

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

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

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES

PAR
AHMED BELATIK

ÉTUDE DE LA BANDE AG DE THERMOLUMINESCENCE
DANS DES CHLOROPLASTES INTACTS

NOVEMBRE 2011

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.

À la mémoire de mon défunt père.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, le professeur Robert Carpentier, ainsi que mon codirecteur, le Dr Surat Hotchandani, pour leurs soutiens et pour les conseils qu'ils m'ont prodigués tout au long de ma maitrise. Je tiens également à leur exprimer toute ma reconnaissance pour leurs grandes disponibilités.

J'aimerais également remercier toutes les personnes ayant participé à mes travaux de recherche durant ces années de maitrise pour leur aide et leur contribution inestimable, tout spécialement Johanne, Najoua, Hnia, David, Alain, Jemaa, Laurent et Imad, qui par leurs présences également, ont rendu mon travail en laboratoire particulièrement intéressant. Sans oublié de remercier, Mme Catarina Leote Franco Pio, pour son professionnalisme et sa précieuse aide dans les procédures de dépôt de ce mémoire.

Finalement, mes remerciements vont aussi à ma mère, mes sœurs et frères qui m'ont soutenu tout au long de mes études. Je remercie également ma petite fille, Maryam, pour la joie qu'elle m'a donnée au long de mon travail.

AVANT-PROPOS

Ce mémoire comporte un article scientifique. 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 Surat Hotchandani. Dans le cadre de l'article intitulé «Afterglow thermoluminescence measured in isolated chloroplasts» (Chapitre IV), Jemaa Essemine a contribué à m'aider dans la partie expérimentale du PAM. Pour ma part j'ai effectué la totalité des mesures présentées et participé à la rédaction de l'article à 50 %.

RÉSUMÉ

La photosynthèse est couplée d'un mécanisme de transfert d'électron assuré par les deux photosystèmes (I et II) au sein d'une chaîne de composés redox. Une perturbation dans le transfert d'électron entraîne une dérégulation des mécanismes physiologiques de la plante. L'ensemble de ces réactions se produit, pour les végétaux, dans les chloroplastes. De ce fait, l'utilisation des chloroplastes intacts représente un aspect important dans l'étude de transfert d'électron. En effet, plusieurs composantes (Fd, NADP) sont perdues lors de la procédure d'isolation des thylacoïdes. Ces problèmes font que plusieurs aspects de la chaîne de transport d'électron ne sont pas élucidés d'une manière claire et précise.

Ce projet de recherche a donc été réalisé dans le but d'éclaircir une des voies cycliques de transport d'électron, par l'étude de la bande AfterGlow (AG) de thermoluminescence. Nos mesures de thermoluminescence nous ont permis de confirmer l'existence de la bande AG pour la première fois dans des chloroplastes intacts. Cette bande a les mêmes caractéristiques que celles des feuilles à savoir, une période de modulation quatre, la stimulation par une lumière rouge lointaine, l'inhibition par l'antimycine A et une température maximale entre 40 et 50 °C.

L'ajout de DCMU et MV inhibiteur d'électron entre QA et QB ainsi qu'accepteur d'électrons du PSI au niveau de la ferrédoxine respectivement, ont eu comme principale effet de diminuer le niveau maximal de la photooxydation du PSI au fur et à mesure que le degré d'intégrité des chloroplastes augmente. De plus, après traitement avec DCMU et MV, seule une phase lente mono-exponentielle du P700⁺ a été observée. Les phases rapide et moyenne représentant les voies de transport cyclique des électrons FQR et NAD (P) déshydrogénase (NDH) ont été supprimées par le DCMU et MV respectivement. Par ailleurs, nos mesures d'induction de fluorescence sur les chloroplastes intacts nous ont montré une dépendance linéaire entre le facteur sigmoïdal de la phase IP (S_{IP}) avec le degré d'intégrité des chloroplastes, plus S_{IP} est grand plus le

degré d'intégrité est élevé. D'autre part, nos mesures sur le DBMIB nous ont montré que cette quinone quench la fluorescence dans l'appareil photosynthétique au niveau du PSI et PSII.

Nos résultats nous ont amenés à conclure que l'hypothèse de Sane et al. (1986) concernant la similarité de bande AG dans des chloroplastes intacts avec celle des feuilles est juste. De plus, la voie de transport cyclique d'électron la plus dominante dans les épinards est celle du FQR.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
AVANT-PROPOS.....	iv
RÉSUMÉ.....	v
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES TABLEAUX.....	xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xiv
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 La photosynthèse	1
1.1.1 Les phases de la photosynthèse	2
1.2 Les chloroplastes	3
1.2.1 La structure d'un chloroplaste	3
1.3 Lumière et pigment photosynthétiques.....	4
1.3.1 Les centres réactionnels	5
1.4 Les photosystèmes	7
1.4.1 Le photosystème II (PS II).....	8
1.4.1.1 Antennes du PS II	9
1.4.1.2 Le centre réactionnel du PS II	11
1.4.1.3 Le complexe d'oxydation de l'eau (COE) du PS II.....	12
1.4.2 Structure et fonction des PS I	15
1.5 Le transport transmembranaire des électrons	16
1.6 La fixation du CO ₂	19
CHAPITRE II	
FONDEMENTS THÉORIQUES.....	21
2.1 Dissipation d'énergie au niveau du photosystème II	21
2.1.1 Dissipation d'énergie sous forme de fluorescence	22
2.1.1.1 Fluorescence chlorophyllienne	23
2.1.1.2 Le rendement et la cinétique de la fluorescence chlorophyllienne des photosystèmes	24
2.1.1.3 Paramètres de la fluorescence des chlorophylles.....	26

2.1.2 Théorie de quenching de la fluorescence.....	28
2.1.3 Dissipation d'énergie sous forme de chaleur.....	30
2.2 Thermoluminescence.....	32
2.2.1 Émission des bandes de TL par la recombinaison activée thermiquement	33
2.2.2 Analyse des signaux de TL.....	35
2.2.3 Attributions des bandes de TL	37
2.2.3.1 La bande Q (à pH physiologique).....	38
2.2.3.2 La bande B (à pH physiologique).....	39
2.2.3.3 La bande AfterGlow (AG) (à pH physiologique).....	39
2.2.3.4 Autres bandes de thermoluminescence.....	40
CHAPITRE III	
MÉTHODES EXPÉRIMENTALES	42
3.1 Matériel utilisé	42
3.2 Préparation des chloroplastes	42
3.3 Détermination de la concentration en chlorophylle (<i>a et b</i>) des échantillons....	43
3.4 Dosage et calcul d'intégrité des chloroplastes.....	43
3.5 Dégagement d'oxygène standard	44
3.6 Mesure d'induction de fluorescence.....	45
3.7 Analyses des données d'induction de fluorescence.....	46
3.8 Mesure de thermoluminescence	47
3.9 Acquisition et analyses des données de thermoluminescence	48
3.10 Mesure des changements d'absorption à 830 nm	49
3.11 Mesure des spectres de fluorescence	49
CHAPITRE IV	
AFTERRGLOW THERMOLUMINESCENCE MEASURED IN ISOLATED CHLOROPLASTS.....	50
Résumé.....	51
Abstract	53
Introduction	54
Material and methods.....	57
Chloroplasts isolation	57
Chloroplasts intactness assay and calculation	57

