction of the 17, 23 and 33 kDa polypeptides was carried out following the standard procedure of Nakatani [26]. The supernatants of the polyamine or Tris-alkali treated PSII submembranes were concentrated against sucrose using Spectra/Por molecularporous membranes (Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA, USA) before analysis by polyacrylamide gel electrophoresis. The latter was performed at room temperature using miniature slab gels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) containing 13% acrylamide and 6 M urea. The gels were stained with Coomassie brilliant blue and the polypeptide content was analysed with the Gel-Doc 2000 system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

5.4.7 Manganese determination

The manganese content was determined in both pellet and supernatant fractions of spermidine and spermine-treated PSII using Analyst 100 Atomic Absorption Spectrophotometer (Perkin Elmer, Wellesley, Massachusetts, USA) as described previously [27].

5.5 Results

The polyamines spermine and spermidine added to isolated PSII submembrane fractions strongly inhibited oxygen evolution. Sub-millimolar concentrations above 0.5 mM of spermidine or spermine already caused measurable inhibition of electron

transport with 2,6-dichlorobenzoquinone as an electron acceptor (Fig. 5.1). About 50% of the oxygen evolution was lost with 2 mM spermidine or spermine. This inhibition by polyamines was studied in detail using various techniques in order to establish the site of polyamine action as described below. A similar inhibition was observed with whole thylakoid membranes. However, we have used PSII submembrane fractions that represent a more simple and specific system without interference from other components of the thylakoid membrane.

The Chl fluorescence parameters F_m (the maximal fluorescence observed in dark-adapted samples exposed to saturating red-light illumination) and F_0 (the initial fluorescence level) were measured in PSII submembrane fractions treated with various polyamine concentrations. F_0 was not affected but F_m greatly declined (data not shown). This decline in F_m observed above 1 mM of spermidine corresponded with a decrease in F_v/F_0 (Fig. 5.2A), a parameter that accounts for the simultaneous variations in F_m and F_0 in determinations of the maximum quantum yields of PSII [28]. Importantly, a steep decrease in F_v/F_0 ratio observed with 1-3 mM spermidine correlated with the inhibition of oxygen evolution illustrated in Fig. 5.1.

The Chl fluorescence properties of PSII submembrane fractions in the presence of polyamines were further subjected to the comprehensive analysis of fluorescence induction (FI) kinetics (Fig. 5.2B and C). The FI traces illustrate the progressive reduction of the quinones located at the acceptor side of PSII with three main phases named O-J, J-I, and I-P [29,30]. The induction traces of PSII submembrane fractions

contained only two well defined phases (Fig. 5.2B and C, trace 1) because the J-I phase is negligible in these preparations [31,32]. The first phase (O-J) reflects the reduction of the primary quinone acceptor of PSII, Q_A , and the second phase (I-P, here J-P) is ascribed for the reduction of the plastoquinone pool together with reduction of the secondary quinone acceptor Q_B . Upon treatment with 3 mM spermidine, the FI was greatly damped (Fig. 5.2B, trace 2), showing that the OEC failed to provide electrons for PSII to reduce the quinone acceptors.

The artificial electron donor diphenylcarbazide restored the kinetics of Chl fluorescence in polyamine-treated samples (Fig. 5.2B, traces 2 and 3). This electron donor provided electrons to PSII, though at a slower rate compared to a native OEC. As a result, the reduction of quinones was partially restored as shown by the recovery of FI. Diphenylcarbazide can donate electrons only when extrinsic polypeptides associated with the OEC are lost from the luminal side of PSII and the Mn_4Ca complex necessary for water splitting becomes dysfunctional [33]. The positive action of diphenylcarbazide thus indicates strong perturbations of the OEC in the presence of polyamines.

In Fig. 5.2C, the FI traces are normalized at both minimal and maximal values (V_i curves). A faster rise of fluorescence observed in the V_i curves of PSII submembrane fractions incubated with 4 or 7 mM spermidine (Fig. 5.2C, traces 3 and 4) might be explained by a delayed rate of Q_A^- re-oxidation by Q_B caused by polyamines.

To clarify the extent of the polyamine action on the OEC, polyacrylamide gels were run with PSII submembrane fractions treated with both polyamines. PSII submembrane fractions were incubated for 5 min with polyamines and then centrifuged to separate the submembrane fractions from the polypeptides that were released in the supernatants as described in Materials and methods. The polypeptide profiles are shown in Fig. 5.3 (upper panel) for spermidine. Similar data were observed for PSII submembrane fractions incubated with spermine (results not shown). The polypeptides in the spermidine-treated PSII submembrane fractions are shown in lane 3. Notably, three polypeptides were lost at the position that corresponded to the well known extrinsic polypeptides of apparent molecular weight of 17, 23, and 33 kDa associated with the OEC [34] as shown in native PSII preparations. The polypeptide profile of the supernatant obtained from the spermidine-treated samples further confirms the release of these polypeptides (Fig. 5.3, lane 4). About 50% of 33 kDa polypeptide was lost when PSII membranes (100 $\mu\text{g/mL}$) were treated with 8 mM spermidine (Fig. 5.3, lower panel) that corresponds to 2 mM spermidine used for oxygen evolution measurements (25 $\mu\text{g Chl/mL}$). The above illustrates the correlation between the release of extrinsic proteins and the loss of oxygen evolution presented in Fig. 5.1. We also submitted the PSII submembrane fractions to Tris-alkali treatment that specifically releases these extrinsic polypeptides. Note that the Tris-alkali treated PSII supernatant fractions contained the polypeptides (Fig. 5.3, lane 5) of migrating distances coinciding with the ones shown in the supernatant fractions of PSII incubated with polyamines (Fig. 5.3, lane 4). Also, the bands representing these polypeptides were only faintly seen in the

protein profile of the pellets of PSII membrane fractions subjected to Tris-alkali treatment (Fig. 5.3, lane 6).

Thermoluminescence was used to characterize the charge recombination processes in the presence of polyamines. To initiate charge separation, PSII submembrane fractions were pre-illuminated at 0°C with a 1-μs single turn-over white flash. The results obtained with spermine are presented in Fig. 5.4. Experiments with spermidine provided the same results (data not shown). With a linear increase in temperature at the rate of 0.5°C/s, the amplitude of the thermoluminescence signal rapidly increased to attain its maximum (T_m) at 25°C in control samples (Fig. 5.4A, trace 1). This major emission band corresponds to the B-band attributable to charge recombination between Q_B^- and the oxidized Mn-cluster predominantly in the S_2 -state [35]. The T_m of the B-band seen in non-frozen control PSII samples is consistent with the peaking temperatures for the same preparations shown previously [36]. This band was progressively abolished as the concentration of spermine was raised (Fig. 5.4, traces 2-5). Also, this was accompanied by a small shift of the T_m toward higher temperatures. With 10 mM spermine, the B-band was totally suppressed. The changes in the amplitude and T_m of the B-band could be related to changes in the hole properties of the S_n state of the Mn-cluster or to the inhibition of Q_B reduction in the presence of polyamines.

In order to segregate the effects of polyamines on the two-electron gate involving Q_B/Q_B^- couple, the inhibitor DCMU was used to prevent electron transfer between Q_A^- and Q_B . With DCMU, a major luminescent band with T_m of 18°C was observed (Fig.

5.4B, trace 1) as shown previously [36]. This luminescent band is the Q-band that arises due to the back-flow of electrons from Q_A^- to the S_2 -state. The peaking temperature of Q-band is somewhat higher at the concentration of Chl (25 $\mu\text{g Chl/mL}$) used. A T_m of 5-10 $^{\circ}\text{C}$ for Q-band in control PSII samples could be seen only when the assay medium contained $\sim 200 \mu\text{g Chl/mL}$ as indicated in several reports. The Q-band was shifted to higher temperatures in the presence of polyamines. A minor band, the C-band, also appeared at about 50 $^{\circ}\text{C}$ in the glow curves of the control samples (Fig. 5.4B, trace 1). This emission band originates from the recombination between Q_A^- and oxidized Tyr_D . The amplitude of these two bands also declined with polyamines. Also, the progressive loss of thermoluminescence intensity observed with increasing polyamine concentration was very similar for both B- and Q-bands (see inset of Fig. 5.4B). Thus, the strong inhibitory effect of polyamines on charge recombination was mainly due to the loss of the donor side partners for the above radiative recombination pathways.

The fluorescence induction traces indicated that the reoxidation of Q_A^- was retarded to some extent in the presence of polyamines (Fig. 5.2C). This possibility was verified using the fluorescence properties of PSII submembrane fractions submitted to a single turn over flash. Typical fluorescence decay kinetics is shown on a logarithmic scale in Fig. 5.5. The fluorescence rise induced by the flash is due to the reduction of Q_A and the decay ensured in the dark is related to the reoxidation of Q_A^- . The total amplitude of the fluorescence rise greatly declined as spermine concentration increased. Also, the fluorescence decay in the dark was slower as mentioned below. The dark decay of fluorescence in control samples was modeled with a three-exponential function.

The amplitude and half-time of each component are shown in Table 5.1. The fast component with a half-time of ~ 0.66 ms is attributed to the reoxidation of Q_A^- by Q_B . The middle phase with a half-time of ~ 9.49 ms is ascribed for the reoxidation of Q_A^- in PSII centers with an empty Q_B pocket where the diffusion time of PQ to its binding site should be considered. The slow phase is attributed to the constant background fluorescence as a shorter time of ~ 290 ms was used for decay measurements. The half-times of the fast component greatly increased in PSII submembrane fractions incubated with 1 mM spermine. With higher spermine concentration, the fast component was completely lost (Table 5.1). The above confirms that Q_A^- reoxidation was much slower in polyamine-treated samples as the electron transfer between Q_A^- and Q_B was highly retarded.

6.6 Discussion

The data presented here clearly demonstrate a strong inhibition of electron transport in isolated PSII submembrane fractions by millimolar range of the polyamines, spermine and spermidine. The polyamine putrescine, a dication, was shown to enhance PSII electron transport in a manner similar to Mg^{2+} in low salt chloroplast membranes due to its coulombic effect [37]. However, this type of cationic effect was avoided by the use of physiological cation concentrations in our experiments [37]. The polyamines strongly interacted with the luminal side of the photosystem causing the release of the three extrinsic polypeptides of 17, 23 and 33 kDa associated with the OEC (Fig. 5.3). At physiological pH, these polycations are protonated with 4 positive charges for spermine and 3 positive charges for spermidine. Studies using Fourier transform infrared

difference spectroscopy have shown that their binding to PSII proteins causes significant alteration of the protein secondary structure [18]. Such changes could have produced the release of the extrinsic polypeptides. Several divalent cations such as Cu^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} , and Pb^{2+} , were also shown to release the extrinsic polypeptides of PSII to various extents [38-41] and therefore polyamines may act similarly in that respect. The inhibitory action of polyamines was also observed in whole thylakoid membranes (results not shown) demonstrating that the polyamines could diffuse into the thylakoid lumen as previously discussed for putrescine [37].

The two extrinsic polypeptides of 17 and 23 kDa modulate the affinity of the Ca^{2+} binding site [42,43]. Hence, Ca^{2+} is lost when these two polypeptides forming a barrier between the lumen and the calcium binding site [44] are released from the OEC by the action of polyamines. The other extrinsic polypeptide of apparent molecular mass of 33 kDa, also known as the manganese-stabilizing protein, is important for the integrity and function of the Mn_4Ca complex involved in water oxidation [45]. In its absence, two of the four Mn ions are often released and the oxygen evolving activity is lost unless high concentration (100 mM) of Cl^- is added. In the present case, however, it was verified by atomic absorption spectroscopy that no Mn was released from the PSII submembrane fractions even at high spermine or spermidine concentrations (data not shown). Also the inhibition could not be overcome by CaCl_2 (data not shown) as it is usually the case with toxic divalent cations such as heavy metals [38-41]. The inhibition by polyamines is thus different.

The release of the three extrinsic polypeptides in the presence of polyamines and thus the disassembly of the OEC are expected to modify electron transport within PSII. Indeed, we observed a lack of electron supply for reduction of the quinone acceptors of PSII as shown by FI measurements (Fig. 5.2B and C). Alteration of the OEC was demonstrated by the partial recovery of the O-J and J-P phases with diphenylcarbazide (Fig. 5.2B). This electron donor can gain access to its photo-oxidation site at Tyr_Z⁺ only when the OEC is dysfunctional [33]. Thus, even though Mn was not lost, the Mn-cluster was disorganized by polyamine action. This is demonstrated by the impairment of quinone reoxidation through charge recombination as revealed by the polyamine-dependent loss of B and Q thermoluminescence bands (Fig. 5.4). The above indicates that the S₂ state of the Mn-cluster needed for recombination was lost with the perturbation of the OEC. An upshift in the *T_m* of thermoluminescence bands in PSII submembrane fractions was previously associated with an abnormal ligand environment of the Mn₄Ca complex [46]. Also, a large increase of the thermoluminescence temperature of the Q-band was reported in PSII submembrane fractions depleted in Cl⁻ and 33 kDa polypeptide due to a stronger stabilization of S₂ [47]. Hence, the shift of the *T_m* of thermoluminescence towards higher temperatures observed for both B- and Q-bands (Fig. 5.4) may originate from a population of PSII centers where the Mn₄Ca complex is stabilized in S₂ state by polyamines as this may represent an intermediate step in the dismantlement of the OEC.

The data presented in Fig. 5.2C reveal that the FI was relatively fast at high polyamine concentration reflecting a reduced rate of Q_A⁻ reoxidation. Further, flash

induced fluorescence decay measurements have shown that the half-time for reoxidation of Q_A^- increased with high concentrations of polyamines (Table 5.1). This clearly demonstrates that electron transfer from Q_A^- to Q_B was delayed. The total amplitude of the flash induced fluorescence rise was also decreased by polyamines (Fig. 5.5). This apparent loss of the amplitude of fluorescence indicates a fast decline of fluorescence that occurs much before the start of the decay measurement after 100 μ s. We propose that this decline in the flash-induced fluorescence yield is due to recombination between Q_A^- and $P680^+$ in a fraction of the PSII centers. PSII centers with $P680^+$ are known to have a fluorescence yield close to F_0 [48]. The accumulation of $P680^+$ after a single flash illumination is only observed when electron transfer between the primary electron donor Tyr_Z and $P680^+$ is inhibited or delayed [49]. The decline in the rate of electron transfer from Tyr_Z to $P680^+$ in PSII centers that have lost the integrity of the OEC is consistent with the structural data indicating Tyr_Z is localized in close proximity with the Mn_4Ca complex [50,51]. Therefore, the specific orientation of Tyr_Z or its deprotonation that is needed for electron transfer to $P680^+$ may be hindered [52]. Alternatively, a direct interaction between polyamines and Tyr_Z can be postulated.

As can be expected, the restoration of quinone photoreduction in polyamine-treated PSII submembrane fractions by diphenylcarbazide does not overcome the slower electron transfer from Tyr_Z to $P680^+$ or from Q_A^- to Q_B . Though the FI is partially recovered with the electron donor, it is clear from Fig. 5.2B that the induction in the ms time scale is greatly retarded owing to the slower electron transport reactions and also

due to the weaker electron donation by diphenylcarbazide to Tyr_Z compared to a native OEC.

A binding site for polyamines near the quinones on the stromal side of PSII can be proposed to explain the retarded electron transfer between Q_A⁻ and Q_B. However, it was reported that Ca²⁺ release from the OEC changes the midpoint redox potential of Q_A and affect Q_A⁻ to Q_B electron transfer [53,54]. Increased half-times of Q_A⁻ reoxidation were observed in PSII submembrane fractions with a disorganized OEC such as in NaCl-treated PSII that are depleted of the two extrinsic polypeptides of 17 and 23 kDa and Ca²⁺ [24]. This was explained by a transmembrane conformational change that modifies the acceptor side of PSII reflecting a long-range allosteric coupling with the OEC. Similar alteration of the stromal side of PSII as a consequence of a transmembrane effect in polyamine-treated PSII is plausible as the polycations greatly affected the integrity of the OEC. The recent structural information about the stromal side of cyanobacterial PSII indicates that the Q_B pocket is formed by several transmembranous polypeptides including the polypeptide D1, cytochrome *b*₅₅₉, PsbL, and PsbJ [51]. Cytochrome *b*₅₅₉ was proposed as an alternative electron acceptor preventing the over-reduction of the PSII acceptor side and as an auxiliary electron donor for oxidized chlorophylls of the reaction center [55,56]. The cytochrome is mostly in a high potential form in PSII complexes with an intact OEC but transformed into a low potential form when the OEC is damaged [57]. PsbL and PsbJ were shown to regulate electron flow to the plastoquinone pool with PsbJ specifically regulating the oxidation of Q_A⁻ [58]. These polypeptides are also involved in the assembly of the OEC [59] and, together with D1

and cytochrome b_{559} , they can therefore create a direct link between the functions of PSII on the luminal and stromal sides of the photosystem.

In conclusion, the action of polyamines on the OEC is more profound than Cl^- or Ca^{2+} depletion as CaCl_2 could not restore the activity. Also, even if Mn is not released, the loss of thermoluminescence shows that the S_2 state of the Mn cluster is not formed at relatively high polyamine concentrations and that the Mn_4Ca complex is disorganized.

5.7 Acknowledgements

This work was funded by the Natural Science and Engineering Research Council of Canada.

5.8 References

- [1] P.T. Evans, R.L. Malmberg, Do polyamines have roles in plant development, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40 (1989) 235-269.
- [2] K. Kotzabasis, A role for chloroplast-associated polyamines, *Bot. Acta* 109 (1996) 5-7.
- [3] K. Kotzabasis, D. Dornemann, Differential changes in the photosynthetic pigments and polyamine content during photoadaptation and photoinhibition in the unicellular green alga *Scenedesmus obliquus*, *Z. Naturforsch C* 53 (1998) 833-840.
- [4] R.T. Besford, C.M. Richardson, J.L. Campos, A.F. Tiburcio, Effect of Polyamines on stabilization of molecular complexes in thylakoid membranes of osmotically stressed oat leaves, *Planta* 189 (1993) 201-206.

- [5] J. Legocka, I. Zajchert, Role of spermidine in the stabilization of the apoprotein of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex of photosystem II during leaf senescence process, *Acta Physiol. Plant.* 21 (1999) 127-132.
- [6] L. Sfichi, N. Ioannidis, K. Kotzabasis, Thylakoid-associated polyamines adjust the UV-B sensitivity of the photosynthetic apparatus by means of light-harvesting complex II changes, *Photochem. Photobiol.* B80 (2004) 499-506.
- [7] G. Szalai, T. Janda, T. Bartok, E. Paldi, Role of light in changes in free amino acid and polyamine contents at chilling temperature in maize (*Zea mays*), *Physiol. Plant.* 101 (1997) 434-438.
- [8] C. Lütz, E. Navakoudis, H.K. Seidlitz, K. Kotzabasis, Simulated solar irradiation with enhanced UV-B adjust plastid- and thylakoid-associated polyamine changes for UV-B protection, *Biochim. Biophys. Acta* 1710 (2005) 24-33.
- [9] Y. Kasukabe, L.X. He, K. Nada, S. Misawa, I. Ihara, S. Tachibana, Overexpression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and up-regulates the expression of various stress regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*, *Plant and Cell Physiol.* 45 (2004) 712-722.
- [10] E.Z. Stoyanova, E.N. Karanov, V. Alexieva, Subcellular aspects of the protective effect of spermine against atrazine in pea plants, *Plant Growth Regulation* 29 (1999) 175-180.
- [11] J.S. Peters, C.K. Chin, Inhibition of photosynthetic electron transport by palmitoleic acid is partially correlated to loss of thylakoid membrane proteins, *Plant Physiol. Biochem.* 41 (2003) 117-124.
- [12] R.D. Slocum, R. Kaur-Sawhney, A.W. Galston, The physiology and biochemistry of polyamines in plants, *Arch. Biochem. Biophys.* 235 (1984) 283-303.

- [13] F. Schuber, Influence of polyamines on membrane function, *Biochem. J.* 260 (1989) 1-10.
- [14] M. la Mea, A. Di Sandro, L. Dondini, S. Del Duca, F. Vantini, C. Bergamini, R. Bassi, D. Serafini-Fracassini, A *Zea mays* 39-kDa thylakoid transglutaminase catalyses the modification by polyamines of light-harvesting complex II in a light-dependent way, *Planta* 219 (2004) 754-764.
- [15] S. Del Duca, S. Beninati, D. Serafini-Fracassini, Polyamines in chloroplasts: identification of their glutamyl and acetyl derivatives, *Biochem. J.* 305 (1995) 233-237.
- [16] S. Del Duca, V. Tidu, R. Bassi, C. Esposito, D. Serafini-Fracassini, Identification of chlorophyll-a/b proteins as substrates of transglutaminase activity in isolated chloroplast of *Helianthus tuberosus*, *Planta* 193 (1994) 283-289.
- [17] K. Kotzabasis, C. Fotinou, K.A. Roubelakisangelakis, D. Ghanotakis, Polyamines in the photosynthetic apparatus. Photosystem II highly resolved subcomplexes are enriched in spermine, *Photosyn. Res.* 38 (1993) 83-88.
- [18] A. Bograh, Y. Gingras, H.A. TajmirRiahi, R. Carpentier, The effects of spermine and spermidine on the structure of photosystem II proteins in relation to inhibition of electron transport, *FEBS Lett.* 402 (1997) 41-44.
- [19] D.A. Berthold, G.T. Babcock, C.F. Yocum, A highly resolved oxygen evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes. EPR and electron transport properties, *FEBS Lett.* 134 (1981) 231-234.
- [20] A. Rashid, M. Bernier, L. Pazdernick, R. Carpentier, Interaction of Zn^{2+} with the donor side of photosystem II, *Photosynth. Res.* 30 (1991) 123-130.
- [21] J.M. Ducruet, Chlorophyll thermoluminescence of leaf discs: simple instruments and progress in signal interpretation open the way to new ecophysiological indicators, *J. Exp. Bot.* 54 (2003) 2419-2430.