Thylakoid membranes isolation.....	57
Chlorophyll fluorescence induction.....	58
Redox state of P700.....	58
Thermoluminescence.....	59
Results.....	60
Chlorophyll a fluorescence induction.....	60
Photooxidation of P700 by far-red light.....	61
Thermoluminescence.....	63
Discussion	66
Acknowledgements	70
References	71
Figure legends	77
CHAPITRE V	
RÉSULTATS ET DISCUSSIONS.....	87
5.1 L'optimisation du procédé d'isolation des chloroplastes intacts.....	87
5.2 Étude du rôle du DBMIB dans le transport d'électrons	90
5.2.1 Effet du DBMIB sur les bandes AG et B de thermoluminescence.....	92
5.2.1.1 La constante de Stern-Volmer pour les bandes AG et B de thermoluminescence	94
5.2.2 Effet du DBMIB sur la bande B de thermoluminescence	95
5.2.2.1 La constante de Stern-Volmer pour la bande B de thermoluminescence	96
5.2.3 Effet du DBMIB sur la bande Q de thermoluminescence	97
5.2.3.1 La constante de Stern-Volmer pour la bande Q de thermoluminescence	99
5.2.4 Effet du DBMIB sur les chloroplastes intacts par fluorescence	101
5.2.4.1 La constante de Stern-Volmer pour la fluorescence.....	102
CHAPITRE VI	
CONCLUSIONS GÉNÉRALES.....	104
6.1 Conclusion.....	104
6.2 Perspectives	107
BIBLIOGRAPHIE.....	108

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Représentation artistique de la photosynthèse dans une feuille présentée d'une manière simplifiée (tiré du Ricoud, 1997).....	1
1.2	(A) Structure schématique d'un chloroplaste. (B) Micrographie électronique d'un chloroplaste (d'après Malkin et Niyougi, 2000)	4
1.3	Représentation générale des centres réactionnels des complexes photosynthétiques connus parmi les phyla des eubactéries et des plantes (Schubert et al. 1998).....	7
1.4	Vue simplifiée de la constitution de la membrane photosynthétique des plantes supérieures avec ses constituants principaux : le PSI, le PSII, le cytochrome b ₆ f et l'ATP synthétase par David Joly, UQTR	8
1.5	Organisation de 35 chlorophylles dans un monomère du PSII. Le centre des atomes de magnésium est coordonné par l'eau, représenté en orange. Chlorophylles coordonnées par CP43-Asn 39 sont représentées en bleu. Toutes les autres chlorophylles sont coordonnées par Histidine (His) et sont représentées en vert. Les hélices transmembranaires de D1 et D2 sont étiquetées A-E et les hélices transmembranaires CP47 et CP43 sont étiquetées I-VI (Umena et al. 2011)	10
1.6	Représentation schématique du centre réactionnel du PSII par David Joly, UQTR	11
1.7	Structure du complexe du Mn ₄ CaO ₅ et les ligands de son environnement. Les distances indiquées sont les distances moyennes entre deux monomères. Le manganèse, le violet; le calcium, le jaune; l'oxygène, rouge; D1, vert, CP43, rose (Umena et al. 2011).....	13
1.8	Représentation schématique de la formation des états S et de la production de protons pendant la photolyse de l'eau conduisant au dégagement d'oxygène (Gernot Renger, 2011).....	14
1.9	Modèle structurel du photosystème I. Les chlorophylles sont en vert, les caroténoïdes en magenta et les quinones en bleu (Nelson, 2011).	16

1.10	Représentation schématique des réactions d'oxydoréduction entre les quinones A (QA), B (QB) et plastoquinones (PQ) (d'après Whitmarsh et Govindjee, 2002)	17
1.11	(A) Représentation schématique du potentiel redox (valeurs moyennes de E_m) de chaque transporteur d'électrons dans la membrane de thylacoïde. (B) organisation des transporteurs d'électrons dans la membrane de thylacoïde. Les complexes membranaires sont les photosystèmes II et I, le cytochrome b6f, la plastocyanine et l'ATP synthétase. Les flèches indiquent le transfert des électrons (rouge) et la translocation de protons (bleu) (d'après Malkin et Niyogi 2000).	18
1.12	Schéma de la photosynthèse, la fixation du CO ₂ et l'accumulation du carbone dans les cellules de micro algues (Xianhai Zenga et al. 2011).....	20
2.1	Voies de dissipation d'énergie de la chlorophylle excitée du PSII (adapté de Müller et al. 2001)	21
2.2	Diagramme de Jablonski simplifié de l'absorption d'énergie des principales voies de dissipation en photosynthèse	23
2.3	Cycle des xanthophylles lors de la régulation de la dissipation d'énergie lumineuse. Les pH 7.0 et 5.0 sont les pH optimaux des enzymes zéaxanthine époxidase et violaxanthine dé-époxidase, respectivement (d'après Niyogi et al. 1997).	32
2.4	Schéma représentant les voies de recombinaisons possibles entre les différents états de séparation de charges. Seule la voie indirecte donne lieu au TL. Seule la voie indirecte donne lieu au TL.....	35
2.5	Représentation schématique des principales bandes de thermoluminescence dans le PSII à une température entre 0 °C et 72 °C dans des chloroplastes intacts	38
3.1	Électrode d'oxygène de Clark	45
3.2	Dispositif expérimental pour les mesures d'induction de fluorescence PEA (Plant Efficiency analyser), source lumineuse en mode on, porte échantillon pour les feuilles et pour les liquides et un ordinateur exécutant un logiciel d'acquisition	46

3.3	Dispositif expérimental pour les mesures de thermoluminescence.....	47
3.4	Protocole de mesure des émissions de thermoluminescence. Après 30 minutes d'adaptation à l'obscurité, les échantillons sont illuminés par des flashes saturants à 2 °C, puis sont chauffés à un taux de 0,5 °C/s. Les états S ₂ et S ₃ sont considérés comme stables avant l'étape de chauffage.....	48
5.1	Schéma des différentes étapes lors d'isolation des chloroplastes.....	88
5.2	Structure chimique du DBMIB.....	91
5.3	Évolution des bandes AG et B présentes dans les chloroplastes intacts en absence (Ctrl) et en présence de 0,1, 2, 5, 10 et 20µM de DBMIB.....	93
5.4	Variation du rapport d'intensité de fluorescence en fonction de la concentration en DBMIB dans des chloroplastes intacts (bandes B et AG) par thermoluminescence	94
5.5	Évolution de la bande B présente dans les thylakoïdes en absence (Ctrl) et en présence de 0,1, 1, 2, 5 et 10µM de DBMIB	96
5.6	Variation du rapport d'intensité de fluorescence en fonction de la concentration en DBMIB dans des thylakoïdes (bande B).....	97
5.7	Évolution de la bande Q présente dans les chloroplastes intacts en absence (chloroplastes + DCMU) et en présence de 0,1, 0,5, 10 et 20µM de DBMIB ...	99
5.8	Variation du rapport d'intensité de fluorescence en fonction de la concentration en DBMIB dans des chloroplastes intacts traités avec DCMU (bande Q)	100
5.9	Spectres d'émission de fluorescence mesurée dans des chloroplastes intacts en l'absence d'additif (Chlor) ou en présence de 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 2, 5, 10 et 20 µM de DBMIB.....	102
5.10	Variation du rapport d'intensité de fluorescence en fonction de la concentration en DBMIB dans des chloroplastes intacts par fluorescence	103

LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
2.1	L'origine des bandes de TL et leurs pics de température maximale	41
5.1	Paramètre d'isolation à 70 et 80 % d'intégrité pour les chloroplastes intacts	90

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A ₀	Accepteur primaire d'électrons du photosystème I
A ₁	Accepteur secondaire d'électrons du photosystème I
ADP	Adénosine diphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
CDO	Complexe de dégagement d'oxygène
CÉO	Complexe d'évolution d'oxygène
Chl	Chlorophylle
CR	Centre réactionnel
Cyt b6f	Cytochrome b6f
ΔA _λ	Changement d'absorbance à une longueur d'onde λ
D ₁	La protéine de 32 kDa du centre réactionnel du photosystème II
D ₂	La protéine de 34 kDa du centre réactionnel du photosystème II
DBMIB	Dibromothymoquinone
DCMU	(Ou diuron) herbicide -3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea
E _a	Énergie d'activation
F ₀	Niveau minimal (initial) de fluorescence
Fd	Ferrédoxine
F _v	Niveau maximal de fluorescence (ou P)
Fx	Complexe Fer-Soufre accepteur primaire du photosystème I
FQR	Ferrédoxine quinone réductase
FR	Rouge lointaine
IF	Induction de fluorescence
KSV	Constante de Stern-Volmer
LED	Light emitting diode
LHC	Antenne photocollectrice de lumière
MV	Méthyle viologène
NADP+	Nicotine-amide dinucléotide NDH NADPH-déshydrogénase
NPQ	Quenching non-photochimique

P ₆₈₀	Donneur primaire d'électrons du photosystème II
P ₇₀₀	Donneur primaire d'électrons du photosystème I
Pheo	Phéophytine, l'accepteur primaire d'électron du photosystème II
PC	Plastocyanine
Plante C ₃	Les bactéries photosynthétiques comme les Cyanobactéries, les Algues, les mousses, les Fougères, les Conifères et parmi les plantes à fleurs tous les arbres et beaucoup d'herbacées
PQ	Plastoquinone (quinone oxydée)
PQH ₂	Plastoquinol ou plastohydroquinone (quinone réduite)
PSI	Photosystème I
PSII	Photosystème II
Q _A	La quinone acceptrice primaire du photosystème II
Q _B	La quinone acceptrice secondaire du photosystème II
ROS	Espèces réactives d'oxygène
S _{0-S₄}	États redox du complexe de manganèse
TL	Thermoluminescence
TLE	Transport linéaire d'électrons
TCE	Transport cyclique d'électrons
T _m	Température maximale d'une bande de thermoluminescence
Y _D	Donneur d'électron auxiliaire de P ₆₈₀ , résidu Tyr160 de la protéine D2
Y _Z	Donneur d'électron principal de P ₆₈₀ , résidu Tyr161 de la protéine D ₁

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 La photosynthèse

La photosynthèse est un processus bioénergétique qui permet aux organismes photosynthétiques (algues, plantes et certaines bactéries et cyanobactéries) de convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique. Ce processus est couplé d'un mécanisme de dégagement d'oxygène, qui est l'élément indispensable de notre vie sur terre, lié à la photolyse de l'eau (H_2O) qui permet, par une chaîne de réactions chimiques et enzymatiques, la réduction du dioxyde de carbone (CO_2) pour la synthèse des glucides ($C_6H_{12}O_6$).

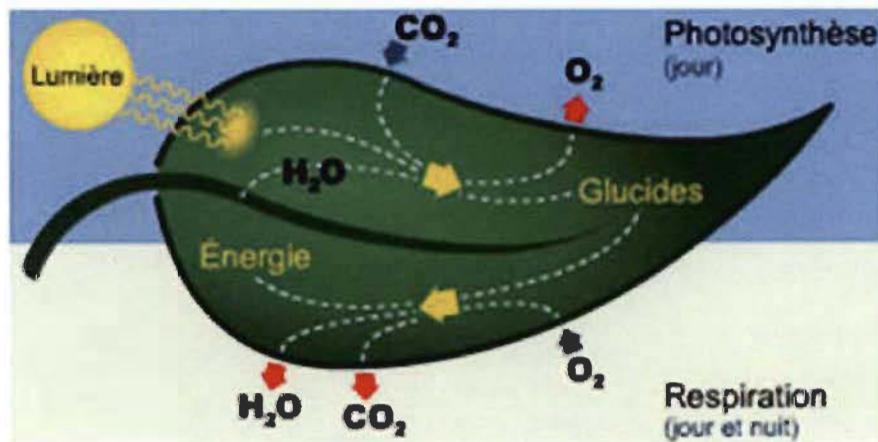


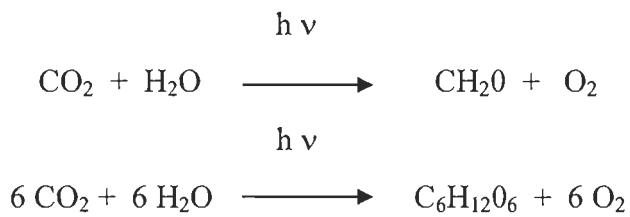
Figure 1.1 : Représentation artistique de la photosynthèse dans une feuille présentée d'une manière simplifiée (tiré du Ricoud, 1997).

Les besoins nutritifs bien connus d'une plante (organisme autotrophe) sont le dioxyde de carbone, l'eau et les minéraux du sol. La nuit, la photosynthèse est suspendue, mais la plante respire de manière continue le jour et la nuit. En 24 heures, la production de dioxyde de carbone issu de la respiration est moins importante que celle en oxygène moléculaire (O_2) issu de la photosynthèse durant la journée.

À l'échelle planétaire, ce sont les algues et le phytoplancton marins qui produisent le plus d'oxygène, suivi des forêts. Donc, les océans jouent un rôle très important en termes de puits de carbone. D'ailleurs, le flux d'énergie solaire capté par la photosynthèse à l'échelle planétaire est immense, on parle d'environ 5 kW par mètre carré de la terre chaque jour ce qui représente environ 3 % de la consommation mondiale d'énergie (Ida et al. 2010). D'autre part, les organismes photosynthétiques assimilent environ 100 milliards de tonnes de carbone en biomasse chaque année. Ceci nous laisse conclure que la présence des plantes dans notre univers est indispensable à notre vie ainsi que celle de notre planète.

1.1.1 Les phases de la photosynthèse

Le mécanisme de la photosynthèse se divise en deux phases : la phase obscure ou biochimique, elle est nommée ainsi, car elle est indépendante de la lumière. Elle consiste en l'ensemble des réactions biochimiques liées au cycle de Calvin, où l'ATP et le NADPH sont utilisés pour la fixation du CO₂ en produisant des hydrates de carbone, dont l'exemple typique est le glucose (Blankenship, 2002). Cette fixation se fait par un enzyme appelé Rubisco (ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase oxygénase) qui est la protéine la plus abondante de notre planète (Dhingra et al. 2004).



La phase lumineuse implique des réactions photochimiques, elle est dépendante de la lumière. L'énergie reçue sous forme de photon qui est captée et piégée permettra l'arrachement des électrons aux molécules d'eau. La dissociation des molécules d'eau permet de fournir des électrons et des protons ainsi que la production de molécule d'oxygène (dégagement d'oxygène dans l'atmosphère). Ces deux phases de la

photosynthèse pour les végétaux se déroulent au sein d'un organite cellulaire appelé chloroplaste.

1.2 Les chloroplastes

Les chloroplastes sont des types de plaste caractérisés par la présence de pigments photosynthétiques et une structure lamellaire spéciale constituées par les thylakoïdes. C'est dans le chloroplaste que se déroulent les différentes phases primaires du processus photosynthétique, de la capture des photons à la conversion d'énergie chimique jusqu'à la synthèse des composés primaires du métabolisme photosynthétique, les trioses phosphates; ces derniers composés sont transportés hors du chloroplaste, mais peuvent être aussi transformés sur place en polymères glucidiques insolubles constituant l'amidon qui s'accumule dans les chloroplastes (Douce et Joyard, 1977; 2000).