- [22] 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 Q_B niche, *Biochim. Biophys. Acta*, In Press, Corrected Proof (2006).
- [23] J.M. Ducruet, T. Miranda, Graphical and numerical analysis of thermoluminescence and fluorescence F_0 Emission in photosynthetic material, *Photosynth. Res.* 33 (1992) 15-27.
- [24] I.I. Putrenko, S. Vasil'ev, D. Bruce, Modulation of flash-induced photosystem II fluorescence by events occurring at the water oxidizing complex, *Biochemistry* 38 (1999) 10632-10641.
- [25] T.A. Ono, T. Noguchi, Y. Nakajima, Characteristic changes of function and structure of photosystem II during strong light photoinhibition under aerobic conditions, *Biochim. Biophys. Acta* 1229 (1995) 239-248.
- [26] H.Y. Nakatani, Photosynthetic oxygen evolution does not require the participation of polypeptides of 16 and 24 kilodaltons, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120 (1984) 299-304.
- [27] S. Boisvert, D. Joly, S. Leclerc, S. Govindachary, J. Harnois, R. Carpentier (In Press). Inhibition of the oxygen evolving complex of photosystem II and depletion of extrinsic polypeptides by nickel. *BioMetals*.
- [28] F. Babani, H.K. Lichtenthaler, Light-induced and age-dependent development of chloroplasts in etiolated barley leaves as visualized by determination of photosynthetic pigments, CO₂ assimilation rates and different kinds of chlorophyll fluorescence ratios, *J. Plant Physiol.* 148 (1996) 555-566.
- [29] D. Lazár, The polyphasic chlorophyll *a* fluorescence rise measured under high intensity of exciting light, *Funct. Plant Biol.* 33 (2006) 9-30.

- [30] X.G. Zhu, Govindjee, N.R. Baker, E. deSturler, D.R. Ort, S.P. 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.
- [31] P. Pospíšil, 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.
- [32] P. Pospíšil, H. Dau, Chlorophyll fluorescence transients of Photosystem II membrane particles as a tool for studying photosynthetic oxygen evolution, *Photosynth. Res.* 65 (2000) 41-52.
- [33] M.L. Ghirardi, T.W. Lutton, M. Seibert, Interactions between diphenylcarbazide, zinc, cobalt, and manganese on the oxidizing side of photosystem II, *Biochemistry* 35 (1996) 1820-1828.
- [34] A. Seidler, The extrinsic polypeptides of photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta* 1277 (1996) 35-60.
- [35] P.V. Sane, Thermoluminescence: a Technique for Probing Photosystem II, in: R. Carpentier (Ed.), *Photosynthesis Research Protocols*, Humana Press, Totova, New Jersey, USA, 2004, pp. 229-248.
- [36] P.H. Homann, Reliability of photosystem II thermoluminescence measurements after sample freezing: few artifacts with photosystem II membranes but gross distortions with certain leaves, *Photosynth. Res.* 62 (1999) 219-229.
- [37] N.E. Ioannidis, L. Sfichi, K. Kotzabasis, Putrescine stimulates chemiosmotic ATP synthesis, *Biochim. Biophys. Acta* 1757 (2006) 821-828.
- [38] A. Rashid, E.L. Camm, A.K.M. Ekramoddoullah, Molecular mechanism of action of Pb^{2+} and Zn^{2+} on water oxidizing complex of photosystem II, *FEBS Lett.* 350 (1994) 296-298.

- [39] M. Bernier, R. Carpentier, The action of mercury on the binding of the extrinsic polypeptides associated with the water oxidizing complex of photosystem II, *FEBS Lett.* 360 (1995) 251-254.
- [40] C. Jegerschöld, J.B. Arellano, W.P. Schroder, P.J.M. Vankan, M. Baron, S. Styring, Copper(II) inhibition of electron transfer through photosystem II studied by EPR spectroscopy, *Biochemistry* 34 (1995) 12747-12754.
- [41] I. Yruela, M. Alfonso, M. Baron, R. Picorel, Copper effect on the protein composition of photosystem II, *Physiol. Plant.* 110 (2000) 551-557.
- [42] D.F. Ghanotakis, J.N. Topper, G.T. Babcock, C.F. Yocum, Water-soluble 17-kDa and 23-kDa polypeptides restore oxygen evolution activity by creating a high-affinity binding-site for Ca^{2+} on the oxidizing side of photosystem II, *FEBS Lett.* 170 (1984) 169-173.
- [43] P. Adelroth, K. Lindberg, L.E. Andreasson, Studies of Ca^{2+} binding in spinach photosystem II using $^{45}\text{Ca}^{(2+)}$, *Biochemistry* 34 (1995) 9021-9027.
- [44] C.F. Yocum, Calcium activation of photosynthetic water oxidation, *Biochim. Biophys. Acta* 1059 (1991) 1-15.
- [45] T.M. Bricker, L.K. Frankel, The structure and function of the 33 kDa extrinsic protein of Photosystem II: A critical assessment, *Photosyn. Res.* 56 (1998) 157-173.
- [46] P.H. Homann, L.V. Madabusi, Modification of the thermoluminescence properties of Ca^{2+} depleted photosystem II membranes by the 23 kDa extrinsic polypeptide and by oligocarboxylic acids, *Photosynth. Res.* 35 (1993) 29-39.
- [47] I. Vass, T. Ono, Y. Inoue, Stability and oscillation properties of thermoluminescent charge pairs in the O_2 -evolving system depleted of Cl^- or the 33 kDa extrinsic protein, *Biochim. Biophys. Acta* 892 (1987) 224-235.

- [48] J. Deprez, A. Dobek, N.E. Geacintov, G. Paillotin, J. Breton, Probing fluorescence induction in chloroplasts on a nanosecond time scale utilizing picosecond laser pulse pairs, *Biochim. Biophys. Acta* 725 (1983) 444-454.
- [49] R.D. Britt, Oxygen Evolution, in: D.R. Ort, C. Yocum (Eds.), *Oxygenic photosynthesis: the light reactions*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1996, pp. 137-164.
- [50] S. Iwata, J. Barber, Structure of photosystem II and molecular architecture of the oxygen-evolving centre, *Curr. Opin. Stru. Biol.* 14 (2004) 447-453.
- [51] B. Loll, J. Kern, W. Saenger, A. Zouni, J. Biesiadka, Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 angstrom resolution structure of photosystem II, *Nature* 438 (2005) 1040-1044.
- [52] G. Christen, G. Renger, The role of hydrogen bonds for the multiphasic P680⁺ reduction by Y_z in photosystem II with intact oxygen evolution capacity. Analysis of kinetic H/D isotope exchange effects, *Biochemistry* 38 (1999) 2068-2077.
- [53] A. Krieger, E. Weis, S. Demeter, Low pH-induced Ca²⁺ ion release in the water-splitting system is accompanied by a shift in the midpoint redox potential of the primary quinone acceptor Q_A, *Biochim. Biophys. Acta* 1144 (1993) 411-418.
- [54] P. Pospíšil, E. Tyystjärvi, Molecular mechanism of high-temperature-induced inhibition of acceptor side of Photosystem II, *Photosynth. Res.* 62 (1999) 55-66.
- [55] M. Poulson, G. Samson, J. Whitmarsh, Evidence that Cytochrome b₅₅₉ protects photosystem II against photoinhibition, *Biochemistry* 34 (1995) 10932-10938.
- [56] P. Faller, A. Pascal, A.W. Rutherford, Beta-carotene redox reactions in photosystem II: electron transfer pathway, *Biochemistry* 40 (2001) 6431-6440.

- [57] M. Roncel, J.M. Ortega, M. Losada, Factors determining the special redox properties of photosynthetic cytochrome b_{559} , *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 4961-4968.
- [58] I. Ohad, C. Dal Bosco, R.G. Herrmann, J. Meurer, Photosystem II proteins PsbL and PsbJ regulate electron flow to the plastoquinone pool, *Biochemistry* 43 (2004) 2297-2308.
- [59] M. Suorsa, R.E. Regel, V. Paakkarinen, N. Battchikova, R.G. Herrmann, E.M. Aro, Protein assembly of photosystem II and accumulation of subcomplexes in the absence of low molecular mass subunits PsbL and PsbJ, *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 96-107.

5.9 Figure captions

Figure 5.1 Inhibition of oxygen evolution activity in PSII submembrane fractions after a 5-min incubation with various concentrations of spermine (open circles) or spermidine (closed circles). Other conditions are given in Materials and methods.

Figure 5.2 (A) Effect of increasing spermidine (closed circles) on the F_v/F_0 ratio in PSII submembrane fractions. (B) Fluorescence induction traces with diphenylcarbazide: (1) control; (2) 3 mM spermidine; (3) 3 mM spermidine and 1 mM diphenylcarbazide. (C) Fluorescence induction traces of PSII membranes treated with various concentrations of spermidine: (1) control; (2) 2 mM; (3) 4 mM; (4) 7 mM. All traces were normalized at both initial and maximal intensities.

Figure 5.3 Effects of a 5-min incubation of PSII submembrane fractions (100 μ g Chl/mL) in the presence of spermidine on the polypeptide profile. Upper panel: Lane 1, molecular weight standards; lane 2, control PSII; lane 3, spermidine-treated PSII; lane 4, supernatant of spermidine-treated PSII; lane 5, supernatant of the Tris-alkali treated PSII; lane 6, Tris-alkali treated PSII. Numbers on the left side indicate apparent molecular masses (kDa) of the molecular markers. Lower panel: 33 kDa polypeptide content of the PSII submembrane fractions as a function of spermidine concentration.

Figure 5.4 Temperature profile of the thermoluminescence emission from PSII submembrane fractions in the absence (B-band) (A) or presence (Q- and C-bands) (B) of 5 μ M DCMU with various spermine concentrations: 1, control; 2, 0.5 mM; 3, 1 mM; 4, 2 mM; 5, 5 mM; 6, 10 mM. Inset: Relative thermoluminescence intensity of the B-band (closed circles) and the Q-band (open circles) at various spermine concentrations.

Figure 5.5 Chl fluorescence decay kinetics of PSII submembrane fractions alone (trace 1) or treated with 1 (trace 2), 2 (trace 3) or 4 (trace 4) mM spermine. Upward arrow indicates the application of the single turn-over saturating white flash. Each trace is the average of nine independent measurements.

Table 5.1 Half-times ($t_{1/2}$, in ms) and amplitudes (A) of the three exponential components of the Chl fluorescence decay in PSII submembrane fractions (25 $\mu\text{g/ml}$) incubated for 3 min in the dark at $20 \pm 2^\circ\text{C}$ in the absence or presence of spermine.

Spermine	Fast phase		Middle phase		Slow phase ^a		A_{total} (%)
	A (%)	$t_{1/2}$ (ms)	A (%)	$t_{1/2}$ (ms)	A (%)	$t_{1/2}$ (ms)	
No addition	33.03	0.66	39.27	9.49	27.70	68.1	100
1 mM	30.25	1.78	38.53	11.52	31.22	66.1	100
2 mM	-	-	63.82	4.21	36.18	40.7	100
4 mM	-	-	50.45	5.96	49.55	87.9	100

The amplitudes and $t_{1/2}$ of each component were calculated from the averaged trace of nine independent measurements of the PSII sub-membrane fractions.

^a This slow phase is considered as the constant background fluorescence.

Figure 5.1

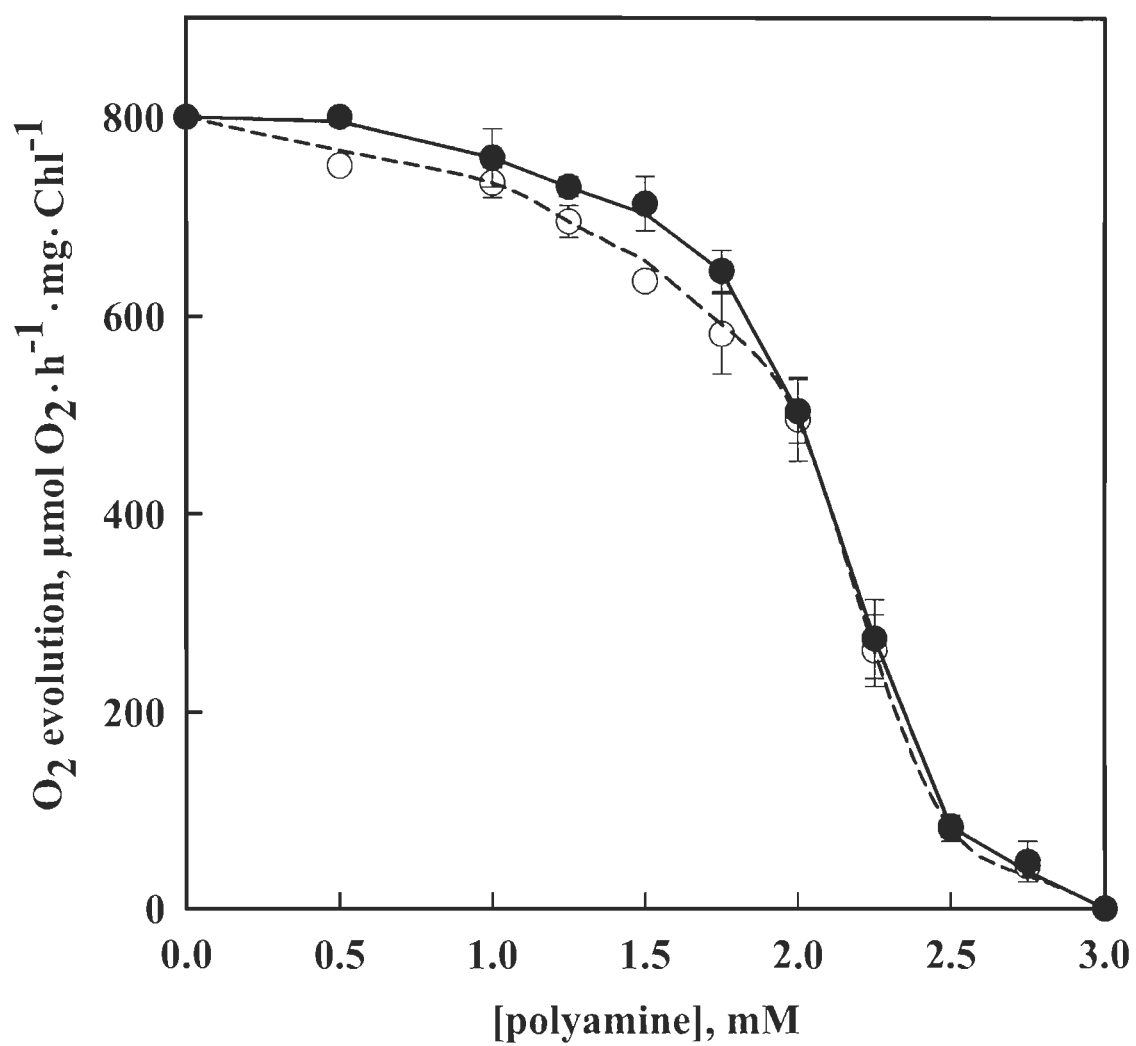


Figure 5.2

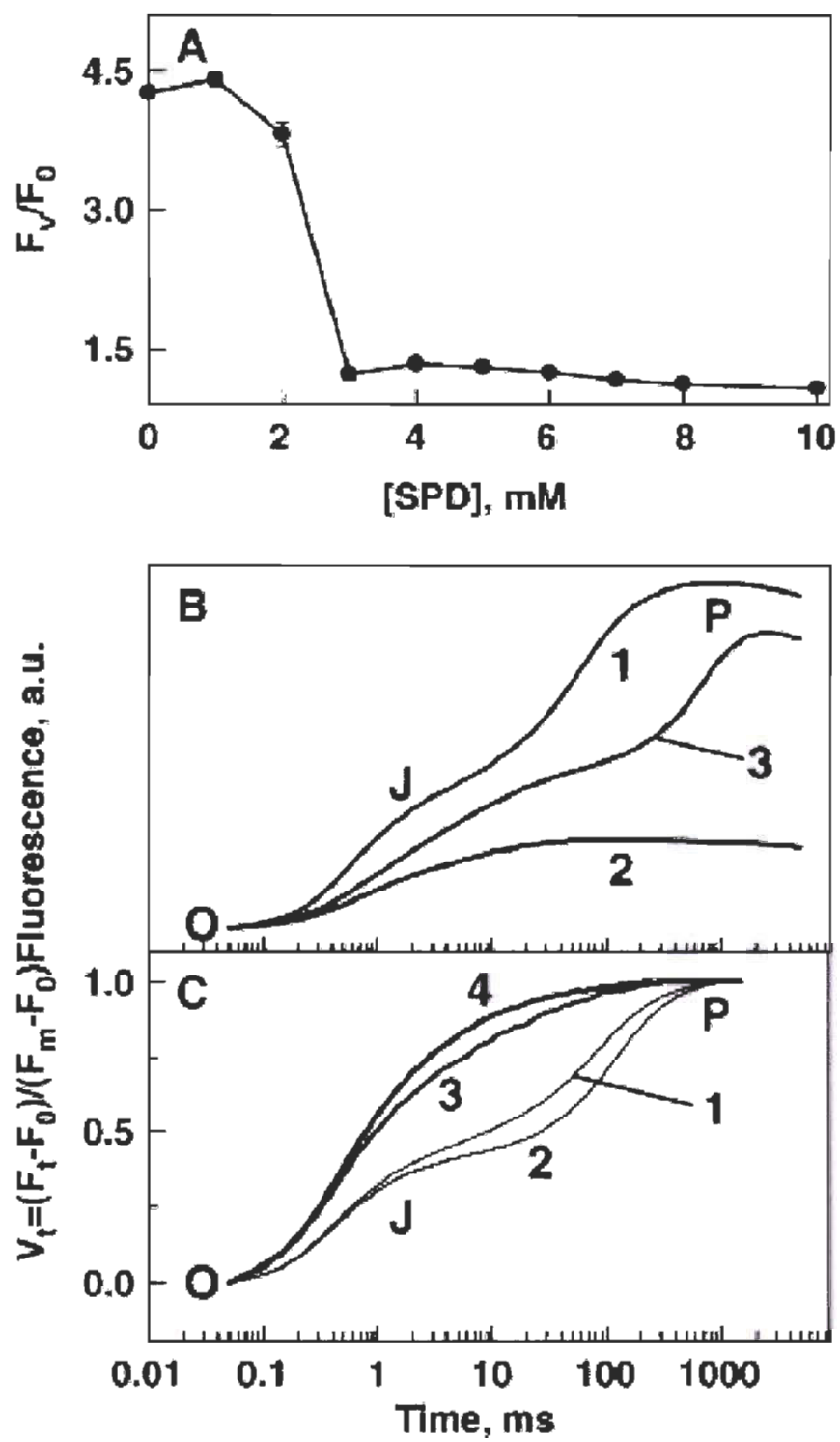


Figure 5.3

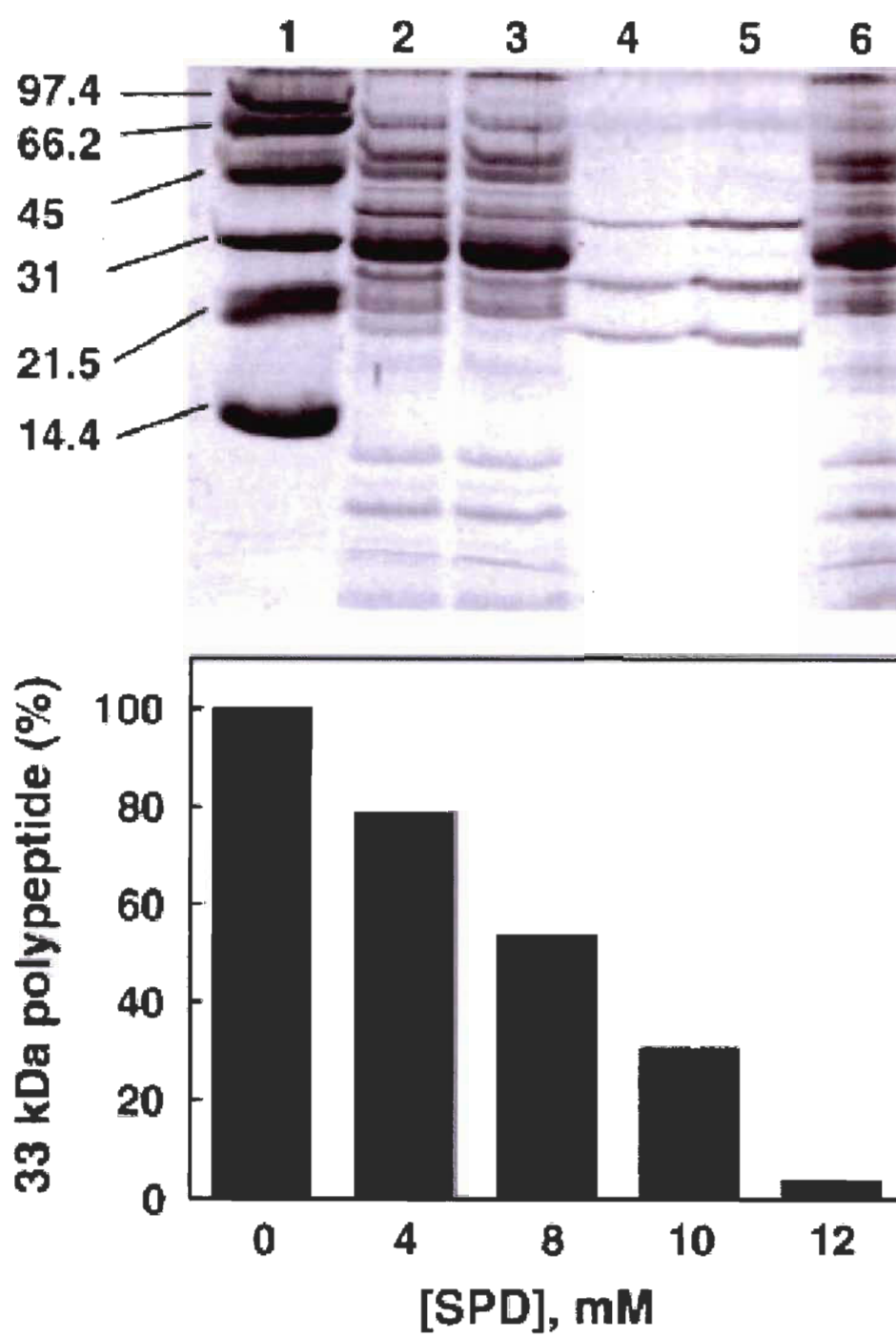


Figure 5.4

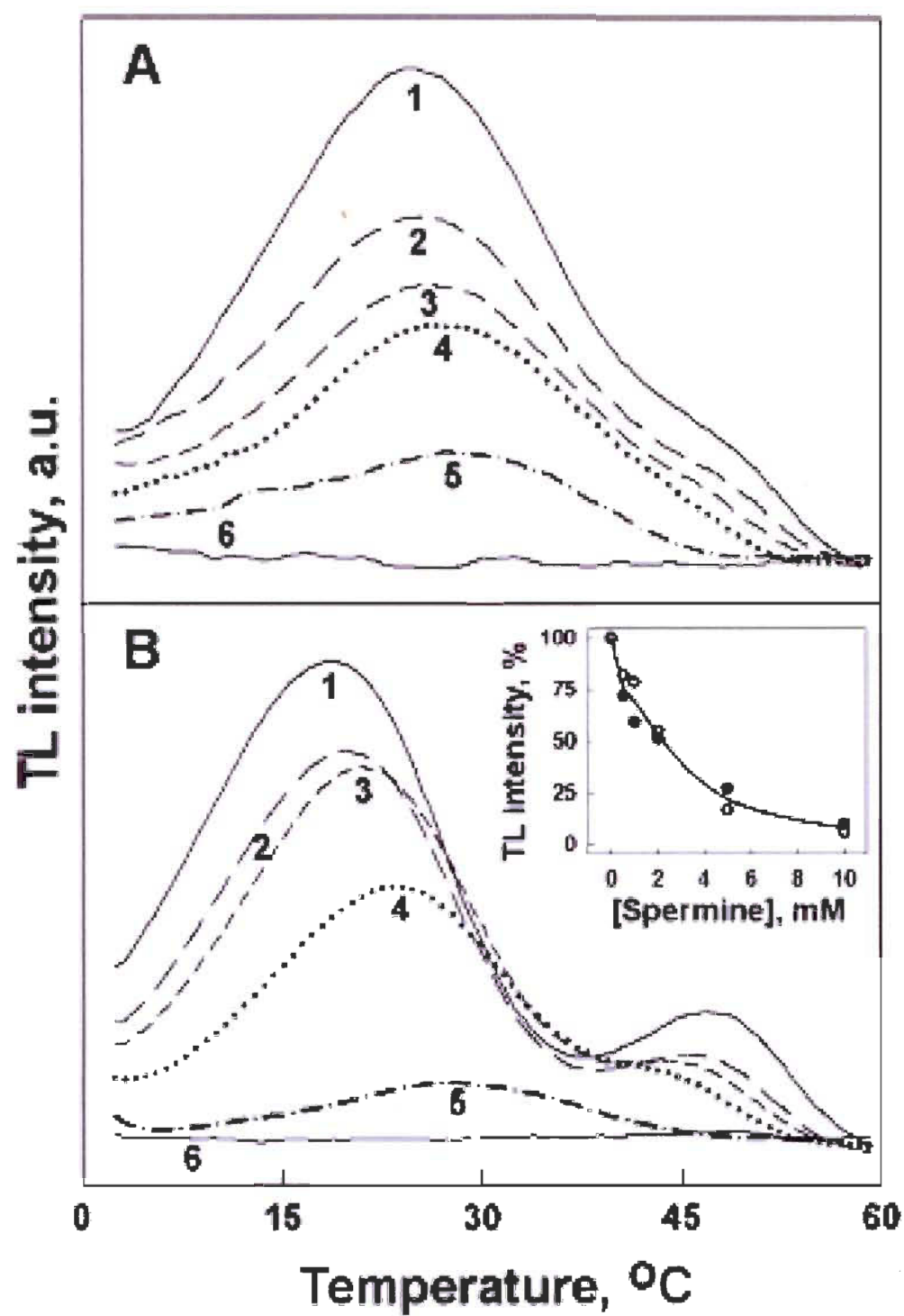
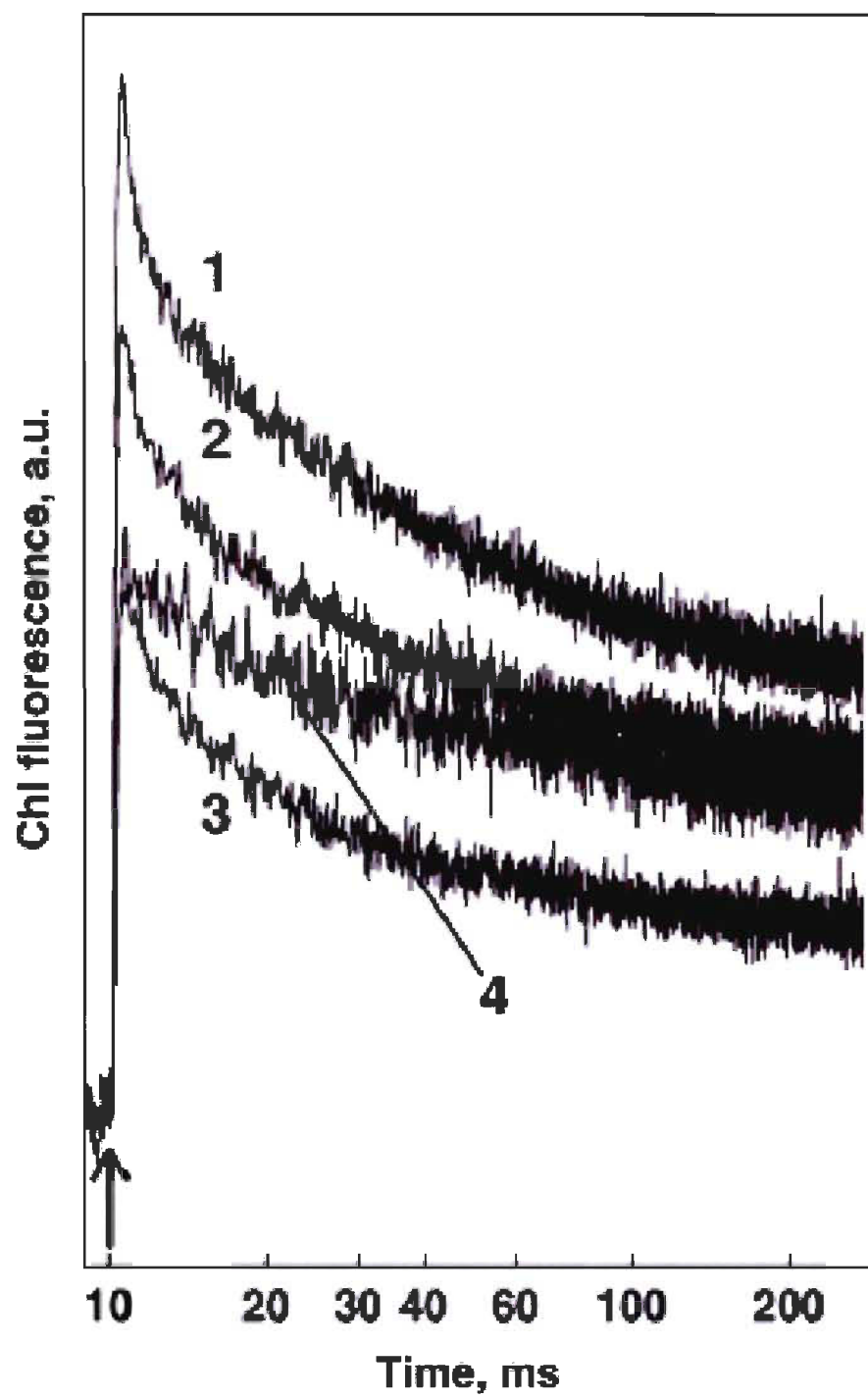


Figure 5.5



CHAPITRE VI

ANALYSE DE L'INTERACTION DES POLYAMINES AVEC LE COMPLEXE DE MANGANÈSE PAR MESURE DU TAUX DE DÉGAGEMENT D'OXYGÈNE APRÈS FLASH DANS LES THYLACOÏDES

6.1 Oscillation en quatre temps du dégagement d'oxygène

La photoactivation des PSII adaptés dans le noir induit par une série de flashes actiniques provoque l'apparition d'une oscillation en quatre temps dans les mesures de TDO, contrairement à l'utilisation d'une lumière actinique continue qui ne donne qu'un TDO variant linéairement dans le temps. L'oscillation observée s'explique par le fait que quatre étapes d'activation par la lumière sont nécessaires pour compléter un cycle de réactions dans le COE menant au dégagement d'oxygène (voir figure 6.1), modèle original proposé par Kok et al. (1970).

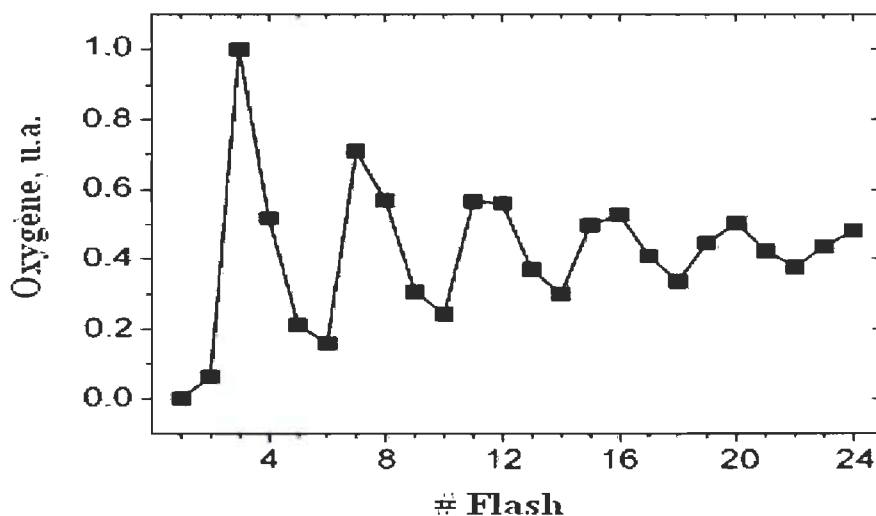


Figure 6.1: Dégagement d'oxygène induit par flash dans les chloroplastes d'épinards. Adapté de Forbush et al. (1971).

L'utilisation de cinq états d'oxydation formels associés aux complexes de manganèse (S_0 , S_1 , S_2 , S_3 et S_4) permet de décrire les oscillations observées lors du dégagement d'oxygène, lequel se produit lors de la transition de l'état S_4 à S_0 (voir figure 6.2). L'état S_1 est le plus stable à la noirceur même si l'état S_0 est celui qui

présente le niveau d'oxydation le plus faible des états S; la tyrosine D (Tyr_D) oxyde lentement l'état S₀ en S₁ dans le noir, alors que les états métastables S₂ et S₃ sont réduits rapidement vers l'état S₁ par la Tyr_D, les quinones accepteurs du PSII ou par le cytochrome b559. Les états S₁ et S₀ sont ainsi présents dans un ratio approximatif de 3 pour 1 respectivement, expliquant ainsi pourquoi les TDO des thylacoïdes adaptés dans le noir démontrent des activités maximales d'une manière cyclique après les 3^{ème}, 7^{ème}, 11^{ème} et etc flash. L'atténuation des oscillations provient de l'état temporairement inactif de certains centres réactionnels de PSII dans un état P680⁺ lors d'une excitation lumineuse (paramètre appelé coup manqué « α ») et/ou d'une excitation lumineuse trop longue qui provoque un avancement double des états S de certains COE de PSII (paramètre nommé coup double « β »), survenant expérimentalement au lieu de l'excitation lumineuse standard qui permet l'avancement des états S d'un état d'oxydation (paramètre nommé coup simple « γ ») selon le modèle classique de Kok (Shinkarev 2005a, Renger 2007).

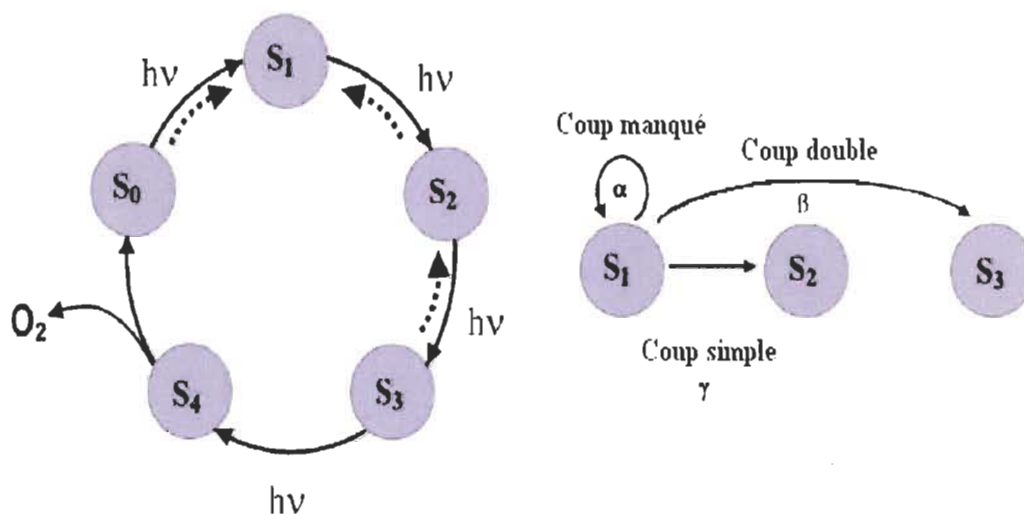


Figure 6.2: Modèle classique de Kok. Adapté de Shinkarev (2005a).

Toutefois, plusieurs études ont démontré que le modèle classique devait être amélioré (voir figure 6.3). Premièrement, l'atténuation des oscillations observées provient également de la relaxation dans les états S de certains PSII entre les excitations lumineuses (paramètre appelé transition arrière « δ ») et de l'inactivation définitive de

certaines centres réactionnels de PSII après excitation lumineuse (paramètre appelé inactivation « ε »). Deuxièmement, l'oxydation du COE par $P680^+$ se fait indirectement par la TyrZ. Troisièmement, l'existence naturelle d'états d'oxydation en deça de S_0 , tout particulièrement S_{-1} , est possible même en absence d'agents réducteurs tel que l'hydroxylamine (Shinkarev 2005b, Renger et Kühn 2007).

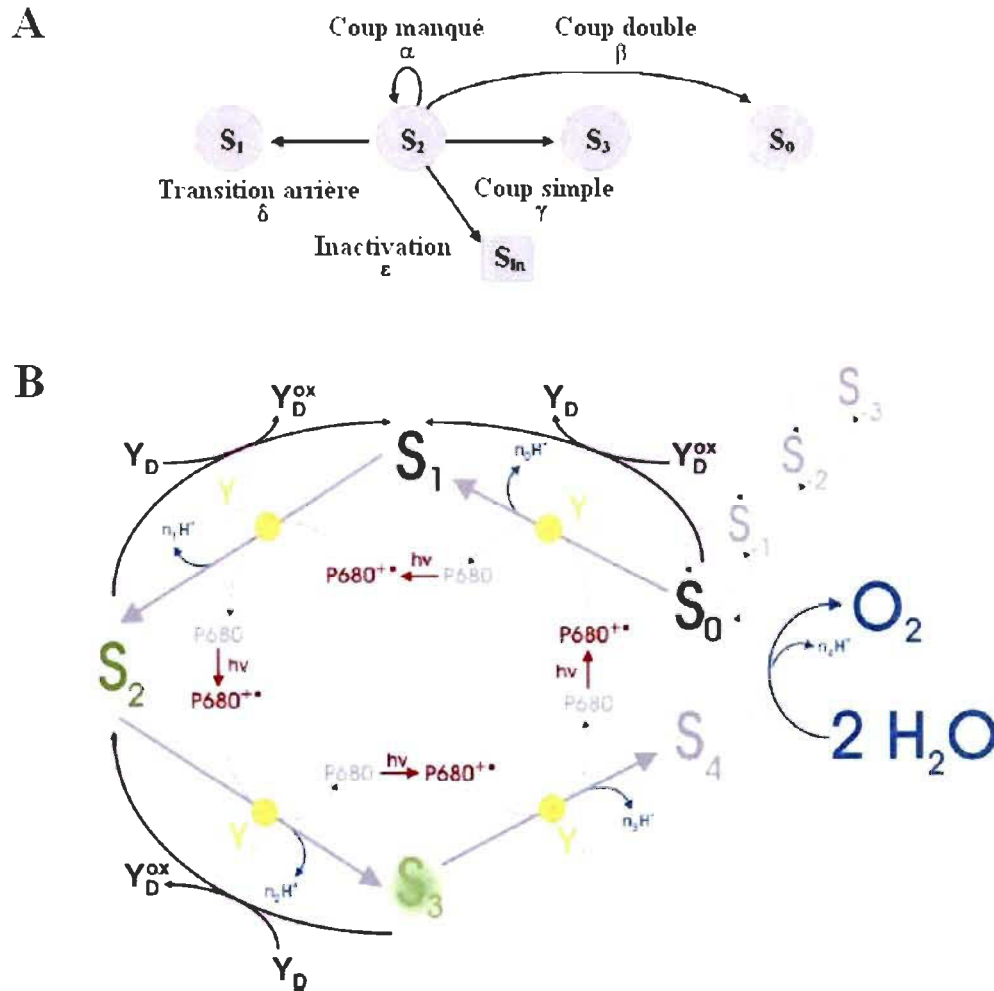


Figure 6.3: (A) Modèle amélioré de Kok proposé par Shinkarev (2005b).
(B) Modèle amélioré de Kok proposé par de Renger et Kühn (2007).

L'observation des oscillations dans les TDO après flash permet une analyse qualitative rapide de l'état fonctionnel du COE avec une rapidité et une sensibilité plus grande que les mesures de TDO traditionnelles. Toutefois, c'est l'analyse quantitative des TDO après flash qui rend cette technique particulièrement intéressante dans l'étude

des interactions au niveau du complexe de manganèse. L'analyse quantitative effectuée dans la présente recherche se base sur le modèle proposé par Shinkarev (2005*b*), tout en incluant les états S inférieurs proposé par Messinger et al. (1991) tel que mentionné dans la section méthodes expérimentales. L'existence ou non d'une interaction directe entre les polyamines naturelles et le complexe de manganèse du COE est étudiée par dégagement d'oxygène induit par flash dans les membranes de thylacoïdes intactes; la spermine est utilisée comme polyamine standard alors que l'hydroxylamine est utilisée comme molécule comparative, puisque elle agit directement avec le complexe de manganèse pour le réduire vers ses états S inférieurs.

6.2 Inhibition par la spermine

L'ajout exogène de spermine aux membranes de thylacoïdes intactes inhibe fortement les TDO induit par flash dans les PSII (voir figure 6.4). L'inhibition de l'activité du PSII est mesurable à partir de 3 mM de spermine, alors que l'inhibition totale survient à 10 mM de spermine; ces résultats diffèrent de ceux publiés par Beauchemin et al. (2007), puisque les mesures de TDO induit par flash dans les thylacoïdes utilisent une concentration de 200 µg Chl/mL alors que celles des TDO induits par une lumière continue dans les PSII utilisaient 25 µg Chl/mL.

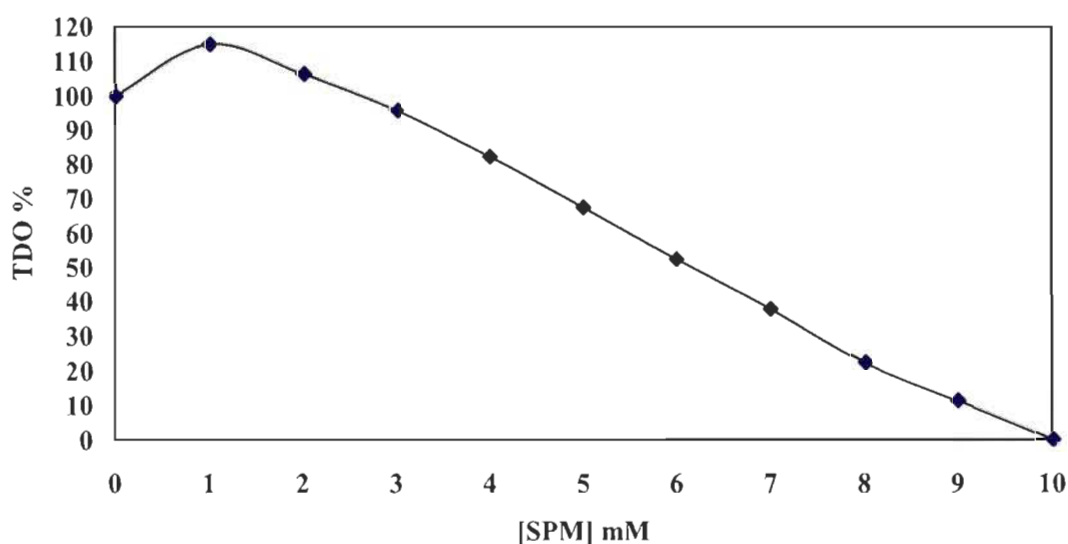


Figure 6.4: Taux de dégagement d'oxygène global suivant les 12 premiers flashes lumineux pour des thylacoïdes traités avec la spermine.

L'analyse qualitative des patrons d'oscillation des TDO en fonction de la concentration en spermine démontre une diminution progressive des TDO pour chacun des flashes (voir figure 6.5). Le patron d'oscillation conserve toutefois le même aspect.

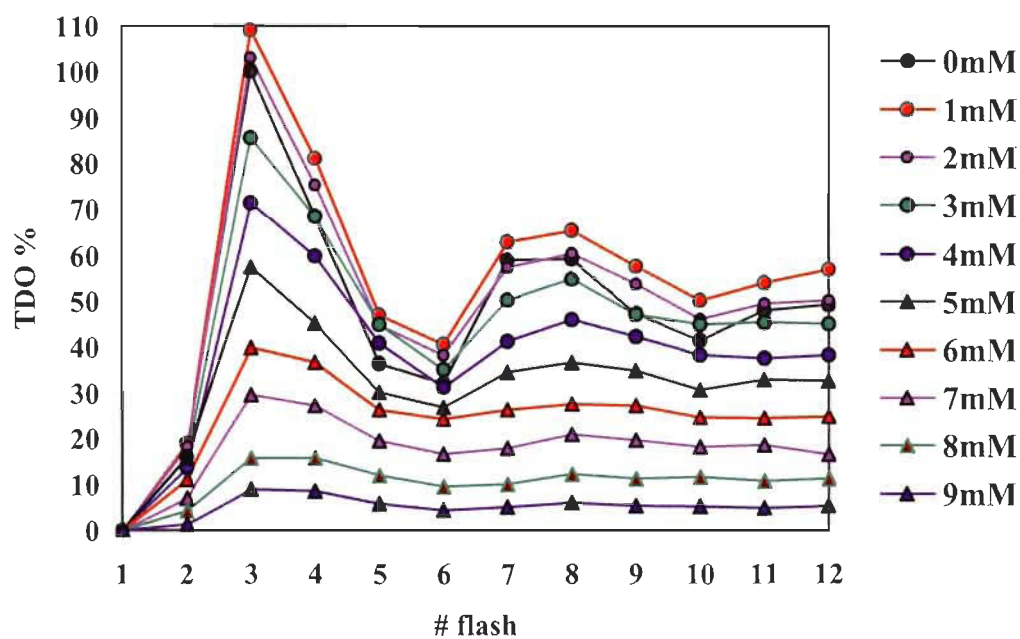


Figure 6.5: Taux de dégagement d'oxygène après flashes lumineux pour des thylacoïdes traités avec la spermine.