1.2.1 La structure d'un chloroplaste

Dans une cellule de tissu palissadique de feuille classique, chez une plante C₃, les chloroplastes se présentent sous l'aspect de disques aplatis, de 5 à 10 µm de longueur et de 1 à 5 µm de largeur, visibles dans le cytoplasme des cellules, à la périphérie de la vacuole. En microscopie électronique, sur une coupe ultrafine de feuilles, les chloroplastes montrent une structure caractéristique avec un réseau membranaire très développé, constitué de thylakoïdes vus en coupe (figure 1.2 A) et baignant dans un stroma granuleux. Les chloroplastes sont entourés par une enveloppe constituée de deux membranes lipoprotéiques, externe et interne chacune d'une épaisseur de 60 Å (figure 1.2 B). L'intérieur de cette enveloppe est constitué d'un fluide granuleux, le stroma, dans lequel est visible un déploiement complexe de membranes (lamelles). Ces lamelles en forme de disque, nommées thylacoïdes, ont tendance à se superposer en structures ordonnées, les granas; ces derniers sont reliés de manière sporadique par les thylacoïdes non agencés. Dans le stroma est localisé le complexe enzymatique permettant la fixation du CO₂ et l'évolution du métabolisme photosynthétique primaire ainsi que la synthèse de nombreux composés comme l'amidon. On y trouve aussi

plusieurs dizaines de brins d'ADN circulaire portant des gènes codant de nombreuses protéines chloroplastiques comme les protéines des centres réactionnels et la grande sous-unité L de la rubisco. Ces gènes codent aussi des ribosomes de type bactérien impliqués dans la synthèse des protéines chloroplastiques. L'enveloppe est le site des synthèses de nombreux composés : acylation du glycérol 3-P pour la synthèse des galactolipides, transformation du protoporphyrinogène en chlorophyllide, et quelques étapes de la synthèse des caroténoïdes (Block et al. 2001).

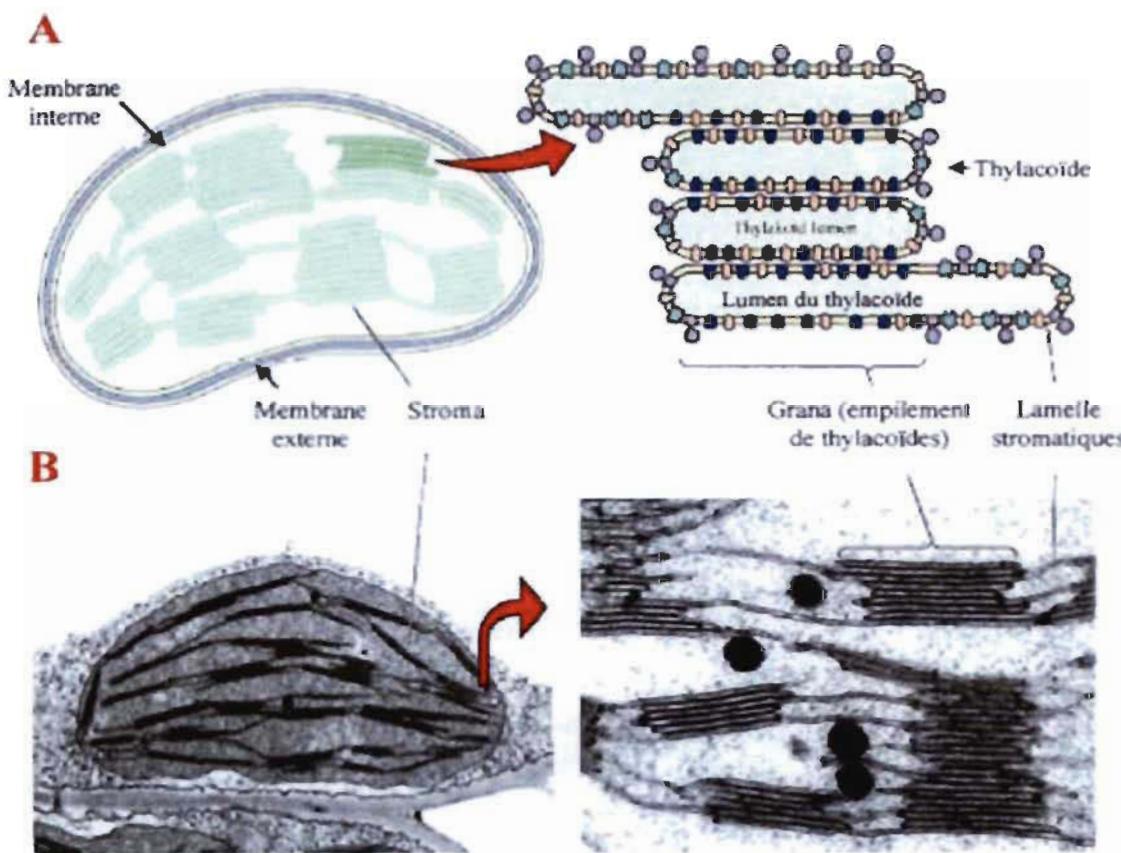


Figure 1.2 : (A) Structure schématique d'un chloroplaste. (B) Micrographie électronique d'un chloroplaste (d'après Malkin et Niyogi, 2000).

1.3 Lumière et pigment photosynthétiques

L'énergie électromagnétique des photons lumineux (soleil ou autre source artificielle) reçue par une molécule peut être soit diffusée soit absorbée. Les complexes protéiques

responsables de capter la lumière incidente et de transférer cette énergie par résonance vers les centres photo réactifs 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, contenues dans les chloroplastes qui fixent ou absorbent ces rayons lumineux. 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).

L'absorption d'une radiation par une molécule de pigment permet de transmettre l'énergie à un électron d'une couche périphérique pour le faire passer à une couche périphérique supérieure : c'est une transition électronique. La durée de l'absorption est de quelques femtosecondes, soit la durée d'une vibration lumineuse. L'excitation des molécules de chlorophylle par la lumière déclenche un processus de transfert d'électrons qui aboutit à la formation des molécules de haut niveau d'énergie, lesquelles interviennent dans toutes les réactions bioénergétiques : la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) dans sa forme réduite et l'adénosine triphosphate (ATP). Les LHC se distinguent en deux types, les LHC I et les LHC II.

Les LHC II forment les antennes les plus abondantes dans la nature à travers les photosystèmes, lesquelles se retrouvent principalement en périphérie du PS II. Les LHC II sont des complexes protéines-pigments sous forme trimérique, dans laquelle chaque protéine monomérique LhcB lie environ 13 à 15 *Chl* *a* et *b* au total, et de 3 à 4 caroténoïdes (Liau et al. 2004). Contrairement aux LHCII, les LHCI sont des antennes uniques aux PS I. Les LHCI sont des complexes protéines-pigments sous forme dimérique, dans laquelle chaque protéine monomérique LhcA lie 13 molécules de *Chl* *a* et *b* au total (Ben-shem et al. 2003).

1.3.1 Les centres réactionnels

La photosynthèse fait appel à des antennes collectrices de lumière constituées de chlorophylles capables d'absorber des photons et d'acheminer leur énergie le long du

groupe de pigments vers le centre réactionnel où sera transformée l'énergie photonique en énergie chimique nécessaire à la croissance des plantes. Lorsque le premier centre réactionnel absorbe un quantum de lumière, la chlorophylle s'oxyde et peut, en retour, oxyder l'eau en déplaçant les atomes d'hydrogène et en libérant l'atome d'oxygène. L'électron arraché à la chlorophylle pendant cette première réaction lumineuse passe, par l'intermédiaire d'une chaîne de transporteurs d'électrons, au second centre réactionnel. À ce stade, l'absorption d'un deuxième quantum de lumière oblige l'électron à quitter la chlorophylle et à circuler ensuite à travers une seconde chaîne de transporteurs jusqu'au NADP⁺.

La réduction du NADP⁺ en NADPH, forme riche en énergie, permet la réalisation d'une série de réactions de catalyse enzymatique introduisant le gaz carbonique dans des produits organiques complexes. Le centre réactionnel renferme un certain nombre de protéines dont la plupart sont codées par des gènes chloroplastiques, la fonction de plusieurs de ces protéines étant inconnue. Deux protéines appelées D1 et D2, codées par les gènes chloroplastiques PsbA et PsbD respectivement, constituent le cœur du centre réactionnel. Le cœur du PS II présente un axe de symétrie comme les centres réactionnels des bactéries pourpres ainsi que celui du PS I.

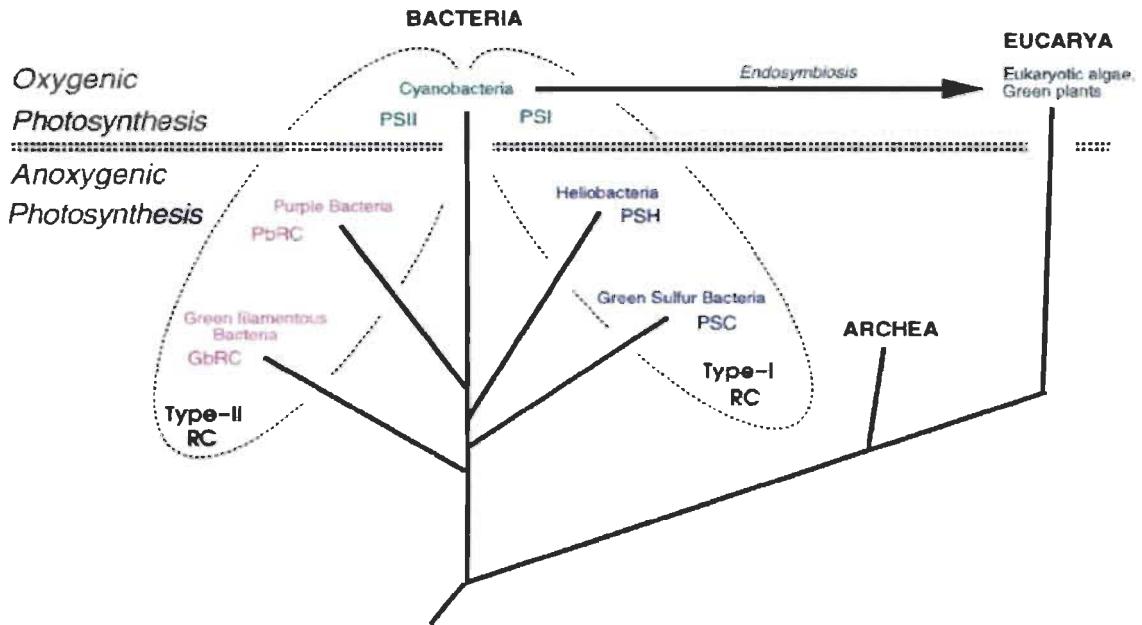


Figure 1.3 : Représentation générale des centres réactionnels des complexes photosynthétiques connus parmi les phyla des eubactéries et des plantes (Schubert et al. 1998).

1.4 Les photosystèmes

C'est un ensemble de pigments qui absorbent dans le visible, mais seule une molécule de pigment est capable de transformer l'énergie lumineuse en énergie chimique : c'est le centre réactionnel. Dans la membrane de la vésicule thylakoïdine se trouvent rassemblées les structures macromoléculaires permettant l'évolution de l'activité photosynthétique. Les molécules de chlorophylle *a* et *b* (*Chl a* et *Chl b*) se regroupent en deux unités distinctes, appelées « photosystèmes ». Les deux photosystèmes (PSI et PSII) assurent la capture d'énergie lumineuse puis sa transformation en énergie chimique. Les thylakoïdes renferment également deux types de structures impliquées dans le déroulement de la photosynthèse, un complexe *b6f*, très semblable au complexe *bc1* des bactéries photosynthétiques comme *Chlorobium*, et une ATP synthase à protons (figure 1.4).

Les photosystèmes se présentent sous forme de particules et sont constitués d'une association entre un complexe antennaire collecteur d'énergie lumineuse et un centre

réactionnel. Les deux types de photosystèmes I et II diffèrent en particulier par la nature de leurs centres réactionnels qui les constituent, de type I (à centre de fer-soufre) ou de type II quinoniques. Chez les plantes supérieures et les algues, les photosystèmes à centres réactionnels des deux types se trouvent rassemblés dans le même organite et associés dans leur fonctionnement pour le déroulement d'une photosynthèse.

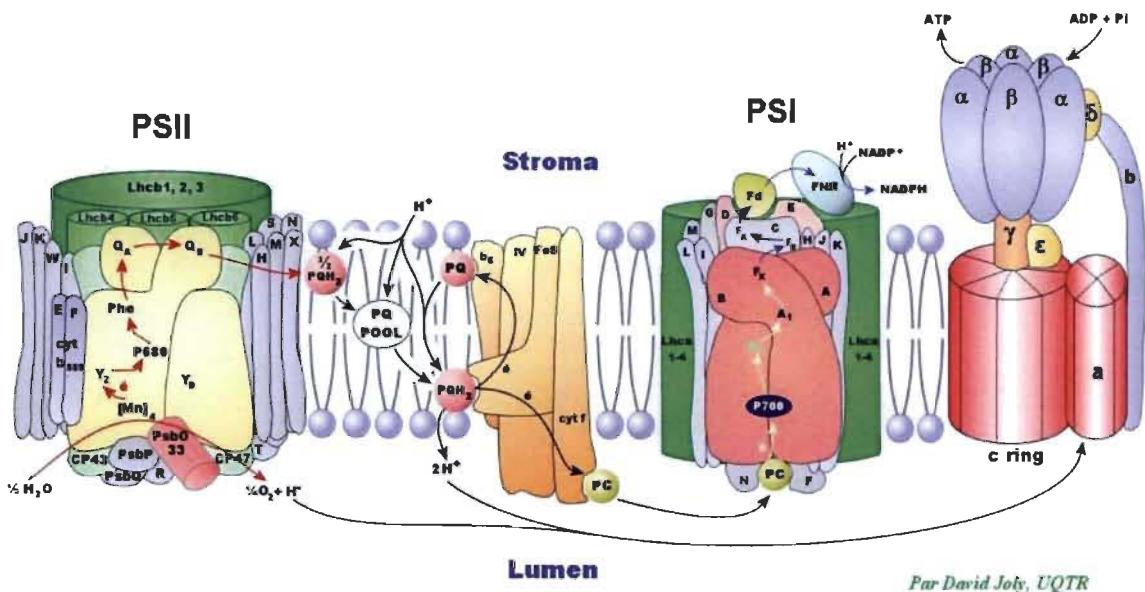


Figure 1.4 : Vue simplifiée de la constitution de la membrane photosynthétique des plantes supérieures avec ses constituants principaux : le PSI, le PSII, le cytochrome b₆f et l'ATP synthétase par David Joly, UQTR.