L'analyse quantitative des patrons d'oscillation démontre plusieurs points intéressants. Premièrement, la répartition initiale des populations des états S varie peu en fonction de l'augmentation de la concentration en spermine; l'analyse démontre une perte graduelle de 15% de l'état S_1 (qui passe de 70% à 55%) au profit de S_0 (qui passe de 25% à 40%), les autres états S n'étant pas significativement affectés (voir figure 6.6). Deuxièmement, le changement observé est corrélé avec une modification dans les paramètres de transition des états S en fonction de la concentration de spermine (voir figure 6.7); la répartition des coups simples « γ » diminue de 10% (passant de 80% à 70%) au profit des coups manqués « α » (passant de 15% à 20%) et des inactivations « ϵ » (passant de 5% à 10%), sans pour autant modifier au passage la répartition des transitions arrières « ϵ » et des coups doubles « β ». La comparaison des résultats de la spermine avec l'hydroxylamine est nécessaire pour une analyse plus approfondie.

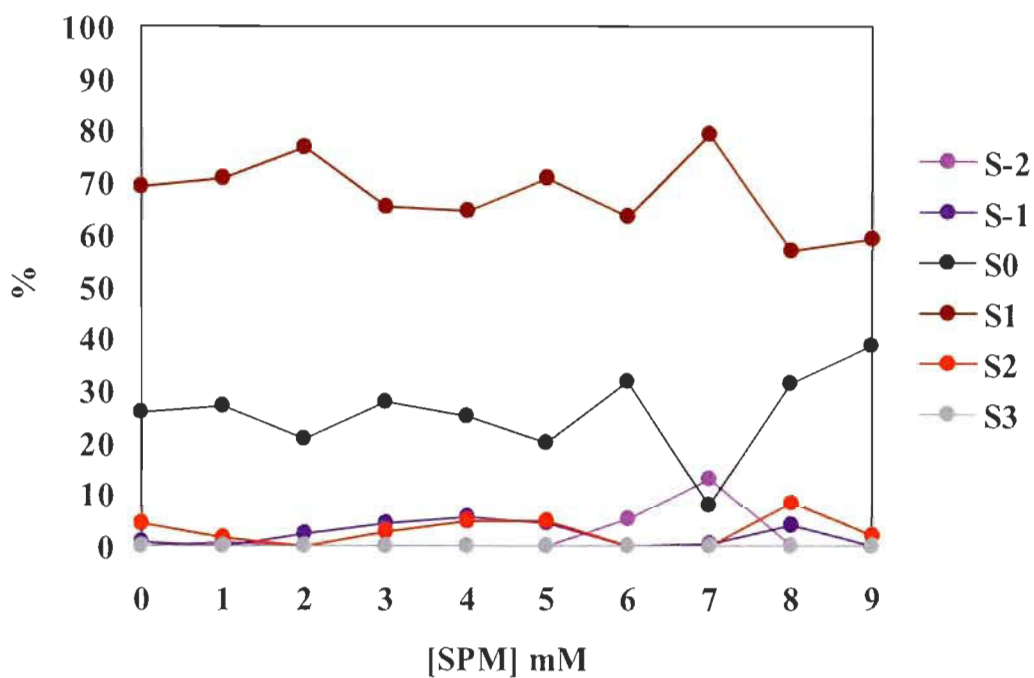


Figure 6.6: Répartition initiale des états S des complexes de manganèse dans les thylacoïdes traités avec la spermine.

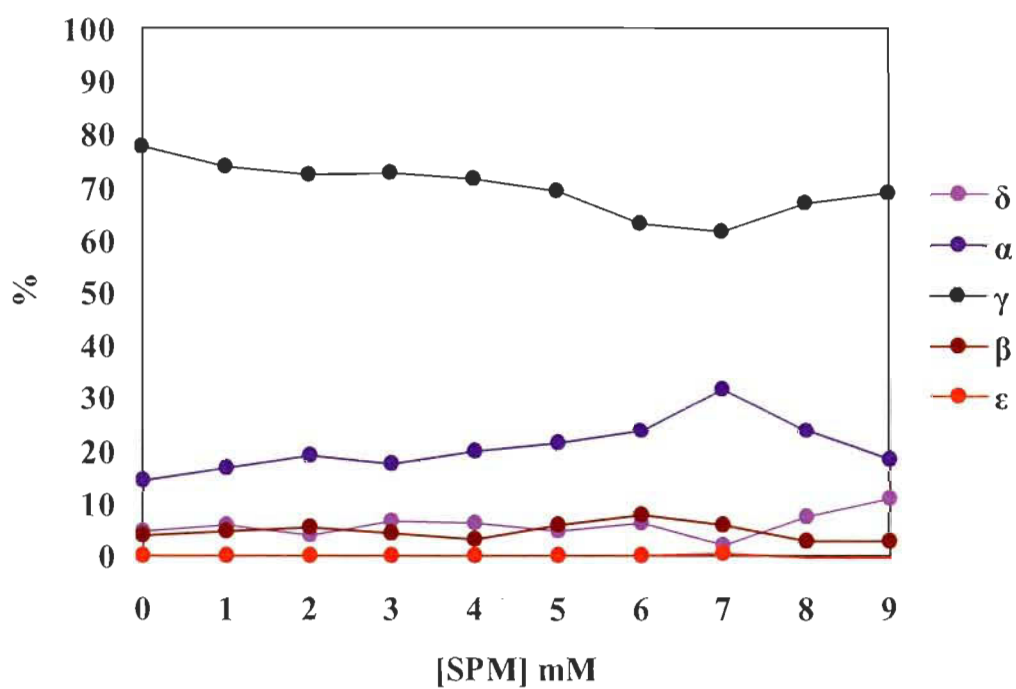


Figure 6.7: Répartition des paramètres de transition des états S des complexes de manganèse dans les thylacoïdes traités avec la spermine.

6.3 Inhibition par l'hydroxylamine

L'ajout exogène d'hydroxylamine aux membranes de thylacoïdes intactes inhibe les TDO induit par flash dans les PSII (voir figure 6.8). L'inhibition de l'activité du PSII est mesurable à partir de 5 μM d'hydroxylamine. Contrairement à la spermine, l'hydroxylamine n'inhibe jamais complètement l'activité de dégagement d'oxygène au niveau du PSII, et ce, même avec des concentrations dans l'ordre du millimolaire (résultats non montrés).

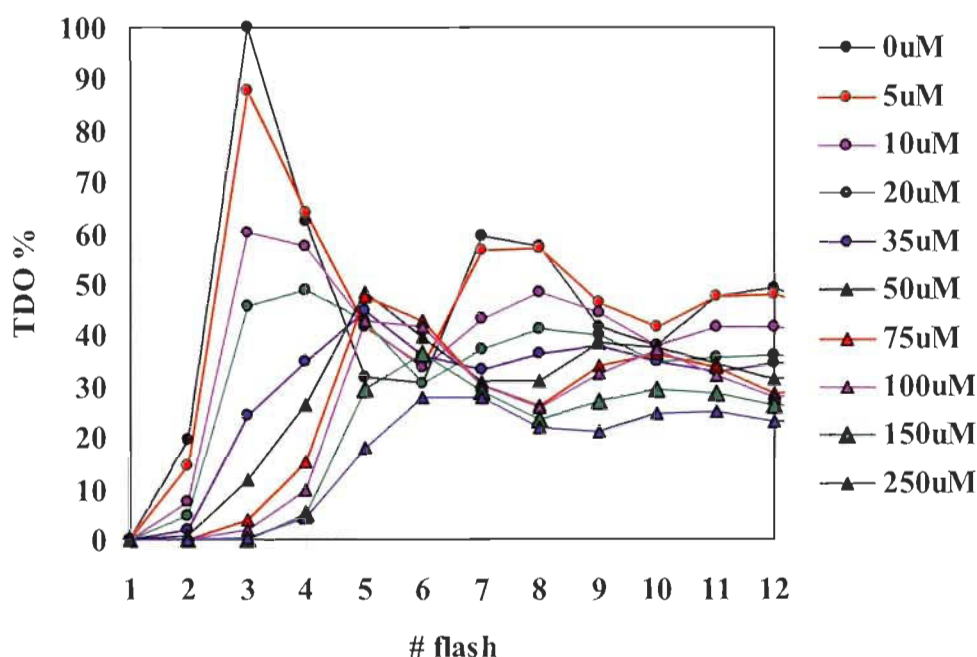


Figure 6.8: Taux de dégagement d'oxygène après flashes lumineux pour des thylacoïdes traités avec l'hydroxylamine.

L'analyse qualitative des patrons d'oscillation des TDO en fonction de la concentration en hydroxylamine démontre une diminution nette des TDO pour chacun des flashes, avec une modification dans les patrons d'oscillation observés. Le TDO maximal est graduellement déplacé du 3^{ème} flash pour des thylacoïdes non traités vers le 5^{ème} flash en présence de 50 μM d'hydroxylamine. L'explication provient du fait que l'hydroxylamine interagit directement avec le complexe de manganèse en causant une réduction en deux étapes des états S; l'état initial majoritaire S_1 est réduit à S_{-1} grâce à deux électrons en provenance de molécules d'hydroxylamine (Messinger et al. 1991).

L'analyse quantitative des patrons d'oscillation démontre plusieurs aspects intéressants. Premièrement, la répartition initiale des populations des états S varie fortement en fonction de l'augmentation de la concentration en hydroxylamine; l'analyse démontre une abolition progressive des populations de S_1 et S_0 au profit de S_{-1} et S_{-2} en augmentant la concentration en hydroxylamine (voir figure 6.9). Le changement observé est accompagné d'une modification mineure dans les paramètres de transition des états S; la répartition des coups simples « γ » diminue de 10% (passant de 80% à 70%) pendant que la répartition des coups manqués « α » augmente de 10% (passant de 15% à 25%), alors que les autres paramètres ne changent pas (voir figure 6.10). Le changement majeur observé dans les patrons d'oscillation de l'hydroxylamine témoigne d'une forte interaction avec le complexe de manganèse, laquelle ne conduit pas à l'inhibition du dégagement d'oxygène comme dans le cas de la spermine et des autres polyamines organiques retrouvées naturellement chez les plantes.

Lorsque l'on compare l'analyse qualitative des patrons d'oscillation des TDO en fonction de la concentration en spermine (voir figure 6.5) avec celle de la concentration en hydroxylamine (voir figure 6.8), la diminution progressive des TDO en présence de concentrations croissantes en spermine s'explique alors par le fait que le profil obtenu correspond aux PSII qui ne sont pas affectés et inhibés par la spermine, contrairement au cas de l'hydroxylamine; la spermine n'interagit pas instantanément avec le complexe de manganèse comme le fait l'hydroxylamine, mais plutôt au niveau des protéines extrinsèques du CDO, laquelle interaction conduit au relâchement des trois polypeptides de 17, 23 et 33 kDa et à la déstabilisation successive du complexe de manganèse comme démontré préalablement (chapitre V).

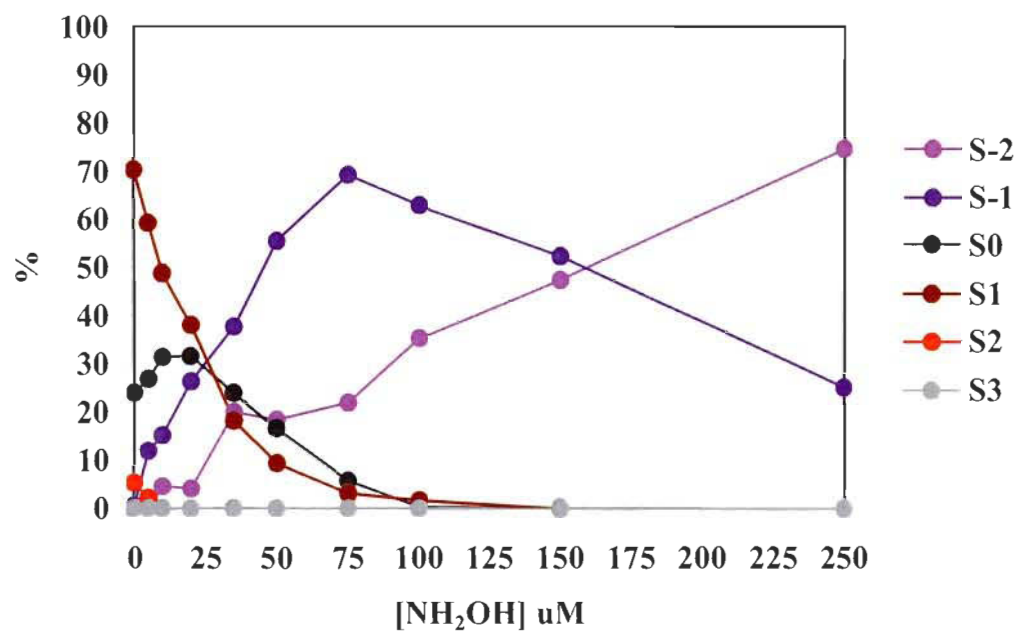


Figure 6.9: Répartition initiale des états S des complexes de manganèse dans les thylacoïdes traités avec l'hydroxylamine.

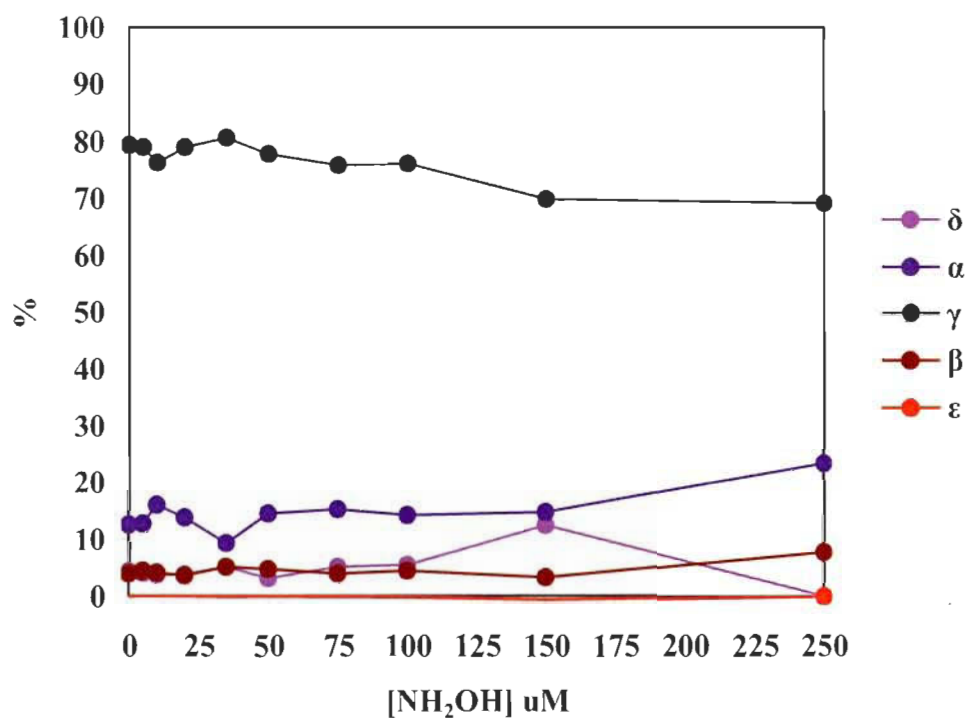


Figure 6.10: Répartition des paramètres de transition des états S des complexes de manganèse dans les thylacoïdes traités avec l'hydroxylamine.

CHAPITRE VII

DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS

7.1 Objectifs de recherche

Les polyamines sont reconnues pour être indispensables à la croissance et la différenciation cellulaire chez les eucaryotes. Le fait que les concentrations intracellulaires des polyamines naturelles soient de 2 à 4 fois supérieures dans les cellules cancéreuses animales comparativement aux cellules saines (entre 0,1 et 0,5 mM) s'avère problématique. Les cellules cancéreuses démontrent une capacité réduite d'exporter les polyamines tout en surexprimant plusieurs enzymes de biosynthèse. Le constat a mené au développement de produits pharmaceutiques régulant négativement les niveaux intracellulaires des polyamines naturelles *in vitro*: les polyamines analogues. Le manque de connaissance sur les processus de transport intracellulaire au niveau moléculaire limite l'efficacité des tests effectués; les polyamines analogues actuels induisent souvent des effets différents dépendamment des cellules traitées (Thomas et Thomas 2003, Wallace et Fraser 2003a, Wallace et al. 2003b, Wallace et Fraser 2004).

Les concentrations intracellulaires des polyamines naturelles sont aussi augmentées dans les cellules des plantes soumises à des conditions de stress abiotiques, menant généralement à un stress de nature oxydatif. Les polyamines ont un rôle antioxydant empêchant la propagation des ROS et la peroxydation des lipides membranaires (Alcázar et al. 2006, Liu et al 2007, Rhee et al. 2007, Groppa et Benavides 2008). Les stress abiotiques contribuent à modifier la structure et la fonction de l'appareil photosynthétique, alors que les polyamines stabilisent les structures protéiques et participent au développement des chloroplastes (Sfichi et al. 2004, Walters 2005, Ioannidis et Kotzabasis 2007, Navakoudis et al. 2007). Bien que les polyamines soient naturellement bénéfiques pour les plantes et les chloroplastes, l'interaction directe des polyamines spermidine et spermine avec des fractions membranaires isolées de PSII conduit à une forte inhibition du dégagement d'oxygène. Le mécanisme d'action de cette inhibition reste encore à être déterminé (Bograh et al. 1997).

Les objectifs de la présente étude étaient divisés en deux volets. Le premier volet était de caractériser les interactions entre HSA, la principale protéine de transport dans le plasma sanguin chez l'humain, et des polyamines analogues possédant une activité antitumorale *in vitro*. Le second volet était de déterminer le mécanisme d'action au niveau moléculaire de l'inhibition du dégagement d'oxygène du PSII causé par des polyamines naturelles chez les végétaux. Les résultats obtenus démontrent l'atteinte des objectifs visés.

7.2 Interaction des polyamines avec l'albumine sérique humaine

Dans les travaux du Chapitre III, les interactions entre les polyamines analogues 333 (1,11-diamino-4,8-diazaudécane), BE-333 (3,7,11,15-tétrazaheptadécane•4HCl) et BE-3333 (3,7,11,15,19-pentazahénicosane•5HCl) avec la protéine HSA ont été caractérisées par spectroscopie d'absorption UV-visible, CD et FTIR, afin de comparer les effets de la complexation des polyamines analogues sur la structure protéique de HSA dans des conditions physiologiques, avec ceux des polyamines naturelles spermine, spermine et putrescine déjà publiés (Ahmed Ouameur et al. 2004).

Les résultats de spectroscopie FTIR ont fourni les premières données concernant la complexation des polyamines analogues avec la protéine HSA, puisque cette technique appliquée dans le moyen infrarouge (4000 à 400 cm^{-1}) permet de déterminer la conformation des structures secondaires d'une protéine. Comme les spectres des complexes polyamine-HSA (figure 3.3, 3.4 et 3.5 section Complex) ne présentaient pas de déplacement majeur dans les bandes spectrales protéiques amide I (principalement attribuable à l'étirement de la liaison C=O) et amide II (principalement attribuable à l'étirement de la liaison C-N et au balancement dans le plan de la liaison N-H), respectivement situées à 1656 et 1543 cm^{-1} (Byler et Susi 1986, Krimm et Bandekar 1986), les spectres de différence [(HSA + polyamine) – (HSA)] ont donc été déterminés pour caractériser la variation d'intensité des bandes amide I et II. L'autodéconvolution par transformée de Fourier et l'augmentation de la résolution de la dérivée seconde ont ensuite été utilisées pour déterminer les structures secondaires de chacun des complexes HSA-polyamine.

À faible concentration de polyamine analogue (250 μM), des variations majeures dans l'intensité des bandes protéiques amide I et amide II, respectivement à 1656 et 1543 cm^{-1} , sont observées dans les spectres de différence (figure 3.3, 3.4 et 3.5 section Diff.). Les bandes positives observées à 1659 et 1540 cm^{-1} (figure 3.3, Diff. HSA-333 = 250 μM), 1657 et 1543 cm^{-1} (figure 3.4, Diff. HSA-BE-333 = 250 μM), ainsi qu'à 1658 et 1542 cm^{-1} (figure 3.5, Diff. HSA-3333 = 250 μM) dans les spectres de différence sont associées à l'augmentation de l'intensité des bandes amide I et II à 1656 et 1543 cm^{-1} , par l'interaction des polyamines analogues avec la protéine HSA. L'augmentation de l'intensité des bandes amides I et II est due à la liaison des polyamines analogues aux groupements C=O et C=N de la protéine, lesquelles liaisons n'induisent pas d'altération majeure dans la conformation protéique. À concentration plus élevée de polyamine analogue (1 mM), des bandes négatives sont observées à 1654 et 1544 cm^{-1} (figure 3.3, Diff. HSA-333 = 1mM), 1656 et 1545 cm^{-1} (figure 3.4, Diff. HSA-BE-333 = 1mM), ainsi qu'à 1652 et 1543 cm^{-1} (figure 3.5, Diff. HSA-3333 = 1mM) dans les spectres de différence suite à l'interaction des polyamines analogues avec la protéine HSA. La diminution de l'intensité des bandes amides I et II est due à l'altération de la conformation protéique causée par les polyamines analogues.

L'analyse quantitative de la structure secondaire de la protéine HSA libre et de ses complexes avec chacune des polyamines analogues a été réalisée (figure 3.6 et table 3.1). La structure secondaire de la protéine libre est composée à 55% d'hélice α (1657 cm^{-1}), à 17% de feuillet β parallèle (1616, 1625 et 1634 cm^{-1}), à 14% de coude β (1677 cm^{-1}), à 7% de feuillet β antiparallèle (1688 cm^{-1}) et à 7% de pelote statistique (1643 cm^{-1}); la structure en feuillet β parallèle est constituée de trois composantes, soit celle à 1616 cm^{-1} (brin β intercaténaire), celle à 1625 cm^{-1} (brin β intracaténaire) et celle à 1634 cm^{-1} (hydratation), ce qui est consistant avec les études spectroscopiques publiées de HSA (Boulikanz et al. 1995, Bramanti et Benedetti 1996). À faible concentration de polyamine analogue (250 μM), aucune altération majeure n'est observée dans la structure secondaire protéique contrairement à plus forte concentration de polyamine analogue (1 mM). De façon consistante avec la diminution de l'intensité des bandes observées à 1654 et 1544 cm^{-1} dans les spectres de différence des complexes protéiques

obtenus avec 1 mM de polyamine (figure 3.3, 3.4 et 3.5 section Diff.), la proportion de la structure en hélice α diminue de 55% pour HSA libre à 51% pour HSA-333, à 50% pour HSA-BE-333 et à 43% pour HSA-BE-3333, pendant que la proportion de la structure en feuillet β parallèle augmente de 17% pour HSA libre à 30%, à 29% et à 36% respectivement pour ces mêmes complexes (figure 3.6 et table 3.1). La diminution des structures en hélice α couplé à l'augmentation des structures en feuillet β parallèle met en évidence un certain degré de dénaturation de la structure protéique lorsque mise en présence de concentrations élevées de polyamines analogues (1 mM). Il est à noter que les résultats obtenus en FTIR proviennent de la moyenne effectuée à partir de 3 préparations protéiques différentes.