1.4.1 Le photosystème II (PS II)

Le photosystème II (PS II) est un complexe intégré dans la membrane des thylacoïdes. Il est composé de trois domaines protéiques comprenant plus d'une vingtaine de sous-unités protéiques. L'utilisation de l'énergie lumineuse, au niveau du complexe PS II, a comme effet l'oxydation des molécules d'eau et la réduction des molécules des plastoquinones. Les deux réactions ont lieu aux deux côtés opposés de la membrane thylacoïdale, respectivement le lumen et le stroma.

1.4.1.1 Antennes du PS II

Le rôle des antennes collectrices de lumière est de capter l'énergie lumineuse environnante et de la transférer vers le centre réactionnel du photosystème. Ces antennes permettent d'optimiser la collecte des photons. Elles sont constituées de deux parties : une antenne périphérique ou distale renferme la moitié de la chlorophylle et le tiers des protéines du thylakoïde. Elle est constituée de protéines CAB auxquelles sont associées des molécules de chlorophylle *a*, chlorophylle *b* et des carotènes. C'est l'antenne majeure (ou LHC II) responsable de l'absorption d'une large portion du spectre électromagnétique situé dans la zone du rayonnement visible et UV. Les complexes LHC II des protéines Lhcb 1, 2 et 3 forment les complexes majeurs de l'antenne distale et servent à capturer la lumière incidente. La radiation absorbée est transférée vers les complexes protéiques CP47 et CP43 de l'antenne proximale.

Les complexes LHCII sont composés de trois types de polypeptides désignés par Lhcb 1, 2 et 3, formant les complexes monomériques majeurs, dont le poids moléculaire est compris entre 24 et 29 kilodalton (kDa) (Green et Dumford, 1996). Dans certaines conditions d'excès d'énergie lumineuse, l'antenne majeure se dissocie et migre vers le photosystème I (antenne mobile). D'autre part, on trouve les complexes monomériques mineurs de l'antenne, pigments-protéines CP29, CP26 et CP24 (aussi connus sous le nom de Lhcb4, Lhcb5 et Lhcb6, respectivement) contenant une quantité plus faible de Chl *b* que l'antenne collectrice de lumière. Ils comprennent entre 5 et 10 % de la Chl totale liée au PSII (Barber et Kuhlbrandt, 1999). Ces protéines sont situées à la périphérie du LHCII et permettent le transfert de l'énergie d'excitation de l'antenne vers le centre réactionnel du PSII à l'aide des protéines CP43 et CP47, auxquelles sont associées la chlorophylle *a* et des carotènes (Bassi et al. 1997). 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 LHC II.

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). L'antenne intermédiaire est constituée des complexes protéines pigments codés par les gènes *lhcb4* (ou CP29), *lhcb5* (ou CP26) et *lhcb6* (ou CP24). Les complexes CP29 et 26 sont associés au centre réactionnel et le CP 24 au LHC II. On les retrouve dans les fractions enrichies en centres réactionnels ou en LHC II lors de séparation utilisant des détergents. Ces complexes protéines pigments sont moins riches en chlorophylles que les composés de l'antenne périphérique (4 à 9 chlorophylles par polypeptide) mais plus riches en xanthophylles, dont la violaxanthine (Farineau et al. 2006).

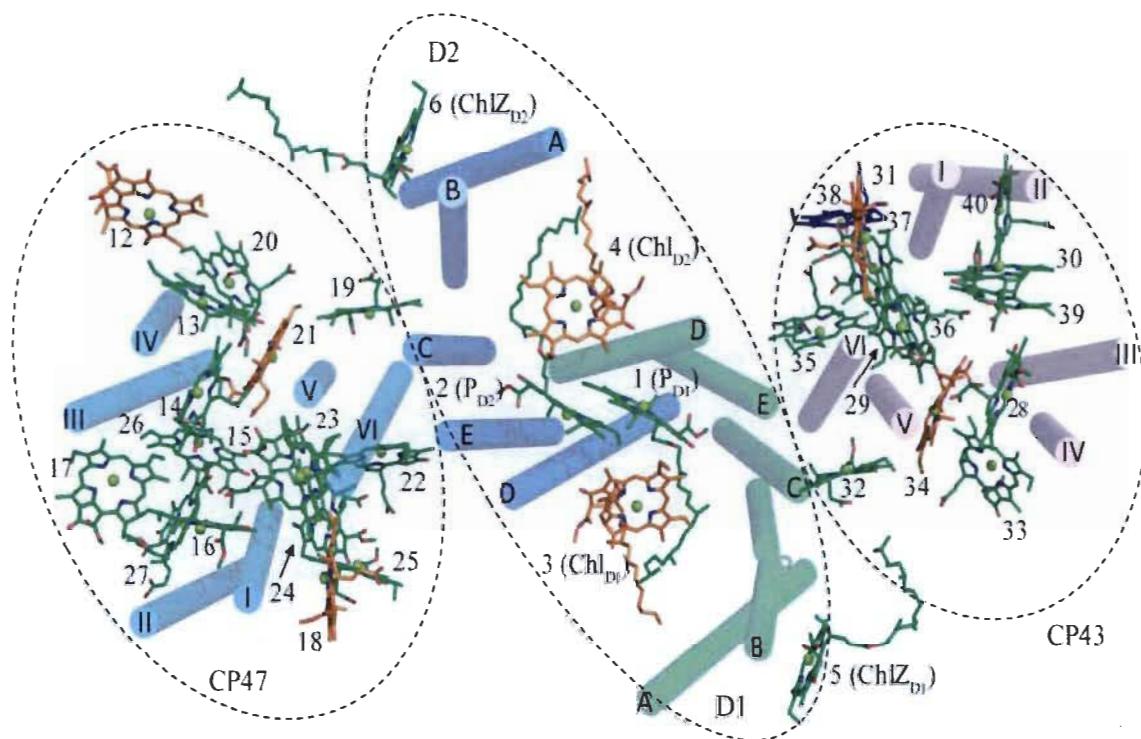


Figure 1.5 : Organisation de 35 chlorophylles dans un monomère du PSII. Le centre des atomes de magnésium est coordonné par l'eau, représenté en orange. Chlorophylles coordonnées par CP43-Asn 39 sont représentées en bleu. Toutes les autres chlorophylles sont coordonnées par Histidine (His) et sont représentées en vert. Les hélices transmembranaires de D1 et D2 sont étiquetées A-E et les hélices transmembranaires CP47 et CP43 sont étiquetées I-VI (Umena et al. 2011).

1.4.1.2 Le centre réactionnel du PS II

Le centre réactionnel du PSII est un imposant complexe protéique transmembranaire au niveau de la membrane thylacoïdienne, 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). Il est principalement composé d'un heterodimère protéique constitué des protéines D1 (PsbA) et D2 (PsbD), chacune des protéines contenant une molécule de phéophytine (Pheo1 et Pheo2 respectivement). La P680 est située à l'interface des protéines D1 et D2. Elle est le site donneur initial d'électron au niveau du PS II suite à la transduction d'énergie émergeant de l'antenne. Les cofacteurs tels 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 photo protection au sein du photosystème; le complexe de 4 atomes de manganèse, situé au périphérique 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).

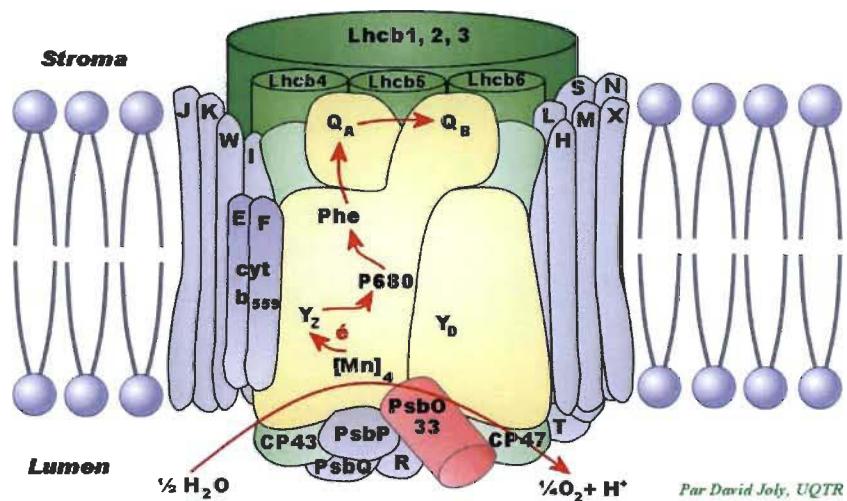


Figure 1.6 : Représentation schématique du centre réactionnel du PSII par David Joly, UQTR.

1.4.1.3 Le complexe d'oxydation de l'eau (COE) du PS II

Le complexe de dégagement d'oxygène est composé d'un tétramère «cluster» de manganèse (Mn_4Ca) et de trois polypeptides (33, 23, 16) qui font saillie dans le lumen et qui renferment du manganèse (Mn). Donc, le COE est l'arrangement des 3 protéines extrinsèques du PSII situé du côté du lumen du PS II proche de D1, lequel inclus également 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).

La protéine PsbP (23 kDa) 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 PsbQ (16 kDa) 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. Par contre, l'arrangement spatial du complexe de manganèse n'est pas connu avec certitude, plusieurs modèles étant encore envisagés (Sauer et Yachandra, 2004; Renger, 2007).

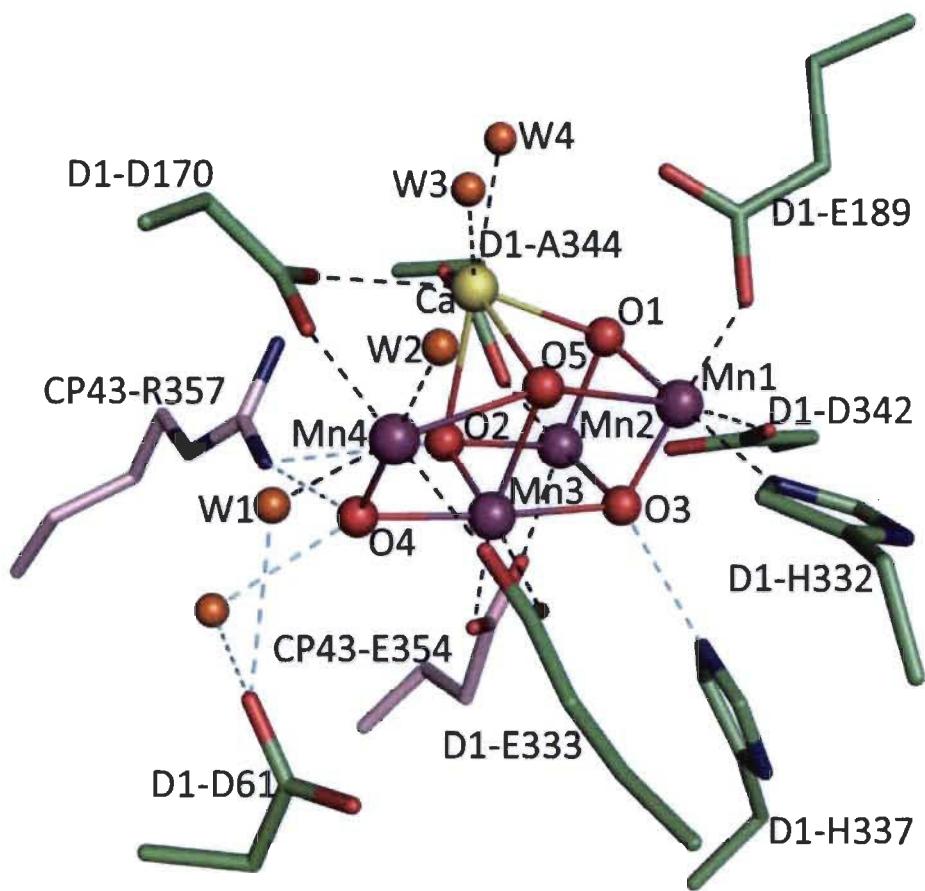


Figure 1.7 : Structure du complexe du Mn_4CaO_5 et les ligands de son environnement. Les distances indiquées sont les distances moyennes entre deux monomères. Le manganèse, le violet; le calcium, le jaune; l'oxygène, rouge; D1, vert, CP43, rose (Umena et al. 2011).

L'efficacité de la réaction photochimique primaire du PS II dépend du transfert d'électrons du centre réactionnel de la chlorophylle spéciale P680 vers l'accepteur primaire la phéo1. Cette perte d'électrons va permettre au $P680^+$ de recevoir un électron de la tyrosine (Z). Le donneur primaire du PS II acceptera un électron du CDO. Comme chaque réaction photochimique ne permet la libération que d'une charge positive, la formation d'une molécule d'oxygène exige quatre étapes photochimiques élémentaires (Whitmarsh et Govindjee, 2002), indiqués par les états S_0 , S_1 , S_2 , S_3 et S_4 . Ce modèle permet de mieux comprendre l'induction de la réaction photochimique par la photooxydation d'eau. Le «cluster» de manganèse du CDO accumule des charges positives avec la perte des électrons en fournissant le potentiel nécessaire pour la

séparation de 2 molécules d'eau en oxygène et 4 protons. Ces protons sont libérés dans le lumen en contribuant à la formation d'un gradient transmembranaire de protons nécessaire à la synthèse de l'ATP. Une fois l'état S₄ atteint, le CDO retourne spontanément à l'état S₀ en réagissant avec l'eau pour prendre ses électrons et libérer de l'oxygène (Kok et al. 1970).