Les résultats de spectroscopie CD ont permis de confirmer les données obtenues en spectroscopie FTIR concernant la complexation des polyamines analogues avec la protéine HSA, puisque cette technique appliquée dans le spectre UV lointain (190 à 250 nm) permet également de déterminer la conformation des structures secondaires d'une protéine. À plus forte concentration de polyamines analogues (1 mM), la proportion de la structure en hélice α diminue de 54% pour HSA libre à 49% pour HSA-333, à 48% pour HSA-BE-333 et à 49% pour HSA-BE-3333, pendant que la proportion de la structure en coude β augmente de 14% pour HSA libre à 15-18% pour les complexes HSA-polyamine, et que la proportion des autres structures augmente de 21% pour HSA libre à 23-26% pour les complexes HSA-polyamine (figure 3.7 et table 3.2). Les données de spectroscopie CD relatives aux changements de conformation sont consistantes avec les résultats de spectroscopie FTIR démontrant une diminution des hélices α et une augmentation des structures β , lorsque la protéine HSA est complexée avec des polyamines analogues (voir figure 3.4 et table 3.1). Il est à noter que les résultats obtenus en CD proviennent de la moyenne effectuée à partir de 3 préparations protéiques différentes.

Les changements de conformation observés en spectroscopie CD et FTIR sont indicatifs d'une dénaturation partielle de la protéine lors de sa complexation avec les polyamines analogues, même Il est important de noter la présence de différences

mineures entre les résultats de CD et de FTIR concernant la conformation protéique (table 3.1 et 3.2). La raison principale expliquant ces différences provient de la préparation des échantillons, dans la mesure où les mesures en FTIR ont été effectuées avec des films hydratés alors que les mesures en CD ont été effectuées en solution aqueuse; de plus, les ratios de concentration des polyamines analogues par rapport à la protéine HSA étaient différents entre les deux techniques spectroscopiques. Des différences similaires ont été également observées entre des mesures de spectroscopie IR et CD pour plusieurs protéines où les préparations des échantillons étaient différentes pour les deux techniques (Goormaghtigh et al. 1990).

Les constantes de liaison des polyamines analogues avec la protéine HSA ont été déterminées en utilisant une méthode de spectroscopie UV-visible; le tracé de la double réciproque de $1/(A - A_0)$ vs $1/(\text{concentration de polyamine analogue})$ est linéaire (où A_0 est l'absorbance initiale de la protéine HSA libre à 280 nm et A est l'absorbance mesurée à différentes concentrations de polyamine), ce qui permet d'estimer la constante de liaison (K) à partir du ratio de l'ordonnée à l'origine sur la pente (figure 3.8). Les résultats en spectroscopie UV-visible présentent un site de liaison pour chaque complexe protéine-polyamine. Les constantes de liaison (K) estimées sont de $9.30 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ pour 333, de $5.63 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ pour BE-333 et de $3.66 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ pour BE-3333. Les K calculées pour les complexes HSA-polyamine analogue démontrent manifestement des interactions non spécifiques entre la protéine et les polyamines analogues, et ce, en comparaison des complexes présentant des interactions protéine-ligand fortes avec des K de l'ordre de 10^6 M^{-1} à 10^8 M^{-1} (Kragh-Hansen 1990, Neault et al. 2000, Gaudreau et al. 2002, Sulkowska 2002, Liu et al. 2004).

La liaison des polyamines analogues (333, BE-333 et BE-3333) et naturelles (putrescine, spermidine et putrescine) avec HSA survient à la surface de la protéine via des interactions par pont H. Toutefois, en se basant sur les K des complexes HSA-polyamine, les polyamines naturelles présentent une affinité plus forte que les polyamines analogues pour la protéine HSA, avec des K de $1.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ pour la

putrescine, de $5.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ pour la spermidine et de $3.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ pour la spermine (Ahmed Ouameur et al. 2004). Le nombre de charges positives associées avec les polyamines naturelles contribuent à la stabilité du complexe formé dans l'ordre spermine > spermidine > putrescine, alors que ce n'est pas le cas pour les polyamines analogues avec l'ordre 333 > BE-333 > BE-3333. Globalement, différentes perturbations dans la structure secondaire protéique ont été observées pour les polyamines naturelles comparativement aux polyamines analogues : premièrement, une diminution supérieure de la proportion d'hélice α de 55% pour HSA libre à 40% pour HSA-spermine, à 43% pour HSA-spermidine et à 40% pour HSA-putrescine (table 3.3), comparativement à 51% pour HSA-333, à 50% pour HSA-BE-333 et à 43% pour HSA-BE-3333 (table 3.1); deuxièmement, une augmentation supérieure de la proportion des structures β induite par les polyamines analogues comparativement aux polyamines naturelles (tableau 3.1 vs table 3.3); troisièmement, une disparition des structures en pelote statistique avec les polyamines analogues qui semblent converties en feuillet β parallèle. Les changements de conformation observés démontrent une dénaturation protéique supérieure induite par les polyamines naturelles versus les polyamines analogues.

Les K des polyamines naturelles (spermine, spermidine et putrescine) restent dans le domaine du millimolaire et du micromolaire, malgré la diminution du nombre de charges positives. Toutefois, les constantes de liaison diminuent plus drastiquement lorsque l'espacement entre les charges positives (tel que pour 333) et la nature des groupes chimiques aux extrémités de la molécule (tel que BE-333) changent, comparativement à la valeur de K associée à la spermine.

Les changements conformationnels induits par 1 mM spermine, spermidine et putrescine se situent dans un domaine comparable (table 3.3), rappelant la capacité bien connue des polyamines naturelles de compenser les unes pour les autres quand l'une se retrouve en quantité insuffisante, comme lorsqu'un inhibiteur est utilisé pour diminuer sélectivement l'une des trois polyamines naturelles. Cependant, les polyamines analogues 333 et BE-333 ont perdu leur habilité à influencer la conformation protéique

comparativement à la spermine à 1 mM de concentration, contrairement à la polyamine analogue BE-3333. Le fait que les changements conformationnels induits par BE-3333 soient similaires à ceux induits par la spermine provient probablement de la présence d'une charge positive additionnelle, lequel effet compense pour la perte des sites de liaison sur les charges positives aux extrémités de la molécule par l'ajout de groupes éthyles. L'effet en question décrit pour la polyamine analogue BE-3333 n'est toutefois pas perceptible au niveau de K qui demeure faible comparativement à celle de la spermine, suggérant que même avec des interactions faibles et non spécifiques, des changements de conformation significatifs peuvent survenir au niveau des protéines.

Bien que les polyamines analogues soient considérées comme des molécules de nature amphiphile, rien ne permet de croire que des interactions non-polaires hydrophobes pourraient être responsables des changements conformationnels observés. La protéine de type globulaire HSA est composée de trois domaines structuraux similaires (I, II et III) contenant chacun deux sous-domaines (A et B), chacun des domaines étant stabilisé par 17 ponts disulfures. Le sous-domaine IIA (une cavité hydrophobe appelée site Sudlow I) lie de préférence de larges composés hétérocycliques comme le coumaphène, alors que le sous-domaine IIIA (une cavité hydrophobe appelée site Sudlow II) lie de petits composés aromatiques comme l'ibuprofène; il existe également plusieurs autres sites qui lient spécifiquement des molécules d'acide gras tel que l'acide myristique (Colmenarejo 2003, Fasano et al. 2005, Ascenzi et al. 2006). Lorsque l'on compare la structure chimique des polyamines analogues à celle du coumaphène, de l'ibuprofène et de l'acide myristique, on observe que le caractère amphiphile des polyamines est fort différent de celui de ces molécules; les polyamines possèdent des charges positives réparties de façon égale sur toute leur structure, ce qui en fait des composés avec une forte charge globale positive contrairement aux autres molécules. Les polyamines analogues ne vont donc pas chercher à se lier dans les cavités hydrophobes de HSA, mais plutôt à effectuer des liaisons de type pont H puisque le tout est plus favorable au niveau thermodynamique.

7.3 Interaction des polyamines avec le photosystème II

Dans les travaux des Chapitres IV, V et VI, les interactions entre les polyamines naturelles diaminopropane (propane-1,3-diamine), putrescine (butane-1,4-diamine), cadaverine (pentane-1,5-diamine), spermidine (N-(3-aminopropyl)butane-1,4-diamine) et spermine (N,N'-bis(3-aminopropyl)butane-1,4-diamine), avec le complexe protéique du PSII ont été caractérisées par spectroscopie FTIR, par dégagement d'oxygène standard, par induction de fluorescence, par thermoluminescence, par cinétique de déclin de fluorescence induite par flash, par électrophorèse, par détermination du manganèse et par dégagement d'oxygène après flash, afin de déterminer le mécanisme d'action au niveau moléculaire de l'inhibition de l'activité du PSII observée en présence des polyamines naturelles spermine et spermidine (Bograh et al. 1997).

La présence de changements majeurs dans la structure secondaire protéique des fractions membranaires purifiées de PSII a été démontrée lors de leurs complexations avec les polyamines naturelles spermine et spermidine (Bograh et al. 1997). Les changements de conformation ont montré une diminution de la proportion des hélices α de 47% (PSII pure) à 35-37% (PSII complexé) en faveur d'une augmentation de la proportion des feuillets β de 11% (PSII pure) à 20-21% (PSII complexé), lesquelles modifications ont causé une inhibition mesurable de l'activité de dégagement d'oxygène au niveau des PSII.

Dans les présents travaux, les résultats de spectroscopie FTIR ont fourni plusieurs données concernant la complexation des autres polyamines naturelles, les diamines diaminopropane, putrescine et cadaverine, avec le complexe protéique du PSII. Le spectre FTIR des fractions membranaires purifiées de PSII présente une bande large de forte intensité à 3298 cm^{-1} , laquelle correspond à la bande protéique amide A attribuable à l'étirement de la liaison N-H (Krimm et Bandekar 1986). Les étirements symétriques et antisymétriques de la liaison C-H des groupes peptidiques sont observés comme trois bandes étroites à 2955 , 2926 et 2870 cm^{-1} dans le spectre du PSII pure (résultat non montré). La bande protéique amide I, attribuable à l'étirement de la liaison C=O, est présente comme une bande de forte intensité à 1653 cm^{-1} , alors que la bande

protéique amide II, principalement attribuable à l'étirement de la liaison C-N et au balancement dans le plan de la liaison N-H, est discernable comme une bande d'intensité moyenne à 1547 cm^{-1} (figure 4.2). Une bande de faible intensité est visible à 1515 cm^{-1} , laquelle est associée aux vibrations de la chaîne latérale de l'acide aminé tyrosine (MacDonald et Barry 1992, Noguchi et al. 1992, Fabian et al. 1994). Les vibrations d'étirement des liaisons lipidiques de type carbonyle-ester sont observables comme une bande d'intensité moyenne à 1735 cm^{-1} (Jackson et Mantsch 1993). Comme les spectres des complexes diamine-PSII ne présentaient pas de déplacement majeur dans les bandes spectrales protéiques amide I, amide II, tyrosine et au niveau des vibrations lipidiques situées entre $1740\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$, les spectres de différence [(PSII + diamine) – (PSII)] ont donc été déterminés pour caractériser la variation d'intensité de chacune de ces bandes. L'autodéconvolution par transformée de Fourier et l'augmentation de la résolution de la dérivée seconde ont ensuite été utilisées pour déterminer les structures secondaires des complexes diamine-PSII.

À faible concentration de diamine ($0,01\text{ mM}$), une variation significative dans l'intensité de la bande protéique amide I, située à 1653 cm^{-1} dans le PSII pure, est démontrée dans les spectres de différence (figure 4.2, section Diff., $0,01\text{mM}$). Les bandes positives observées entre $1650\text{-}1661\text{ cm}^{-1}$ sont attribuées à une augmentation de l'intensité de la bande protéique amide I, laquelle est causée par une interaction des diamines par pont H au niveau des groupes polypeptidiques C=O du PSII. À plus forte concentration de diamine (20 mM), la bande positive observée entre $1650\text{-}1661\text{ cm}^{-1}$ gagne légèrement en intensité tout comme la nouvelle bande visualisée à 1629 cm^{-1} . L'apparition d'une autre bande positive dans la région $1563\text{-}1568\text{ cm}^{-1}$ correspond à une modification de la bande protéique amide II, située à 1547 cm^{-1} dans le PSII pure, produite par la formation des complexes diamine-PSII (figure 4.2, Diff., 20 mM).

L'analyse quantitative de la structure secondaire des fractions membranaires purifiées de PSII et de ses complexes avec chacune des diamines a été réalisée (table 4.1). La structure secondaire protéique du PSII libre est composée à 51% d'hélice α ($1655\text{-}1658\text{ cm}^{-1}$), à 16% de feuillet β (1626 et 1690 cm^{-1}), à 14% de coude β (1670

cm^{-1}) et à 19% de pelote statistique (1640 cm^{-1}). Les diamines n'induisent pas d'altération majeure dans la structure secondaire protéique indépendamment des concentrations utilisées lors de leur complexation avec le PSII. La proportion de structure en coude β diminue légèrement de 14% pour le PSII pure à 12% pour le PSII complexé, en faveur de la structure en feuillet β qui augmente de 10% pour le PSII pure à 14,5% pour le PSII complexé; l'augmentation de la proportion de structure en feuillet β est observable par un accroissement de l'absorbance infrarouge à 1629 cm^{-1} dans les spectres de différence en présence de 20 mM de diamine (figure 4.2, Diff., 20 mM). La constatation précédente témoigne d'une stabilisation structurelle mineure des fractions membranaires purifiées de PSII en présence des diamines diaminopropane, putrescine et cadaverine, contrairement aux changements majeurs de structure secondaire induits par les polyamines spermidine et spermine au niveau du PSII (Bograh et al. 1997).

Malgré le fait qu'elles n'induisent pas de changement significatif dans la structure secondaire du PSII, les diamines diaminopropane, putrescine et cadaverine inhibent l'activité de dégagement d'oxygène des fractions membranaires purifiées de PSII comme dans le cas des polyamines spermidine et spermine. Des concentrations inférieures à 0,5 mM de polyamine naturelle causent déjà une inhibition mesurable du transport d'électron au sein du PSII avec du 2,6-dichlorobenzoquinone (DCBQ) comme accepteur d'électron (figure 4.3, table 4.1 et figure 5.1). Environ 50% de l'activité de dégagement d'oxygène est perdue avec 2 à 3 mM de polyamine, alors que l'inhibition complète du transport d'électron n'est observée qu'autour de 8 à 12 mM pour les diamines, contrairement aux 3 mM nécessaires pour la spermidine et de la spermine. Fait intéressant, une inhibition similaire est observée dans les membranes de thylacoïdes intactes. Toutefois, l'utilisation des fractions membranaires purifiées de PSII représente un système d'étude plus simple et plus spécifique, ne subissant pas d'interférence de la part des autres composantes de la membrane thylacoïde.

Les mesures de l'inhibition de l'activité de dégagement d'oxygène sont indicatives d'un certain degré de stabilisation sur la structure protéique du PSII par les diamines à faibles concentrations (0,01-0,1 mM), alors qu'un certain degré de

perturbation structurelle du PSII survient à concentrations plus élevées (1-20 mM). L'inhibition du transport d'électron causée par les trois diamines est similaire quel que soit la différence dans la longueur de leur chaîne de carbone (figure 4.1). L'inhibition totale de l'activité de dégagement d'oxygène induite par la spermidine et la spermine survient à de plus faibles concentrations que dans le cas des diamines, lequel résultat s'explique par la plus grande charge positive présente sur la spermidine (3+) et la spermine (4+) comparativement aux diamines (2+). Les résultats sont consistants avec les inductions plus importantes des cinétiques de déclin de fluorescence au sein des membranes de thylacoïdes observées lorsque la charge globale des polyamines augmente pour une concentration moléculaire identique (Iordanov et al. 1989). Une plus grande charge positive induit une interaction électrostatique plus forte avec des groupes donneurs protéiques résultant dans des perturbations locales dans la structure protéique.

Les données spectroscopiques présentées relativement aux diamines démontrent que ces molécules se lient aux protéines du PSII par des interactions non spécifiques *via* pont H au niveau des groupes polypeptidiques C=O. Les résultats contrastent avec la liaison covalente de la putrescine et de la spermidine au niveau des protéines de la membrane thylacoïde dans des chloroplastes isolés de *Helianthus tuberosus*, où l'enzyme transglutaminase est présumée impliquée (Del Duca et al. 1995). Les apo protéines des LHC du PSII ont été proposées comme substrats pour la transglutaminase (Del Duca et al. 1994). Les interactions ioniques non spécifiques démontrées dans le présent travail indiquent que la transglutaminase était soit absente des préparations de PSII ou inactive dans les conditions expérimentales utilisées. Les polypeptides D1 et D2 du centre réactionnel du PSII ont démontré une stabilisation contre le stress osmotique dans des feuilles d'avoine supplémentées avec des polyamines (Besford et al. 1993) alors que des résultats similaires ont été obtenus pour les protéines des LHC du PSII dans les feuilles d'orge (Legocka et Zajchert 1999). L'inhibition majeure de l'activité de dégagement d'oxygène observée dans les fractions membranaires purifiées de PSII dans la présente recherche contraste également avec ces résultats publiés. Les interactions entre les diamines et le PSII n'induisent pas de changement conformationnel significatif dans les protéines, bien qu'assez fortes pour inhiber de façon importante l'activité de

dégagement d'oxygène. Tous ces résultats témoignent donc de la probabilité que les protéines affectées par les polyamines soient des polypeptides extrinsèques ou des portions de polypeptides intrinsèques accessibles à la surface des membranes de PSII.

L'effet inhibiteur des polyamines sur l'activité de transport d'électron a été caractérisé plus en détail avec l'analyse des propriétés de fluorescence des Chl dans les fractions membranaires purifiées de PSII. Les paramètres de fluorescence des Chl F_m (la fluorescence maximale observée dans des échantillons préadaptés dans le noir et illuminés avec une lumière rouge actinique) et F_0 (le niveau de fluorescence initial) ont été mesurés avec des PSII traitées avec différentes concentrations en polyamine (figure 4.4 et figure 5.2). Les résultats montrés sont seulement ceux du diaminopropane (figure 4.4) et de la spermidine (figure 5.2), puisque toutes les polyamines présentaient des résultats similaires en induction de fluorescence. La fluorescence initiale F_0 , observée avec les centres réactionnels dans un état ouvert, n'est pas influencée significativement par les polyamines, contrairement à la fluorescence maximale F_m , observée lorsque les centres réactionnels sont dans un état fermé, qui diminue grandement (figure 4.4A). La diminution observée dans les mesures de F_m est située dans le même écart de concentrations que lors des mesures de dégagement d'oxygène (figure 4.3 et figure 5.1). Le déclin dans F_m correspond également à une diminution dans le rendement photochimique maximal des PSII, F_v/F_m , où $F_v = F_m - F_0$ (figure 4.4B) et par le fait même à une diminution dans le ratio F_v/F_0 (figure 5.2A), un paramètre plus sensible au niveau des variations simultanées dans F_m et F_0 pour la détermination du rendement photochimique maximal (Babani et Lichtenthaler 1996, Kaňa et al. 2002, Govindachary et al. 2004); le paramètre F_v/F_0 possède une corrélation linéaire avec la fraction des centres réactionnels de PSII actifs dans un échantillon.

Les propriétés de fluorescence des Chl des PSII en présence des polyamines ont été analysées plus en détail au niveau des cinétiques de l'induction de fluorescence. Les tracés d'induction de fluorescence (figure 4.4C tracé 1 et figure 5.2B tracé 1) illustrent la réduction progressive des quinones localisées du côté accepteur du PSII avec trois phases nommées O-J, J-I et I-P (Zhu et al. 2005, Lazàr 2006). Dans les fractions

membranaires purifiées de PSII, la phase J-I est très faible et seulement les deux autres phases sont observées (Pospisil et Dau 2000, Pospisil et Dau 2002). La première phase (O-J) reflète la réduction de la quinone acceptrice primaire du PSII, Q_A , alors que la seconde phase (I-P, ici J-P) est attribuée à la réduction du pool de PQ combinée à celle de la quinone acceptrice secondaire Q_B . Le traitement des PSII avec les polyamines provoque une atténuation importante de l'induction de fluorescence observable par une phase O-J affaiblie, toute montée de fluorescence postérieure étant fortement inhibée (figure 4.4C tracé 2 et figure 5.2B tracé 2). Des tracés similaires ont été obtenus antérieurement pour des fractions membranaires purifiées de PSII et ont été indicatifs d'un démantèlement du COE (Zhu et al. 2005). Les présents résultats de l'induction de fluorescence témoignent probablement d'une incapacité du COE à fournir des électrons au PSII pour réduire ses quinones acceptrices.

Pour valider cette interprétation, le donneur d'électron artificiel diphénylcarbazine (DPC) a été utilisé pour restaurer les cinétiques d'induction de fluorescence dans les échantillons de PSII traités avec des polyamines (figure 4.4C tracé 3 et figure 5.2B tracé 3). L'utilisation du DPC a permis de renverser partiellement l'effet d'inhibition du transport d'électron induit par les polyamines dans le PSII, comme démontré par le recouvrement significatif de l'induction de fluorescence. Le DPC a réussi à fournir des électrons au PSII, bien qu'à un taux plus lent comparativement au COE natif. Le DPC peut donner des électrons seulement lorsque les polypeptides extrinsèques associés avec le COE sont perdus du côté lumen du PSII et que le complexe de manganèse nécessaire à l'hydrolyse de l'eau est dysfonctionnel (Ghirardi et al. 1996). L'action positive du DPC indique ainsi que le COE présente de fortes perturbations en présence des polyamines.

Pour clarifier l'étendue de l'action des polyamines sur le COE, des électrophorèses sur gel de polyacrylamide ont été effectuées avec des PSII traités avec des polyamines. Les fractions membranaires purifiées de PSII ont été incubées pendant 5 minutes avec des polyamines avant d'être centrifugées pour séparer les fractions membranaires des polypeptides qui ont été potentiellement relâchés dans le surnageant.

Les profils polypeptidiques sont montrés pour la spermidine (figure 5.3, panneau supérieur). Des résultats similaires ont été obtenus pour les PSII incubées avec les autres polyamines (résultats non montrés). Les polypeptides présents dans les fractions membranaires de PSII traités avec la spermidine sont démontrés dans la colonne 3; fait notable, trois polypeptides sont perdus au niveau des positions apparentes correspondant aux polypeptides extrinsèques bien connus de poids moléculaire de 17, 23 et 33 kDa associés avec le COE (Seidler 1996), observables dans les préparations natives de PSII non traitées avec des polyamines dans la colonne 2. Le profil polypeptidique du surnageant obtenu avec les PSII traités avec la spermidine confirme également le relâchement de ces trois polypeptides dans la colonne 4. Environ 50% des polypeptides de 33 kDa sont perdus lorsque les fractions membranaires purifiées de PSII (à 100 µg Chl/mL) sont traitées avec 8 mM de spermidine (figure 5.3, panneau inférieur), résultat correspondant aux 2 mM de spermidine (figure 5.1) utilisés pour inhiber 50% de l'activité de dégagement d'oxygène des PSII (25 µg Chl/mL); il y a donc une corrélation entre le relâchement des protéines extrinsèques et la perte de l'activité de dégagement d'oxygène dans les PSII.

Les fractions membranaires purifiées de PSII ont également été soumises au traitement Tris-Alkali qui relâche spécifiquement les trois polypeptides extrinsèques du COE (Nakatani 1984). Le surnageant des fractions membranaires de PSII traitées au Tris-Alkali observable dans la colonne 5 (figure 5.3, panneau supérieur) contient des polypeptides avec des distances de migration coïncidant avec celles du surnageant des fractions membranaires de PSII traitées avec des polyamines, lequel est observable dans la colonne 4. Les bandes représentant ces polypeptides sont faiblement vues dans le profil protéique du culot des fractions membranaires de PSII soumises au traitement Tris-Alkali observable dans la colonne 6. L'interaction des polyamines avec les fractions membranaires purifiées de PSII cause effectivement le relâchement des protéines extrinsèques du PSII associées avec le COE.

La thermoluminescence a été utilisée pour caractériser les processus de recombinaison des charges dans les fractions membranaires purifiées du PSII en

présence de polyamines. Pour initier la séparation de charge, les PSII sont pré-illuminés à 0°C avec un seul flash actinique blanc de 1 μ s. Les résultats sont montrés pour la spermine (figure 5.4). Des résultats similaires ont été obtenus pour les PSII incubées avec les autres polyamines (résultats non montrés). Avec un accroissement linéaire de la température à un taux de 0,5°C/s, l'amplitude du signal de thermoluminescence a rapidement augmenté pour atteindre son maximum (T_m) à 25°C dans les échantillons contrôles (figure 5.4A, tracé 1). La bande majeure d'émission observée correspond à la bande B attribuable à la recombinaison entre Q_B^- et le complexe de managanèse oxydé de façon prédominante dans l'état S_2 (Sane 2004). Le T_m de la bande B des échantillons contrôles de PSII non gelés est consistant avec les températures maximales pour les mêmes préparations montrées antérieurement (Homann 1999). La bande B est progressivement abolie lorsque la concentration en polyamine augmente (figure 5.4A, tracés 2-5). La bande B est également accompagnée par un petit décalage du T_m vers des températures plus élevées. Les changements dans l'amplitude et le T_m de la bande B peuvent être reliés à des changements dans les propriétés des états S du complexe de manganèse ou dans l'inhibition de la réduction de Q_B en présence des polyamines.

Pour séparer les effets des polyamines sur le transfert des deux électrons impliquant le couple Q_B/Q_B^- , l'inhibiteur 3-(3',4'-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée (DCMU) a été utilisé pour prévenir le transfert des électrons entre Q_A^- et Q_B . En présence de DCMU, une bande lumineuse majeure avec un T_m de 18°C est apparue (figure 5.4B, tracé 1). La nouvelle bande majeure d'émission observée est la bande Q qui provient du refoulement des électrons de Q_A^- vers l'état S_2 (Homann 1999). Le T_m de la bande Q est légèrement plus haut à la concentration de Chl utilisée (25 μ g Chl/mL) comparativement aux valeurs publiées dans la littérature; un T_m de 5-10°C est mesurable dans les échantillons contrôles de PSII lorsque le milieu d'analyse contient environ 200 μ g Chl/mL. De plus, une bande lumineuse mineure avec un T_m de 50°C est apparue dans les échantillons contrôles de PSII en présence de DCMU (figure 5.4B, tracé 1). La bande mineure d'émission observée est la bande C qui est attribuée à la recombinaison entre Q_A^- et la forme oxydée de la Tyr_D (Vass et Govindjee 1996). En présence de polyamines, la bande Q est décalée à des températures supérieures. De plus, l'intensité

des bandes Q et C diminue progressivement de façon similaire lorsque la concentration en polyamine augmente (figure 4B, encart). Les résultats démontrent que l'effet inhibiteur des polyamines sur la recombinaison des charges est principalement dû à la perte des partenaires du côté donneur du PSII pour les différentes voies de recombinaison décrites précédemment.

Bien que tous les résultats obtenus pointent vers un problème du côté donneur du PSII pour expliquer l'effet inhibiteur des polyamines sur l'activité du PSII, quelques mesures ont été effectuées pour vérifier la possibilité d'une conséquence quelconque du côté accepteur. Lors des mesures d'induction de fluorescence, les tracés ont été normalisés simultanément aux valeurs minimales et maximales (tracés Vt). La montée de fluorescence est plus rapide dans les tracés Vt des fractions membranaires purifiées de PSII incubées avec 4 et 7 mM de spermidine (figure 5.2C, tracés 3 et 4), comparativement aux PSII non traités ou incubés avec 2 mM de spermidine (figure 5.2C, tracés 1 et 2). Des résultats similaires ont été obtenus pour les PSII incubées avec les autres polyamines (résultats non montrés). L'explication la plus plausible est que la réoxydation Q_A^- par Q_B dans les fractions membranaires purifiées de PSII soit retardée dans une certaine mesure en présence des polyamines.

Les propriétés de fluorescence des PSII soumis à un seul flash actinique ont été analysées pour déterminer l'effet des polyamines sur le côté accepteur du PSII. Les cinétiques de déclin de fluorescence des fractions membranaires purifiées de PSII en présence de spermine sont montrées sur une échelle logarithmique (figure 5.5). Des résultats similaires ont été obtenus pour les PSII incubées avec les autres polyamines (résultats non montrés). La montée de fluorescence induite par le flash est due à la réduction de Q_A et le déclin subséquent dans le noir est relié à la réoxydation de Q_A^- (Putrenko et al. 1999). L'analyse qualitative démontre que l'amplitude totale de la montée de fluorescence diminue au fur et à mesure que la concentration en spermine augmente, alors que le déclin de la fluorescence dans le noir est visiblement plus lent.

L'analyse quantitative du déclin de la fluorescence dans le noir dans les échantillons de PSII est modélisée selon une équation à trois fonctions exponentielles. L'amplitude et le temps de demi-vie de chacune des composantes sont démontrés pour les fractions membranaires purifiées de PSII traités avec la spermine (table 5.1). La composante rapide avec un temps de demi-vie de $\sim 0,66$ ms est associée à la réoxydation de Q_A^- par Q_B . La phase moyenne avec un temps de demi-vie de $\sim 9,49$ ms est attribuée à la réoxydation de Q_A^- dans les centres réactionnels de PSII avec une poche Q_B vide, où le temps de diffusion d'une molécule de PQ vers son site de liaison doit être considéré (Putrenko et al. 1999). La phase lente est associée à la fluorescence constante de fond dans le cas présent, puisqu'un temps plus court d'environ 290 ms a été utilisé pour les mesures de déclin de fluorescence. En présence de 1 mM de spermine, le temps de demi-vie de la composante rapide augmente grandement comparativement à l'échantillon contrôle. Avec des concentrations supérieures en spermine, la composante rapide est complètement perdue (table 5.1). Le résultat confirme que la réoxydation de Q_A^- est plus lente dans les échantillons traités avec les polyamines, puisque le transfert d'électron entre Q_A^- et Q_B est grandement retardé.

L'ensemble des résultats présentés dans cette section a démontré clairement une inhibition du transport d'électron dans les fractions membranaires purifiées de PSII induite par des concentrations de l'ordre du millimolaire des polyamines naturelles diaminopropane, putrescine, cadaverine, spermidine et spermine. La diamine putrescine avait auparavant montré une capacité naturelle à améliorer le transport d'électron d'une manière similaire au Mg^{2+} dans les membranes de chloroplastes pauvres en sels par son effet coulombique (Ioannidis et al. 2006); toutefois, cet effet cationique a été évité par l'utilisation de cations en concentrations physiologiques dans les présents travaux. Les données spectroscopiques en FTIR ont démontré que les polyamines se lient aux protéines du PSII par des interactions de type pont H au niveau des groupes polypeptidiques C=O. Les diamines diaminopropane, putrescine et cadaverine n'ont pas causé d'altération significative dans la structure secondaire protéique du PSII contrairement à la triamine spermidine et à la tétraamine spermine (Bograh et al. 1997). Les différences structurales majeures qui ont été observées dans les PSII traités avec la

spermidine et la spermine sont relatives à la plus grande charge positive de ces polyamines comparativement aux diamines, laquelle conduit en une interaction électrostatique cation-protéine plus forte, induisant donc des perturbations plus importantes dans la structure secondaire protéique. Malgré ces distinctions, toutes les polyamines étudiées ont interagi significativement avec le côté lumen du photosystème II causant le relâchement des trois polypeptides extrinsèques de 17, 23 et 33 kDa associés avec le COE. L'action inhibitrice des polyamines a aussi été observée dans des membranes complètes de thylacoïde démontrant que les polyamines peuvent diffuser dans la lumière du thylacoïde comme décrit antérieurement pour la putrescine (Ioannidis et al. 2006). Les cations divalents comme le Cu^{2+} , le Cd^{2+} , le Hg^{2+} , le Zn^{2+} et le Pb^{2+} sont également connus pour relâcher les polypeptides extrinsèques du PSII dans une certaine mesure (Rashid et al. 1994, Bernier et Carpentier 1995, Jegerschöld et al. 1995, Yruela et al. 2000), démontrant à première vue que les polyamines peuvent interagir de façon similaire aux cations inorganiques sur cet aspect.

Les deux polypeptides extrinsèques de 17 et 23 kDa modulent l'affinité du Ca^{2+} pour son site de liaison dans le COE (Ghanotakis et al. 1984, Adelroth et al. 1995). Par conséquent, le calcium est perdu lorsque ces deux protéines formant une barrière entre le lumen et le site de liaison du Ca^{2+} (Yocum 1991) sont relâchées du COE par l'action des polyamines. Le polypeptide extrinsèque de 33 kDa, aussi connu comme la protéine stabilisatrice du manganèse, est important pour le maintien de l'intégrité et de la fonction du complexe de manganèse impliqué dans l'oxydation de l'eau (Bricker et Frankel 1998). En son absence, deux des quatre atomes de manganèse sont souvent relâchés et l'activité de dégagement d'oxygène est perdue à moins que des concentrations élevées de chlore soient ajoutées (100 mM). Toutefois, dans les présents travaux, il a été vérifié par spectroscopie d'absorption atomique qu'aucun atome de manganèse n'est relâché des fractions membranaires purifiées de PSII traitées à des concentrations élevées en polyamine (données non montrées). De plus, l'inhibition ne peut pas être renversée par du CaCl_2 (données non montrées) comme dans le cas des cations inorganiques divalents (Rashid et al. 1994, Bernier et Carpentier 1995,

Jegerschöld et al. 1995, Yruela et al. 2000). L'inhibition du transport d'électron dans le PSII causée par les polyamines est donc différente de celles des métaux lourds toxiques.

Le relâchement des trois polypeptides extrinsèques en présence des polyamines et le désassemblage conjoint du COE ont modifié le transport d'électron dans les fractions membranaires purifiées de PSII. En effet, les mesures d'induction de fluorescence ont démontré un manque d'approvisionnement en électron nécessaire pour réduire les quinones acceptrices du PSII. L'altération du COE a été mise en évidence par un recouvrement partiel des phases O-J et J-P avec le DPC comme donneur d'électron. Le DPC est reconnue pour accéder à son site de photooxydation près de la Tyr_Z⁺ seulement lorsque le COE est dysfonctionnel (Ghirardi et al. 1996). Ainsi, même si le complexe de manganèse n'est pas perdu, il est désorganisé par l'action des polyamines.

La perturbation du complexe de manganèse a également été démontrée par les mesures de thermoluminescence. L'affaiblissement de la réoxydation des quinones à travers la recombinaison de charges dans les centres réactionnels des PSII a été révélé par la perte dépendante des bandes B et Q sous l'action des polyamines. Le résultat indique que l'état S₂ du complexe de manganèse nécessaire pour la recombinaison a été perdu suite à la perturbation du COE. Un décalage vers des températures supérieures au niveau du T_m des bandes de thermoluminescence dans les fractions membranaires purifiées de PSII a été associé antérieurement avec un environnement anormal du ligand du complexe de manganèse (Homann et Madabusi 1993). De plus, une augmentation importante du T_m de la bande Q a été démontrée auparavant dans les PSII exempts de Cl⁻ et de polypeptide de 33 kDa, lequel effet a été associé à une stabilisation plus forte de l'état S₂ du complexe de manganèse (Vass et al. 1987). Dans le cas présent, le décalage dans le T_m des bandes B et Q pourrait par conséquent originer d'une population de centres réactionnels de PSII où le complexe de manganèse est stabilisé dans un état S₂ par les polyamines, représentant une étape intermédiaire dans la désorganisation du COE. Au contraire, les résultats de dégagement d'oxygène après flash dans les membranes de thylacoïdes intactes (chapitre VI) démontrent que la proportion de l'état S₂, et donc sa stabilisation, n'est pas augmentée en présence de polyamines.

Les tracés normalisés aux valeurs minimales et maximales (V_t) dans les mesures d'induction de fluorescence ont révélé que l'induction est relativement rapide à concentration élevée de polyamine, reflétant un taux réduit de réoxydation de Q_A^- . Les mesures de déclin de fluorescence induit par flash ont démontré que les temps de demi-vie pour la réoxydation de Q_A^- augmentent avec des concentrations élevées en polyamines. Les deux résultats précédents ont prouvé clairement que le transfert d'électron entre Q_A^- et Q_B est retardé. L'amplitude totale de la montée de fluorescence induite par flash a aussi été diminuée par les polyamines. La perte apparente de l'amplitude de fluorescence indique un déclin rapide de la fluorescence qui survient bien avant le début des mesures de déclin de fluorescence après 100 μ s. Le déclin dans le rendement de fluorescence induite par flash est probablement dû à une recombinaison entre Q_A^- et $P680^+$ dans une fraction des centres réactionnels de PSII. Les centres réactionnels de PSII avec $P680^+$ sont connus pour avoir un rendement de fluorescence proche de F_0 (Deprez et al. 1983). L'accumulation de $P680^+$ après un seul flash actinique est observé seulement lorsque le transfert d'électron entre le donneur primaire Tyr_Z et le $P680^+$ est retardé ou inhibé (Britt 1996). Le déclin dans le taux de transfert d'électron de la Tyr_Z au $P680^+$ dans les centres réactionnels de PSII ayant perdu l'intégrité de leur COE est consistant avec les données structurales indiquant que la Tyr_Z est localisée à proximité du complexe de manganèse (Iwata et Barber 2004, Loll et al. 2005). Par conséquent, l'orientation spécifique de la Tyr_Z et/ou sa déprotonation nécessaire pour le transfert d'électron vers $P680^+$ sont significativement altérées (Christen et Renger 1999). La présence d'une interaction directe entre les polyamines et la Tyr_Z peut être également évoquée pour expliquer les résultats observés, puisqu'elles n'interagissent pas avec le complexe de manganèse comme démontré préalablement (chapitre VI).

La restauration de la photoréduction des quinones dans les fractions membranaires purifiées de PSII par le DPC n'a pas surmonté le transfert d'électron plus lent de la Tyr_Z vers $P680^+$ ou de Q_A^- vers Q_B . L'induction de fluorescence a été partiellement recouverte avec ce donneur d'électron, bien que grandement retardée dans l'ordre des millisecondes à cause des réactions plus lentes au niveau du transport des électrons, combinées à la donation plus faible d'électron par le DPC à la Tyr_Z comparativement au COE natif. La

présence d'un site de liaison pour les polyamines près des quinones du côté stroma du PSII pourrait possiblement expliquer le transfert d'électron retardé entre Q_A^- et Q_B . Toutefois, il a été démontré antérieurement que le relâchement du calcium du COE modifie le point milieu du potentiel redox de Q_A et affecte le transfert d'électron entre Q_A^- et Q_B (Krieger et al. 1993, Pospisil et Tyystjarvi 1999). L'augmentation des temps de demi-vie pour la réoxydation de Q_A^- a été observée dans les fractions membranaires purifiées de PSII avec un COE désorganisé, tel que des PSII traités avec du NaCl qui perdent leurs polypeptides extrinsèques de 17 et 23 kDa conjointement avec leur atome de calcium (Putrenko et al. 1999). Les résultats observés ont été expliqués par un changement conformationnel transmembranaire modifiant le côté accepteur du PSII, lequel reflète un accouplement allostérique à longue portée avec le COE. Dans les présents travaux, l'altération observée du côté stroma du PSII est donc visiblement une conséquence d'un effet transmembranaire dans les PSII traités avec des polyamines, puisque les polycations affectent grandement l'intégrité du COE.

Les informations structurelles récentes concernant le côté stroma des PSII de cyanobactéries indiquent que la poche Q_B est formée par plusieurs polypeptides transmembranaires incluant le polypeptide D1, le cytochrome b_{559} , la protéine PsbL et la protéine PsbJ (Loll et al. 2005). Le cytochrome b_{559} a été proposé comme un accepteur d'électron alternatif prévenant la réduction excessive du côté accepteur du PSII et comme un donneur d'électron auxiliaire pour les chlorophylles oxydées du centre réactionnel (Poulson et al. 1995, Faller et al. 2001). Le cytochrome est principalement dans un état à haut potentiel dans les complexes de PSII avec un COE intact, mais transformé dans un état à faible potentiel lorsque le COE est endommagé (Roncel et al. 2001). Les protéines PsbL et PsbJ ont démontré la capacité de réguler le transfert d'électron vers le pool de PQ avec PsbJ comme régulateur spécifique de l'oxydation de Q_A^- (Ohad et al. 2004). Les polypeptides PsbL et PsbJ sont également impliqués dans l'assemblage du COE (Suorsa et al. 2004) et, conjointement avec D1 et le cytochrome b_{559} , créent donc un lien direct entre les fonctions du PSII du côté lumen et du côté stroma du PSII. L'altération de la conformation de ces structures du côté lumen du PSII par l'interaction des polyamines, aussi mineure soit-elle dans le cas des diamines

diaminopropane, putrescine et cadaverine contrairement aux polyamines spermidine et spermine, provoque visiblement un changement de conformation allostérique du côté stroma du PSII qui affecte également la chaîne de transport des électrons dans cette partie du photosystème.

7.4 Perspectives de recherche

La première partie du travail a mis en évidence que les polyamines analogues 333, BE-333 et BE-3333 se lient non spécifiquement par pont H au niveau des groupes polaires C=O de HSA, avec une affinité inférieure aux polyamines naturelles; la structure générale de la protéine HSA est ainsi moins perturbée par les polyamines analogues que par les polyamines naturelles. Les données démontrent clairement que les polyamines n'ont pas une affinité pour HSA comparable à plusieurs médicaments reconnus pour se lier spécifiquement dans un domaine particulier de la protéine. La présence d'une affinité de liaison élevée entre un médicament et HSA est habituellement essentielle pour solubiliser et distribuer efficacement le médicament dans l'organisme, mais une affinité trop forte peut affecter négativement cette distribution et augmenter drastiquement la concentration du médicament à un niveau toxique pour l'organisme (Neault et al. 2000, Ascenzi et al. 2006).

Dans le cas présent, les interactions entre HSA et les polyamines analogues ont été caractérisées sans l'interférence des autres molécules, de nature endogène ou exogène au corps humain, reconnues pour interagir avec la protéine. Il serait donc intéressant de caractériser les interactions des polyamines analogues avec HSA en présence de molécules endogènes tel que les hormones thyroïdiennes (Cheng et al. 1981) et le cholestérol (Ha et al. 2003), de même qu'en présence de molécules exogènes se liant à HSA tel que l'ibuprofène et le diazépam (Ascenzi et al. 2006), de façon à comparer l'affinité de liaison des polyamines déterminée dans un système *in vitro* face à un système beaucoup plus *in vivo*. Dans une autre perspective, les interactions entre les polyamines analogues et d'autres protéines de transport pourraient être analysées, tel que des lipoprotéines, des porines ou des ATPases vacuolaires (Garret et Grisham 2000), afin de comparer l'interaction des polyamines entre différentes protéines de transport.

La deuxième partie du travail a mis en évidence que les polyamines naturelles diaminopropane, putrescine, cadaverine, spermidine et spermine induisent une inhibition de l'activité du PSII dans l'ordre du millimolaire. L'inhibition provient de l'interaction des polyamines par pont H au niveau des groupes polypeptidiques C=O du côté lumen du PSII, laquelle interaction ionique déstabilise le CDO en causant le relâchement des trois protéines extrinsèques mais non du complexe de manganèse. Il est reconnu que les polyamines se trouvent dans des concentrations proches du millimolaire dans des feuilles de végétaux non soumis à des conditions de stress (Galston 2001), et que ces niveaux endogènes de polyamines augmentent grandement lorsque les plantes subissent un stress (Besford et al. 1993, Sfichi et al. 2004). La sensibilité du PSII à la photoinhibition augmente en conditions de stress; le spectre d'action de la photoinhibition indique que celle-ci débute au niveau du complexe de manganèse avant la formation des ROS qui causent la détérioration des autres composantes de la membrane photosynthétique (Ohnishi et al. 2005). Il est donc possible que l'inhibition de l'activité du PSII causée par l'augmentation de la concentration en polyamine dans le lumen face au stress serve à protéger le PSII d'une dégradation excessive par la lumière.

Pour vérifier cette hypothèse, des mesures de photoinhibition en présence des polyamines pourraient être effectuées pour déterminer si les polyamines contribuent à protéger les PSII des dommages causés par la forte lumière. Il serait ainsi intéressant d'examiner la fonctionnalité des centres réactionnels par induction de fluorescence, l'état des chlorophylles par spectre d'absorption, la structure du complexe protéique par FTIR ou CD et le taux de dégradation du PSII par immunoblot (Govindachary et al. 2004, Rajagopal et al. 2005). Alternativement, des expériences de reconstitution des PSII (Ono et Inoue 1984) traités par des polyamines pourraient être menées pour démontrer si la purge de l'excès des polyamines permet le recouvrement de l'activité du PSII, appuyant ainsi l'hypothèse que les polyamines aient un rôle à jouer dans la protection des PSII contre les dommages par la lumière.

BIBLIOGRAPHIE

Adelroth, P., Lindberg, K., Andreasson, L. E. (1995) "Studies of Ca_2^+ binding in spinach photosystem II using $^{45}\text{Ca}^{(2+)}$ ", *Biochemistry* 34: 9021-9027.

Ahmed, A., Carpentier, R., Tajmir-Riahi, H. A. (1995) "A quantitative secondary structure analysis of the 33 kDa extrinsic polypeptide of photosystem II by FTIR spectroscopy", *FEBS Lett.* 363: 65-68.

Ahmed Ouameur, A., Mangier, E., Diamantoglou, S., Rouillon, R., Carpentier, R., Tajmir-Riahi, H. A. (2004) "Effect of organic and inorganic polyamine cations on the structure of human serum albumin", *Biopolymers* 73 : 503-509.

Alcázar, R., Francisco, M., Cuevas, J. C., Patron, M., Ferrando, A., Carrasco, P., Tiburcio, A. F., Altabella, T. (2006) "Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress", *Biotechnol. Lett.* 28: 1867-1876.

Alhonen-Hongisto, L., Seppanen, P., Janne, J. (1980) "Intracellular putrescine and spermidine deprivation induces increased uptake of the natural polyamines and methylglyoxal bis(guanyldrazone)", *Biochem. J.* 192: 941-945.

Andreadakis, A., Kotzabasis, K. (1996) "Changes in the biosynthesis and catabolism of polyamines in isolated plastids during chloroplast photodevelopment", *J. Photochem. Photobiol.* 33: 163-170.

Ascenzi, P., Bocedi, A., Notari, S., Fanali, G., Fesce, R., Fasano, M. (2006) "Allosteric modulation of drug binding to human serum albumin", *Mini-Review in Medicinal Chemistry* 6: 483-489.

Babani, F., Lichtenthaler, H. K. (1996) "Light-induced and age-dependent development of chloroplasts in etiolated barley leaves as visualized by determination of photosynthetic pigments, CO_2 assimilation rates and different kinds of chlorophyll fluorescence ratios," *J. Plant Physiol.* 148: 555-566.

Bais, H. P., Ravishankar, G. A. (2002) "Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications", *Plant Cell Org. Tissue Cult.* 69: 1-34.

Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schliefer, K. H. (1992) "The Prokaryotes", Springer-Verlag, Berlin.

Bamford, V. A., Bruno, S., Rasmussen, T., Appia-Ayme, C., Cheesmann, M. R., Berks, B. C., Hemmings, A. M. (2002) "Structural basis for the oxidation of thiosulfate by a sulfur cycle enzyme", *The EMBO Journal* 21: 5599-5610.

Barber, J. (2006) "Photosystem II: an enzyme of global significance", *Biochem. Soc. Trans.* 34: 619-631.

Beauchemin, R., Gauthier, A., Harnois, J., Boisvert, S., Govindachary, S., Carpentier, R. (2007) "Spermine and spermidine inhibition of photosystem II: disassembly of the oxygen evolving complex and consequent perturbation in electron donation from Tyr_Z to P680⁺ and the quinone acceptors Q_A⁻ to Q_B", *Biochim. Biophys. Acta* 1767: 905-912.

Beigbeder, A., Vavarakis, M., Navakoudis, E., Kotzabasis, K. (1995) "Influence of polyamine inhibitors on light-independent and light-dependent chlorophyll biosynthesis and on the photosynthetic rate", *J. Photochem. Photobiol.* 28: 235-242.

Ben-Shem, A., Frolov, F., Nelson, N. (2003) "The crystal structure of plant Photosystem I", *Nature* 426: 630-635.

Bernier, M., Carpentier, R. (1995) "The action of mercury on the binding of the extrinsic polypeptides associated with the water oxidizing complex of photosystem II", *FEBS Lett.* 360: 251-254.

Berthold, D. A., Babcock, G. T., Yocum, C. F. (1981) "A highly resolved oxygen evolving photosystem II preparation from spinach thylakoids membrane. EPR and electron transport properties", *FEBS Lett.* 134: 231-234.

Besford, R., Richardson, C., Campos, J., Tiburcio, A. F. (1993) "Effect of polyamines on stabilization complexes in thylakoid membranes of osmotically stressed oat leaves", *Planta* 189: 201-206.

Bettuzzi, S., Duvalli, P., Astancolle, S., Pinna, C., Roncagliab, R., Boraldia, F., Tiozzoa, R., Sharrardc, M., Cortia, A. (1999) "Coordinate changes of polyamine metabolism regulatory proteins during the cell cycle of normal human dermal fibroblasts", *FEBS Lett.* 446: 18-22.

Blankenship, R. E. (2002) "Molecular mechanisms of photosynthesis", Blackwell Science Ltd, Cornwall.

Bograh, A., Carpentier, R., Tajmir-Riahi, H. A. (1999) "The effect of cholesterol on the solution structure of proteins of photosystem II. Protein secondary structure and photosynthetic oxygen evolution", *J. Colloid Interface Sci.* 210 : 118-122.

Bograh, A., Gingras, Y., Tajmir-Riahi, H. A., Carpentier, R. (1997) "The effects of spermine and spermidine on the structure of photosystem II proteins in relation to inhibition of electron transport", *FEBS Lett.* 402: 41-44.

Boisvert, S., Joly, D., Leclerc, S., Govindachary, S., Harnois, J., Carpentier, R. (2007) "Inhibition of the oxygen-evolving complex of photosystem II and depletion of extrinsic polypeptides by nickel", *Biometals* 20: 879-889.

- Bondarava, N., Beyer, P., Krieger-Liszkay, A. (2005) "Function of the 23 kDa extrinsic protein of photosystem II as a manganese binding protein and its role in photoactivation", *Biochim. Biophys. Acta* 1708: 63-70.
- Borrel, A., Bestford, T., Altabella, T., Masgrau, C., Tiburcio, A. F. (1996) "Regulation of arginine decarboxylase by spermine in osmotically-stressed oat leaves", *Physiol. Plant* 98: 105-110.
- Bors, W., Langebartels, C., Michel, C., Sandermann, J. H. (1989) "Polyamine as radical scavengers and protectants against ozone damage", *Phytochemistry* 28: 1589-1595.
- Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F., Martin-Tanguy, J. (1999) "Polyamines and environmental challenges: recent development", *Plant Science* 140: 103-125.
- Boulkanz, L., Balcar, N., Baron, M. H. (1995) "FT-IR Analysis for Structural Characterization of Albumin Adsorbed on the Reversed-Phase Support RP-C₆", *Applied Spectroscopy* 49: 1737-1746.
- Bramanti, E., Benedetti, E. (1996) "Determination of the secondary structure of isomeric forms of human serum albumin by a particular frequency deconvolution procedure applied to Fourier transform IR analysis", *Biopolymers* 38: 639-653.
- Bricker, T. M., Frankel, L. V. (1998) "The structure and function of the 33 kDa extrinsic protein of photosystem II: a critical assessment", *Photosynth. Res.* 56: 157-173.
- Britt, R. D. (1996) "Oxygen evolution", in *Oxygenic photosynthesis: the light reactions*, D. R. Ort, C. Yocum (éditeurs), Kluwer academic publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 137-164.
- Brosché, M., Strid, A. (2003) "Molecular event following perception of ultraviolet-B radiation by plants", *Physiol. Plant* 117: 1-10.
- Bryant, D. A. (1994) "The molecular biology of cyanobacteria", Kluwer Academic Press, Dordrecht.
- Bukhov, N., Carpentier, R. (2004) "Alternative photosystem I-driven electron transport routes: mechanisms and functions", *Photosynth. Res.* 82: 17-33.
- Burns, T. F., El-Diery, W. S. (1999) "The p53 pathway and apoptosis", *J. Cell Physiol.* 181: 231-239.
- Byler, D. M., Susi, H. (1986) "Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra", *Biopolymers* 25 : 469-487.
- Campbell, N. A. (1995) "Biologie", traduction de la 3^{ème} édition américaine, Éditions du Renouveau Pédagogique Inc., Québec, Canada, pp. 199-217.

- Capell, T., Bassie, L., Christou, P. (2004) "Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress", *Proc. Natl. Acad. Sci.* 10: 9909-9914.
- Capell, T., Escobar, H., Liu, H., Burtin, D., Lepri, O., Christou, P. (1998) "Overexpression of the oat arginine decarboxylase cDNA in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) affects normal development patterns in vitro and results in putrescine accumulation in transgenic plants", *Theor. Appl. Genet.* 97: 246-254.
- Carter, D. C., Ho, J. X. (1994) "Structure of serum albumin", *Adv. Protein Chem.* 45: 153-203.
- Cheng, S. Y., Rakhit, G., Erard, F., Robbins, J., Chignell, C. F. (1981) "A spin label study of the thyroid hormone-binding sites in human plasma thyroxine transport proteins", *J. Biol. Chem.* 256: 831-836.
- Childs, A. C., Mehta, D. J., Gerner, E. W. (2003) "Polyamine-dependent gene expression", *Cell. Mol. Life Sci.* 60: 1394-1406.
- Christen, G., Renger, G. (1999) "The role of hydrogen bonds for the multiphasic P680⁺ reduction by Y_Z in photosystem II with intact oxygen evolution capacity. Analysis of kinetic H/D isotope exchange effects", *Biochemistry* 38: 2068-2077.
- Coleman, C. S., Wallace, H. M. (1990) "Polyamine excretion from human cancer cells", *Biochem. Soc. Trans.* 18: 1228-1229.
- Colmenarejo, G. (2003) "In silico prediction of drug-binding strengths to human serum albumin", *Med. Res. Rev.* 23: 275-301.
- Criss, W. E. (2003) "A review of polyamines and cancer", *Turk J. Med. Sci.* 33: 195-205.
- Curry, S., Brick, P., Frank, N.P. (1999) "Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies", *Biochim. Biophys. Acta* 1441: 131-140.
- Dekker, J. P., Boekema, E. J. (2005) "Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants", *Biochim. Biophys. Acta* 1706: 12-39.
- Del Duca, S., Beninati, S., Serafini-Fracassini, D. (1995) "Polyamines in chloroplasts: identification of their glutamyl and acetyl derivatives", *Biochem. J.* 305: 233-237.
- Del Duca, S., Tidu, V., Bassi, R., Esposito, C., Serafini-Fracassini D. (1994) "Identification of chlorophyll-a/b proteins as substrates of transglutaminase activity in isolated chloroplast of *Helianthus tuberosus*", *Planta* 193: 283-289.

Deprez, J., Dobek, A., Geaeintov, N. F., Paillotin, G., Breton, J. (1983) "Probing fluorescence induction in chloroplasts on a nanosecond time scale utilizing picosecond laser pulse pairs", *Biochim. Biophys. Acta* 725: 444-454.

Dörnemann, D., Navakoudis, E., Kotzabasis, K. (1996) "Changes in the polyamine content of plastidal membranes in light- and dark-grown wildtype and pigment mutants of the unicellular green alga *Scenedesmus obliquus* and their possible role in chloroplast photodevelopment", *J. Photochem. Photobiol.* 36: 293-299.

Ducruet, J. M. (2003) "Chlorophyll thermoluminescence of leaf discs: simple instruments and progress in signal interpretation open the way to new ecophysiological indicators", *J. Exp. Bot.* 54: 2419-2430.

Ducruet, J.M., Miranda, T. (1992) "Graphical and numerical analysis of thermoluminescence and fluorescence F_0 emission in photosynthetic material", *Photosynth. Res.* 33: 15-27.

Endicott, J. A., Noble, M. E., Tucker, J. A. (1999) "Cyclin-dependant kinases: inhibition and substrate recognition", *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9: 738-744.

Evans, P. T., Malmberg, R. L. (1989) "Do polyamines have roles in plant development?", *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 235-269.

Fabian, H., Schultz, C., Backmann, J., Hahn, U., Saenger, W., Mantsch, H. H., Naumann, D. (1994) "Impact of Point Mutations on the Structure and Thermal Stability of Ribonuclease T1 in Aqueous Solution Probed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy", *Biochemistry* 33: 10725- 10730.

Faller, P., Pascal, A., Rutherford, A. W. (2001) "Beta-carotene redox reactions in photosystem II: electron transfer pathway", *Biochemistry* 40: 6431-6440.

Fair, W. R., Wehner, N., Brorsson, U. (1975) "Urinary polyamine levels in the diagnosis of carcinoma of the prostate", *J. Urol.* 114: 88-92.

Fasano, M., Curry, S., Terreno, E., Galliano, M., Fanali, G., Narciso, P., Notari, S., Ascenzi, P. (2005) "The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin", *IUBMB Life* 57: 787-796.

Ferreira, K. N., Iverson, T. M., Maghlaoui, K., Barber, J., Iwata, S. (2004) "Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center", *Science* 303: 1831-1838.

Forbush, B., Kok, B., McGloin, M. (1971) "Cooperation of charges in photosynthetic O_2 evolution-II. Damping of flash yield oscillation, deactivation", *Photochem. Photobiol.* 14: 307-321.

Foyer, C. H., Noctor, G. (2002) "Photosynthetic nitrogen assimilation and associated carbon and respiratory metabolism", Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Fraser, A. V., Woster, P. M., Wallace, H. M. (2002) "Induction of apoptosis in human leukaemic cells by IPENSpm, a novel polyamine analogue and anti-metabolite", *Biochem. J.* 367: 307-312.

Fromme, P., Yu, H., DeRuyter, Y. S., Jolley, C., Chauhan, D. K., Melkozernov, A., Grotjohann, I. (2006) "Structure of photosystems I and II", *C.R. Chimie* 9: 188-200.

Galston, A. W. (2001) "Plant biology – retrospect and prospect", *Curr. Sci.* 80: 143-152.

Galston, A. W., Kaur, Sawhney, R. K. (1990) "Polyamines in plant physiology", *Plant physiology* 94: 406-410.

Garret, R. H., Grisham, C. M. (2000) "Biochimie", traduction de la 2^{ème} édition américaine, De Boeck Université, Paris, France, pp. 296-324, 709-740.

Gaudreau, S. Neault J. F., Tajmir-Riahi, H. A. (2002) "Interaction of AZT with human serum albumin studied by capillary electrophoresis, FTIR and CD spectroscopic methods", *J. Biomol. Struct. Dyn.* 19: 1007-1014.

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 Q_B niche", *Biochim. Biophys. Acta* 1757: 1547-1556.

Ghanotakis, D. F., Topper, J. N., Babcock, G. T., Yocum, C. F. (1984) "Water-soluble 17-kDa and 23-kDa polypeptides restore oxygen evolution activity by creating a high-affinity binding-site for Ca²⁺ on the oxidizing side of photosystem II", *FEBS Lett.* 170: 169-173.

Ghirardi, M. L., Lutton, T. W., Seibert, M. (1996) "Interactions between Diphenylcarbazide, Zinc, Cobalt, and Manganese on the Oxidizing Side of Photosystem II", *Biochemistry* 35 : 1820-1828.

Gilmour, S. K., Verma, A. K., Madara, T., O'Brien, T. G. (1987) "Regulation of ornithine decarboxylase gene expression in mouse epidermis and epidermal tumors during two-stage tumorigenesis", *Cancer Res.* 47: 1221-1225.

Goormaghtigh, E., Cabiaux, V., Ruysschaert, J. M. (1990) "Secondary structure and dosage of soluble and membrane proteins by attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy on hydrated films", *Eur. J. Biochem.* 193: 409-420.

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. Plantarum* 121: 322-333.

Green, B. R., Parson, W. W. (2003) "Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis", Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Gregor, W., Cinco, R. M., Yu, H., Yachandra, V. K., Britt, D. (2005) "Influence of the 33 kDa manganese-stabilizing protein on the structure and substrate accessibility of the oxygen-evolving complex of photosystem II", *Biochemistry* 44: 8817-8825.

Groppa, M. D., Benavides, M. P. (2008) "Polyamines and abiotic stress: recent advances", *Amino Acids* 34: 35 -45.

Ha, J. S., Ha, C. E., Chao, J. T., Peterson, C. E., Theriault, A., Bhagavan, N. V. (2003) "Human serum albumin and its structural variants mediate cholesterol efflux from cultured endothelial cells", *Biochim. Biophys. Acta* 1640: 119-128.

Haddox, M. K., Magun, B. E., Russell, D. H. (1980) "Ornithine decarboxylase induction during B1 progression of normal and Rous sarcoma virus-transformed cells", *Cancer Res.* 40: 604-608.

Hahm, H. A., Dunn, V. R., Butash, K. A., Deveraux, W. L., Woster, P. M., Casero, Jr, R. A., Davidson, N. E. (2001) "Combination of standard cytotoxic agents with polyamine analogues in the treatment of breast cancer cell lines", *Clin. Cancer Res.* 7: 391-399.

Hanfrey, C., Elliot, K. A., Franceschetti, M., Mayer M. J., Illingworth, C., Michael A. J. (2005) "A dual upstream open reading frame-based autoregulatory circuit controlling polyamine-responsive translation", *J. Biol. Chem.* 280: 39229-39237.

Hanfrey, C., Sommer, S., Mayer, M. J., Burtin, D., Michael, A. J. (2001) "Arabidopsis polyamine biosynthesis: absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity", *Plant J.* 27: 551-560.

Hayashi, S., Murakami, Y., Matsufuji, S. (1996) "Ornithine decarboxylase antienzyme: a novel type of regulatory protein", *Trends Biochem. Sci.* 21: 27-30.

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

Heby, O. (1985) "Ornithine decarboxylase as target of chemotherapy", *Adv. Enzyme Regul.* 24: 103-124.

Heby, O. (1981) "Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation", *Differentiation* 19: 1-20.

Homann, P. H. (1999) "Reliability of photosystem II thermoluminescence measurements after sample freezing: few artifacts with photosystem II membranes but gross distortions with certain leaves", *Photosynth. Res.* 62: 219-229.

Homann, P. H., Madabusi, L. V. (1993) "Modification of the thermoluminescence properties of Ca^{2+} depleted photosystem II membranes by the 23 kDa extrinsic polypeptide and by oligocarboxylic acids", *Photosynth. Res.* 35: 29-39.

Igarashi K., Kashiwagi, K. (2000) "Polyamines: mysterious modulators of cellular functions", *Biochem. Biophys. Res. Commun* 271: 559-564.

Ioannidis, N. E., Kotzabasis, K. (2007) "Effects of polyamines on the functionality of photosynthetic membrane in vivo and in vitro", *Biochim. Biophys. Acta* 1767: 1372-1382.

Ioannidis, N. E., Sfichi, L., Kotzabasis, K. (2006) "Putrescine stimulates chemiosmotic ATP synthesis", *Biochim. Biophys. Acta* 1757: 821-828.

Iordanov, I. T., Goltsev, V., Doltchinkova, V., Kruleva, L. (1989) "Effect of some polyamines on the functional activity of thylakoid membranes", *Photosynthetica* 23: 314-323.

Iwata, S., Barber, J. (2004) "Structure of photosystem II and molecular architecture of the oxygen-evolving centre", *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14: 447-453.

Jackson, M., Mantsch, H. H. (1993) "Biomembrane structure from FT-IR spectroscopy", *Spectrochim. Acta Rev.* 15: 53-69.

Jegerschöld, C., Arellano, J. B., Schroder, W. P., Vankan, P. J. M., Baron, M., Styring, S. (1995) "Copper(II) inhibition of electron transfer through photosystem II studied by EPR spectroscopy". *Biochemistry* 34: 12747-12754..

Johnson, W. C. (1999) "Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures", *Proteins Struct. Funct. Genet.* 35: 307-312.

Joly, D. (2007) "Effets des plastoquinones sur la dissipation d'énergie des photosystèmes", mémoire de maîtrise à l'Université du Québec à Trois-Rivières.

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.

- Kaňa, R., Lazár, D., Prášil, O., Nauš, J. (2002) "Experimental and theoretical studies on the excess capacity of Photosystem II", *Photosynth. Res.* 72: 271-284.
- Kashiwagi, K., Taneja, S. K., Liu, T. Y., Tabor, C. W., Tabor, H. (1990) "Spermidine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*", *J. Biol. Chem.* 265: 22321-22328.
- Kasukabe, Y., He, L., Nada, K., Misawa, S., Ihara, I., Tachibana, S. (2004) "Overexpression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and up-regulates the expression of various stress-regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*", *Plant Cell Physiol.* 45: 712-722.
- Kingsnorth, A. N., Lumsden, A. B., Wallace, H. M. (1984a) "Polyamines in colorectal cancer", *Br. J. Surg.* 71: 791-794.
- Kingsnorth, A. N., Wallace, H. M., Bundred, N. J., Dixon, J. M. (1984b) "Polyamines in breast cancer", *Br. J. Surg.* 71: 352-356.
- Kitada, M., Igarashi, K., Hirose, S., Kitawaga, H. (1979) "Inhibition by polyamines of lipid peroxide formation in rat liver microsomes", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87: 388-394.
- Kok, B., Forbush, B., McGloin, M. (1970) "Cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution. I. A linear four-step mechanism", *Photochem. Photobiol.* 11: 467-475.
- Kotzabasis, K., Navakoudis, E., Tsolakis, G., Senger, H., Dörnemann, D. (1999a) "Characterization of the photoreceptor(s) responsible for the regulation of the intracellular polyamine level and the putative participation of heterotrimeric G-proteins in the signal transduction chain", *J. Photochem. Photobiol.* 50: 38-44.
- Kotzabasis, K., Strasser, B., Navakoudis, E., Senger, H., Dörnemann, D. (1999b) "The regulatory role of polyamines in structure and functioning of the photosynthetic apparatus during photoadaptation", *J. Photochem. Photobiol.* 50: 45-52.
- Kotzabasis, K., Fotinou, C., Roubelakis-Angelakis, K. A., Ghanotakis, D. (1993) "Polyamines in the photosynthetic apparatus. Photosystem II highly resolved subcomplexes are enriched in spermine", *Photosynth. Res.* 38: 83-88.
- Kragh-Hansen, U. (1990) "Structure and ligand binding properties of human serum albumin", *Dan. Med. Bull.* 37: 57-84.
- Kramer, G. F., Krizek, D. T., Mirecki, R. M. (1992) "Influence of photosynthetically active radiation and spectral quality on UV-B induced polyamine accumulation in soybean", *Phytochemistry* 31: 1119-1125.

- Krieger, A., Weis, E., Demeter, S. (1993) "Low pH-induced Ca^{2+} ion release in the water-splitting system is accompanied by a shift in the midpoint redox potential of the primary quinone acceptor Q_A ", *Biochim. Biophys. Acta* 1144: 411-418.
- Krimm, S., Bandekar, J. (1986) "Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides and proteins", *Adv. Protein Chem.* 38: 181-364.
- Kubbutat, M. H. G., Jones, S. N., Vousden, K. H. (1997) "Regulation of p53 stability by Mdm2", *Nature* 387: 299-303.
- Kumar, A., Altabella, T., Taylor, M., Tiburcio, A. F. (1997) "Recent advances in polyamine research", *Trends Plant Sci.* 2: 124-130.
- Kumria, R., Rajam, M. V. (2002) "Alteration in polyamine titers during *Agrobacterium*-mediated transformation of indica rice with ornithine decarboxylase gene affects plant regeneration potential", *Plant Sci.* 162: 769-777.
- Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., Takahashi, Y. (2008) "Polyamines: essential factors for growth and survival", *Planta* 228: 367-381.
- la Mae, M., Di Sandro, A., Dondini, L., Del Duca, S., Vantini, F., Bergamini, C., Bassi, R., Serafini-Fracassini, D. (2004) "A Zea mays 39-kDa thylakoid transglutaminase catalyses the modification by polyamines of light-harvesting complex II in a light-dependant way", *Planta* 219: 754-764.
- Lazăr, D. (2006) "The polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. Functional Plant Biology", *Func. Plant Biol.* 33: 9-30.
- Legocka, J., Zajchert, I. (1999) "Role of spermidine in the stabilization of the apoprotein of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex of photosystem II during leaf senescence process", *Acta Physiol. Plant* 21: 127-132.
- Li, L., Rao, J. N., Guo, X., Liu, L., Santora, R., Bass, B. L., Wang, J. Y. (2001a) "Polyamine depletion stabilizes p53 resulting in inhibition of normal intestinal epithelial cell proliferation", *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281: C941-953.
- Li, Y. F., Hess, S., Pannell, L. K., Tabor, C. W., Tabor, H. (2001b) "In vivo mechanism-based inactivation of S-adenosylmethionine decarboxylase from *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Saccharomyces cerevisiae*", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 10578-10583.
- Lipton, A., Sheehan, L. M., Kessler, Jr, G. F. (1975) "Urinary polyamine levels in human cancer", *Cancer* 35: 464-468.
- Liu, J., Tian, J., Hu, Z., Chen, X. (2004) "Binding of isofoxidin to bovine serum albumin", *Biopolymers* 73: 443-450.

- Liu, J. H., Kitashiba, H., Wang, J., Ban, Y., Moriguchi, T. (2007) "Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants", *Plant Biotechnology* 24: 117-126.
- 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.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Lawrence Zipursky, S., Darnell, J. (2004) "Molecular Cell Biology", W. H. Freeman and Company, New York.
- 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.
- Loser, C., Folsch, U. R., Paprotny, C., Creutzfeldt, W. (1990) "Polyamine concentrations in pancreatic tissue, serum, and urine of patients with pancreatic cancer", *Pancreas* 5: 119-127.
- Lundin, B., Hansson, M., Schoefs, B., Vener, A. V., Spetea, C. (2007a) "The Arabidopsis PsbO2 protein regulates dephosphorylation and turnover of the photosystem II centre D1 protein", *The Plant Journal* 49: 528-539.
- Lundin, B., Thuswaldner, S., Shutova, T., Eshaghi, S., Samuelsson, G., Barber, J., Andersson, B., Spetea, C. (2007b) "Subsequent events to GTP binding by the plant PsbO protein: structural changes, GTP hydrolysis and dissociation from the photosystem II complex", *Biochim. Biophys. Acta* 1767: 500-508.
- Lütz, C., Navakoudis, E., Seidlitz, H. K., Kotzabasis, K. (2005) "Simulated solar irradiation with enhanced UV-B adjust plastid- and thylakoid-associated polyamine changes for UV-B protection", *Biochim. Biophys. Acta* 1710: 24-33.
- MacDonald, G. M., Barry, B. A. (1992) "Difference FT-IR study of a novel biochemical preparation of photosystem II", *Biochemistry* 31:9848-9856.
- Martin-Tanguy, J. (1997) "Conjugated polyamines and reproductive development: biochemical, molecular and physiological approaches", *Physiol. Plant* 100: 675-688.
- Marton, L. J., Pegg, A. E. (1995) "Polyamines as targets for therapeutic intervention", *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35: 55-91.
- Matsufuji, S., Matsufuji, T., Miyazaki, Y., Murakami, Y., Atkins, J. F., Gesteland, R. F., Hayashi, S. (1995) "Autoregulatory frameshifting in decoding mammalian ornithine decarboxylase antizyme", *Cell* 80: 51-60.

- Matto, A. K., Sobolev, A. P., Neelam, A., Goyal, R. K., Handa, A. K., Segre, A. L. (2006) "Nuclear magnetic resonance spectroscopy-based metabolite profiling of transgenic tomato fruit engineered to accumulate spermidine and spermine reveals enhanced anabolic and nitrogen-carbon interactions", *Plant Physiol.* 142: 1759-1770.
- Mehta, R. A., Cassol, T., Li, N., Ali, N., Handa, A. K., Matto, A. K. (2002) "Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality, and vine life", *Nat. Biotechnol.* 20: 613-618.
- Messinger, J., Wacker, U., Renger, G. (1991) "Unusual low reactivity of the water oxidase in redox state S_3 toward exogenous reductants. Analysis of the NH_2OH - and NH_2NH_2 -induced modifications of flash-induced oxygen evolution in isolated spinach thylakoids", *Biochemistry* 30: 7852-7862.
- Minagawa, J., Takahashi, Y. (2004) "Structure, function and assembly of Photosystem II and its light-harvesting proteins", *Photosynthesis research* 82: 241-263.
- Moinard, C., Cynober, L., de Bandt, J. P. (2005) "Polyamines: metabolism and implications in human diseases", *Clinical Nutrition* 24: 184-197.
- Nahar, S., Tajmir-Riahi, H. A. (1996) "Complexation of Heavy Metal Cations Hg, Cd, and Pb with Proteins of PSII: Evidence for Metal-Sulfur Binding and Protein Conformational Transition by FTIR Spectroscopy", *J. Colloid Interface Sci.* 178: 648-656.
- Nahar, S., Tajmir-Riahi, H. A., Carpentier, R. (1994) "A quantitative analysis of protein secondary structure of photosystem II particles and light-harvesting complex of chloroplast thylakoid membranes by FTIR spectroscopy", *J. Mol Struct.* 328 :115-120.
- Nakatani, H. Y. (1984) "Photosynthetic oxygen evolution does not require the participation of polypeptides of 16 and 24 kilodaltons", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120: 299-304.
- Navakoudis, E., Vrentzou, K., Kotzabasis, K. (2007) "A polyamine- and LHCII protease activity-based mechanism regulates the plasticity and adaptation status of the photosynthetic apparatus", *Biochim. Biophys. Acta* 1767: 261-271.
- Navakoudis, E., Lütz, C., Langebartels, C., Lütz-Meindl, U., Kotzabasis, K. (2003) "Ozone impact on the photosynthetic apparatus and the protective role of polyamines", *Biochim. Biophys. Acta* 1612: 160-169.
- Neault, J. F., Novetta-Delen, A., Arakawa, H., Malonga, H., Tajmir-Riahi, H. A. (2000) "The effect of aspirin-HSA complexation on the protein secondary structure", *Can. J. Chem.* 78: 291-296.

- Nelson, N., Ben-Shem, A. (2004) "The complex architecture of oxygenic photosynthesis", *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 971-982.
- Nilsson, J., Grahn, B., Heby, O. (2000) "Antizyme inhibitor is rapidly induced in growth-stimulated mouse fibroblasts and releases ornithine decarboxylase from antizyme suppression", *Biochem. J.* 346: 699-704.
- Noguchi, T., Ono, T. A., Inoue, Y. (1992) "Detection of structural changes upon S1-to-S2 transition in the oxygen-evolving manganese cluster in photosystem II by light-induced Fourier transform infrared difference spectroscopy", *Biochemistry* 31: 5953-5956.
- Nowels, K., Homma, Y., Seidenfeld, J., Oyasu, R. (1986) "Prevention of inhibitory effects of α -difluoromethylornithine on rat urinary bladder carcinogenesis by exogenous putrescine", *Cancer Biochem. Biophys.* 8: 257-263.
- Ohad, I., Dal Bosco, C., Herrmann, R. G., Meurer, J. (2004) "Photosystem II proteins PsbL and PsbJ regulate electron flow to the plastoquinone pool", *Biochemistry* 43: 2297-2308.
- Ohnishi, N., Allakhverdiev, S. I., Takahashi, S., Higashi, S., Watanabe, M., Nishiyama, Y., Murata, N. (2005) "Two-step mechanism of photodamage to photosystem II: Step 1 occurs at the oxygen-evolving complex and step 2 occurs at the photochemical reaction center", *Biochemistry* 44: 8494-8499.
- Ono, T. A., Noguchi, T., Nakajima, Y. (1995) "Characteristic changes of function and structure of photosystem II during strong light photoinhibition under aerobic conditions", *Biochim. Biophys. Acta* 1229: 239-248.
- Ono, T. A., Inoue, Y. (1984) " Ca_2^+ -dependent restoration of O_2 -evolving activity in CaCl_2 -washed PSII particles depleted of 33, 24 and 16 kDa proteins", *FEBS Lett.* 168: 281-286.
- Ordesson, S. M. (2003) "Polyamine dependence of normal cell-cycle progression", *Biochem. Soc. Trans.* 31: 366-370.
- Painter, L., Harding, M. M., Beeby, P. J. (1998) "Synthesis and interaction with human serum albumin of the first 3,18-disubstituted derivative of bilirubin", *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 18*: 3041-3044.
- Park, M. H. (2006) "The post-translational synthesis of a polyamine-derived amino acid hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A)", *J. Biochem. (Tokyo)* 139: 161-169.

- Pegg, A. E., Xiong, H., Feith, D. J., Shantz, L. M. (1998) "S-adenosylmethionine decarboxylase: structure, function and regulation by polyamines", *Biochem. Soc. Trans.* 26: 580-586.
- Pegg, A. E., McCann, P. P. (1982) "Polyamine metabolism and function", *Am. J. Physiol.* 243: C212-C221.
- Pines, J. (1994) "The cell cycle kinases", *Semin. Cancer Biol.* 5: 305-313.
- Pestell, R. G., Albanese, C., Reutens, A. T., Segall, J. E., Lee, R. J., Arnold, A. (1999) "The cyclins and cyclin-dependant kinase inhibitors in hormonal regulation of proliferation and differentiation", *Endocr. Rev.* 20: 501-534.
- Porra, R. J., Thompson, W. A., Kriedemann, F. E. (1989) "Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy", *Biochim. Biophys. Acta* 975: 384-394.
- Porter, C. W., Bergeron, R. J. (1988) "Enzyme regulation as an approach to interference with polyamine biosynthesis – an alternative to enzyme inhibition", *Adv. Enzyme Regul.* 27: 57-79.
- 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.
- 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.
- Pospisil, P., Tyystjarvi, E. (1999) "Molecular mechanism of high-temperature-induced inhibition of acceptor side of photosystem II", *Photosynth. Res.* 62: 55-66.
- Poulson, M., Samson, G., Whitmarsh, J. (1995) "Evidence that cytochrome b559 protects photosystem II against photoinhibition", *Biochemistry* 34: 10932-10938.
- Putrenko, I. I., Vasil'ev, S., Bruce, D. (1999) "Modulation of flash-induced photosystem II fluorescence by events occurring at the water oxidizing complex", *Biochemistry* 38: 10632-10641.
- 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 Journal* 272: 892-902.

- Rashid, A., Camm, E. L., Ekramoddoullah, A. K. M. (1994) "Molecular mechanism of action of Pb^{2+} and Zn^{2+} on water oxidizing complexe of photosystem II", *FEBS Lett.* 350: 296-298.
- Rashid, A., Bernier, M., Pazdernick, L., Carpentier, R. (1991) "Interaction of Zn^{2+} with the donor side of photosystem II", *Photosynth. Res.* 30: 123-130.
- Renger, G. (2007) "Oxidative photosynthetic water splitting: energetics, kinetics and mechanism", *Photosynth. Res.* 92: 407-425.
- Renger, G., Kühn, P. (2007) "Reaction pattern and mechanism of light induced oxidative water splitting in photosynthesis", *Biochim. Biophys. Acta* 1767: 458-471.
- Rhee, H. J., Kim, E. J., Lee, J. K. (2007) "Physiological polyamines: simple primordial stress molecules", *J. Cell Mol. Med.* 11: 685-703.
- Roncel, M., Ortega, J. M., Losada, M. (2001) "Factors determining the special redox properties of photosynthetic cytochrome b559", *Eur. J. Biochem.* 268: 4961-4968.
- Roose, J. L., Wegener, K. M., Pakrasi, H. B. (2007) "The extrinsic proteins of Photosystem II", *Photosynth. Res.* 92: 369-387.
- Roy, M., Wu, R. (2002) "Overexpression of S-adenosylmethionine decarboxylase gene in rice increases polyamine level and enchances sodium chloride-stress tolerance", *Plant Sci.* 163: 987-992.
- Ruan, H., Shantz, L. M., Pegg, A. E., Morris, D. R. (1996) "The upstream open reading frame of the mRNA encoding S-adenosylmethionine decarboxylase is a polyamine-responsive translational control element", *J. Biol. Chem.* 271 29576-29582.
- Sakata, K., Kashiwagi, K., Igarashi, K. (2000) "Properties of a polyamine transporter regulated by antizyme", *Biochem. J.* 347: 297-303.
- Sane, P. V. (2004) "Thermoluminescence: a technique for probing photosystem II", *in* photosynthesis research protocols, R. Carpentier, éditeur, Humana Press, Totova, NJ, USA, pp 229-248.
- Satriano, J., Isome, M., Casero, Jr, R. A., Thomson, S. C., Blantz, R. C. (2001) "Polyamine transport system mediates agmatine transport in mammalian cells", *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281: C329-334.
- Sauer, K., Yachandra, V. K. (2004) "The water-oxidation complex in photosynthesis", *Biochim. Biophys. Acta* 1655: 140-148.
- Seidler, A. (2006) "The extrinsic polypeptides of photosystem II", *Biochim. Biophys. Acta* 1277: 35-60.

- Seiler, N., Raul, F. (2005) "Polyamines and apoptosis", *J. Cell Mol. Med.* 9: 623-642.
- Seiler, N. (2004) "Catabolism of polyamines", *Amino Acids* 26: 217-233.
- Seiler, N., Atanassov, C. L., Raul, F. (1998) "Polyamine metabolism as a target for cancer chemoprevention (Review)", *Intl. J. Oncol.* 13: 993-1006.
- Seiler, N., Delcros, J. G., Moulinoux, J. P. (1996) "Polyamine transport in mammalian cells. An update.", *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28: 843-861.
- Sfakianaki, M., Sfichi, L., Kotzabasis, K. (2006) "The involvement of LHCII-associated polyamines in the response of the photosynthetic apparatus to low temperature", *J. Photochem. Photobiol.* 84: 181-188.
- Sfichi, L., Ioannidis, N., Kotzabasis, K. (2004) "Thylakoid-associated polyamines adjust the UV-B sensitivity of the photosynthetic apparatus by means of light-harvesting complexe II changes", *Photochem. Photobiol.* 80: 499-506.
- Shinkarev, V. P. (2005a) "Flash-induced oxygen evolution and other oscillation processes in Photosystem II", *in* *Photosystem II: The water/plastoquinone oxidoreductase in photosynthesis*, Wydrzynski, T., Satoh, K., éditeurs, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 539-565.
- Shinkarev, V. P. (2005b) "Flash-induced oxygen evolution in photosynthesis: simple solution for the extended S-state model that include misses, double-hits, inactivation and backward transitions", *Biophysical Journal* 88: 412-421.
- Sistonen, L., Holtta, E., Lahvaslaiho, H., Lahtola, L., Atilalo, K. (1989) "Activation of the new tyrosine kinase induces fos/jun transcription factor complex, the glucose transporter and ornithine decarboxylase", *J. Cell. Biol.* 109: 1911-1919.
- Smith, T. A. (1985) "Polyamines", *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36: 117-143.
- Soulet, D., Gagnon, B., Rivest, S., Audette, M., Poulin, R. (2004) "A fluorescence probe of polyamine transport accumulates into intracellular acidic vesicles via a two-step mechanism", *J. Biol. Chem.* 279: 49355-49366.
- Sreerama, N., Woody, R. W. (2000) "Estimation of protein secondary structure from CD spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expended reference set", *Anal. Biochem.* 287: 252-260.
- Stephanos, J. J. (1996a) "Drug-protein interactions: two-site binding of heterocyclic ligands to a monomeric hemoglobin", *J. Inorg. Biochem.* 62: 155-169.
- Stephanos, J. J., Farina, S. A., Addison, A. W. (1996b) "Iron Ligand Recognition by Monomeric Hemoglobins", *Biochem. Biophys. Acta* 1295: 209-221.

- Sulkowska, A. (2002) "Interaction of drugs with bovine and human serum albumin", *J. Mol. Struct.* 614: 227-232.
- Summerfield, T. C., Shand, J. A., Bentley, F. K., Eaton-Rye, J. J. (2005) "PsbQ (SII1638) in *Synechocystis* sp. PCC 6803 is required for photosystem II activity in specific mutants and in nutrient-limiting conditions", *Biochemistry* 44: 805-815.
- Suorsa, M., Aro, E. M. (2007) "Expression, assembly and auxiliary functions of photosystem II oxygen-evolving proteins in higher plants", *Photosynth. Res.* 93: 89-100.
- Suorsa, M., Regel, R. E., Paakkarinen, V., Battchikova, N., Herrmann, R. G., Aro, E. M. (2004) "Protein assembly of photosystem II and accumulation of subcomplexes in the absence of low molecular mass subunits PsbL and PsbJ", *Eur. J. Biochem.* 271: 96-107.
- Tabor C. W., Tabor H. (1984) "Polyamines", *Annu. Rev. Biochem.* 53: 749-790.
- Surewicz, W. K., Mantsch, H. H., Chapman, D. (1993) "Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: a critical assessment", *Biochemistry* 32: 389-394.
- Tadolini, B. (1988) "Polyamine inhibition of lipid peroxidation", *Biochem. J.* 249: 33-36.
- Taiz, L., Zeiger, E. (1998) "Plant physiology", Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Thomas, T., Thomas T. J. (2003) "Polyamine metabolism and cancer", *J. Cell Mol. Med.* 7: 113-126.
- Thomas, T., Balabhadrapathruni, S., Gallo, M. A., Thomas, T. J. (2002) "Development of polyamine analogs as cancer therapeutic agents", *Oncol. Res.* 13: 123-135.
- Thomas, T., Thomas T. J. (2001) "Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications", *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 244-258.
- Tsihlias, J., Kapusta, L., Slingerland, J. (1999) "The prognostic significance of altered cyclin-dependant kinase inhibitors in human cancer", *Annu. Rev. Med.* 50: 401-423.
- Van den Hoek, C., Mann, D. G., Jahns, H. M. (1996) "Algae - An introduction to phycology", Cambridge University Press, New York
- Vass, I., Govindjee (1996) "Thermoluminescence from the photosynthetic apparatus", *Photosynth. Res.* 48: 117-126.
- Vass, I., Ono, T., Inoue, Y. (1987) "Stability and oscillation properties of thermoluminescent charge pairs in the O₂-evolving system depleted of Cl⁻ or the 33 kDa extrinsic protein", *Biochim. Biophys. Acta* 892: 224-235.

- Velikova, V., Yordanov, I., Edreva, A. (2000) "Oxidative stress and some antioxidant systems in acid-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines", *Plant Sci.* 151: 59-66.
- Walden, R., Cordeiro, A., Tiburcio, A. F. (1997) "Polyamines: small molecules triggering pathways in growth and development", *Plant Physiol.* 113: 1009-1013.
- Wallace, H. M., Fraser, A. V. (2004) "Inhibitors of polyamine metabolism: Review article", *Amino Acids* 26: 353-365.
- Wallace, H. M., Fraser, A. V. (2003a) "Polyamine analogues as anticancer drugs", *Biochem. Soc. Trans.* 31: 393-396.
- Wallace, H. M., Fraser, A. V., Hughes, A. (2003b) "A perspective of polyamine metabolism", *Biochem. J.* 376: 1-14.
- Wallace, H. M., Hugues, A., Thompson, K. (2001) "The potential chemotherapeutic and chemopreventive benefits of modulated polyamine biosynthesis", In *Biogenically Active Amines in Food*, Vol. 4, pp.29-36, Morgan, D. M. L., Milovic, V., Krizek, M., White, A., éditeurs, European Commission, Brussels.
- Wallace, H. M., Duthie, J., Evans, D. M., Lamond, S., Nicoll, K. M., Heys, S. D. (2000) "Alterations in catabolic polyamine enzymes in human breast cancer tissue", *Clin. Cancer. Res.* 6: 3657-3661.
- Wallace, H. M., Mackarel, A. J. (1998) "Regulation of polyamine acetylation and efflux in human cancer cells", *Biochem. Soc. Trans.* 26: 571-576.
- Wallace, H. M. (1996) "Polyamines in human health", *Proc. Nutr. Soc.* 55: 419-431.
- Wallace, H. M., Keir, H. M. (1981) "Uptake and secretion of polyamines from baby hamster kidney cells (BHK-21/C13): the effect of serum and confluent cell cultures", *Biochim. Biophys. Acta* 676: 25-30.
- Walters, R. G. (2005) "Towards an understanding of photosynthetic acclimation", *J. Exp. Bot.* 56: 435-447.
- Walters, D. R. (2003) "Polyamines and plant disease", *Phytochemistry* 64: 97-107.
- Wang, X., Shi, G., Xu, Q., Hu, J. (2006) "Exogenous polyamines enhance copper tolerance of *Nymphoides peltatum*", *J. Plant Physiol.* 164: 1062-1070.
- Xiong, H., Stanly, B. A., Tekwani, B. L., Pegg, A. E. (1997) "Processing of mammalian and plant *S*-adenosylmethionine decarboxylase proenzymes", *J. Biol. Chem.* 272: 28342-28348.

Yakushevskaya, A. E., Keegstra, W., Boekema, E. J., Dekker, J. P., Andersson, J., Ruban, A. V., Horton, P. (2003) "The structure of Photosystem II in *Adiantum*: localization of the CP26 and CP29 antenna complexes", *Biochemistry* 42: 608-613.

Yocum, C. F. (1991) "Calcium activation of photosynthetic water oxidation", *Biochim. Biophys. Acta* 1059: 1-15.

Yuan, Q., Ray, R. M., Viar, M. J., Johnson, L. R. (2001) "Polyamine regulation of ornithine decarboxylase and its antienzyme in intestinal epithelial cells", *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 280: G130-138.

Yruela, I., Alfonso, M., Baron, M., Picorel, R. (2000) "Copper effect on the protein composition of photosystem II", *Physiol. Plant.* 110: 551-557.

Zapata, P. J., Serrano, M., Pretel, M. T., Amorós, A., Botella, M. A. (2004) "Polyamines and ethylene changes during germination and different plant species under salinity", *Plant Sci.* 167: 781-788.

Zeinalov, Y. (2002) "An equipment for investigations of photosynthetic oxygen production reactions", *Bulg. J. Plant. Physiol.* 28: 57-67.

Zhu, X. G., Govindjee, Baker, N. R., deSturler, E., Long, S. P. (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.