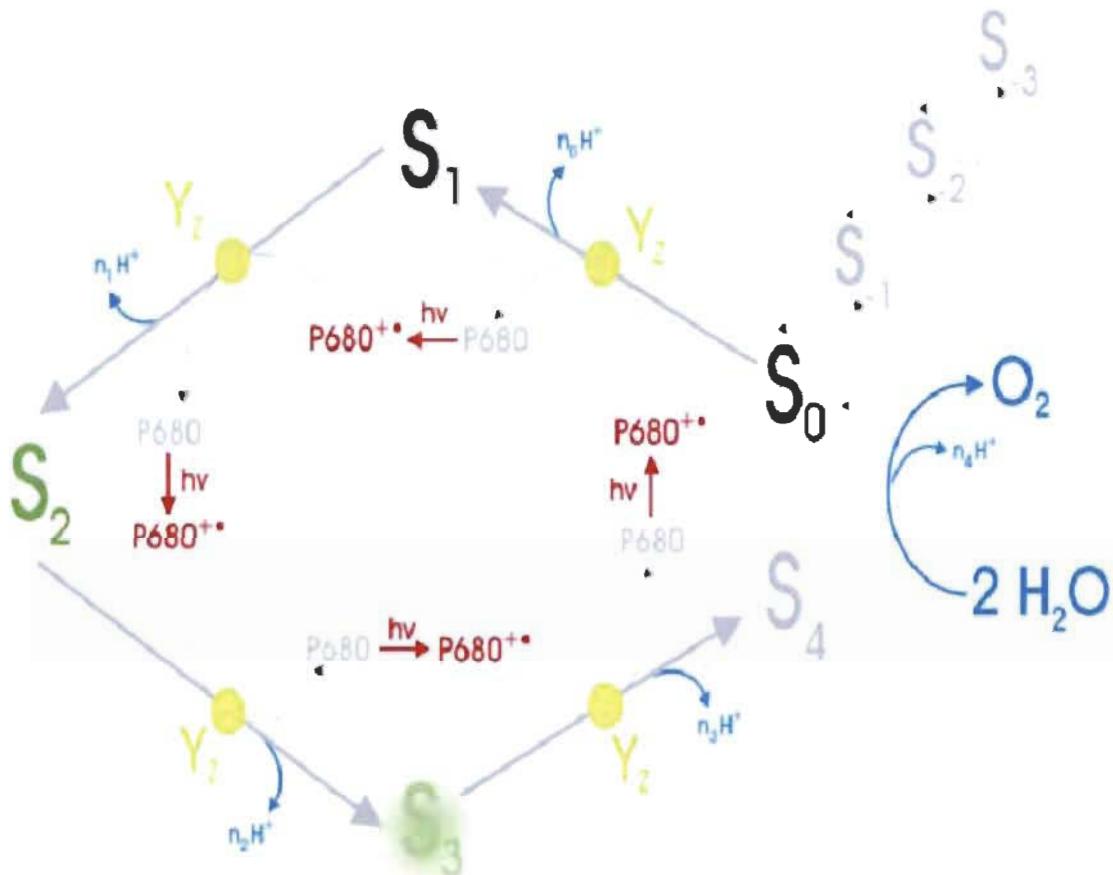


Figure 1.8 : Représentation schématique de la formation des états S et de la production de protons pendant la photolyse de l'eau conduisant au dégagement d'oxygène (Gernot Renger, 2011).

1.4.2 Structure et fonction des PS I

Malgré le fait que le photosystème I (PSI) comporte plusieurs similarités avec le PSII, on peut noter des différences majeures au niveau structurel et fonctionnel entre les deux photosystèmes. Le PSI est un composé de 19 sous-unités protéiques distribuées entre le centre réactionnel (P700) et les deux dimères d'antenne collectrice de lumière (LHCI), spécifique au PSI (Lhca1-Lhca4 et Lhca2-Lhca3) d'une masse total du complexe d'environ 525 kDa. Chaque PSI contient environ 200 molécules de Chl, deux phylloquinones et trois groupements du complexe Fer-Soufre (Fe_4S_4) (Scheller et al. 2001; Ben-Shem *et al.* 2003).

Lorsque les antennes collectrices de lumière du PSI absorbent l'énergie lumineuse, le P700 passe à l'état excité $\text{P}700^*$. Au niveau du PSI, la séparation de charges se fait (1 - 3 ps) entre le $\text{P}700^*$ et une molécule de chlorophylle α située sur la sous-unité PsaA, notée Ao. Le $\text{P}700^+$ formé va ensuite récupérer un électron provenant de la plastocyanine (PC) (Jensen et al. 2007). Les électrons reçus par la phylloquinone, A₁, sont ensuite transférés à la ferrédoxine (Fd) en passant par les complexes protéiques fer-soufre indiqués par Fx, FA et FB respectivement (figure 1.11 A). La réduction de l'accepteur terminal d'électrons, le NADP⁺ en NADPH, est catalysée par la ferrédoxine NADP-réductase. Par la suite, le NADPH est utilisé comme réducteur pour la fixation du CO₂ et la synthèse des glucides pendant les réactions du cycle de Calvin (Raines, 2003).

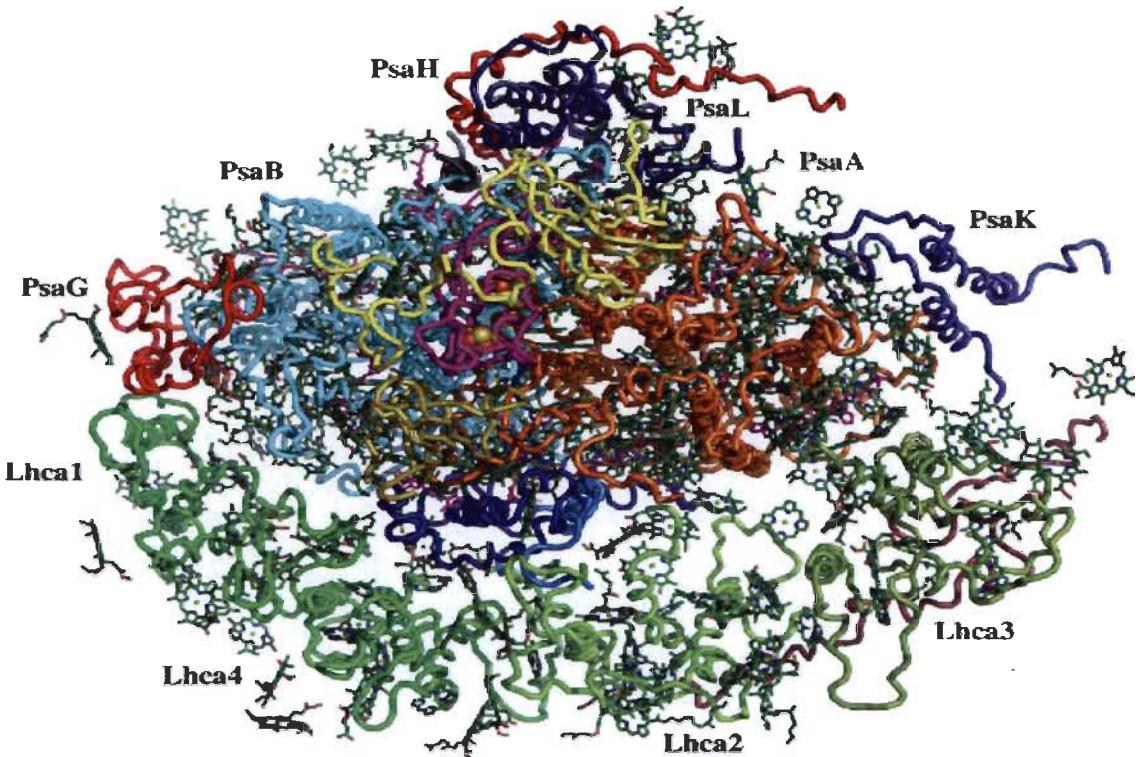


Figure 1.9 : Modèle structurel du photosystème I. Les chlorophylles sont en vert, les caroténoïdes en magenta et les quinones en bleu (Nelson, 2011).

1.5 Le transport transmembranaire des électrons

Le fonctionnement en série des deux photosystèmes assure un transfert des électrons au sein d'une chaîne de composés redox. L'eau est le donneur d'électrons du PS II. Lorsque le P680 est excité par la lumière un électron est transféré vers la phéophytine a (pheo a), celui-ci est transféré par une chaîne de transporteurs d'électrons constitués des quinones (Q_A et Q_B) et de plastoquinones (PQ) et ensuite au cytochrome b_6f et les PC. Deux électrons sont nécessaires pour réduire une PQ associée au site QB. Pendant ces deux réactions d'oxydoréductions successives, la PQ subit un changement de configuration stéréochimique et elle doit capter deux protons du stroma pour se neutraliser. Les différentes étapes d'oxydoréduction entre les quinones (Q_A et Q_B) et la PQ sont résumées dans la figure 1.10 (Whitmarsh et Govindjee, 2002).

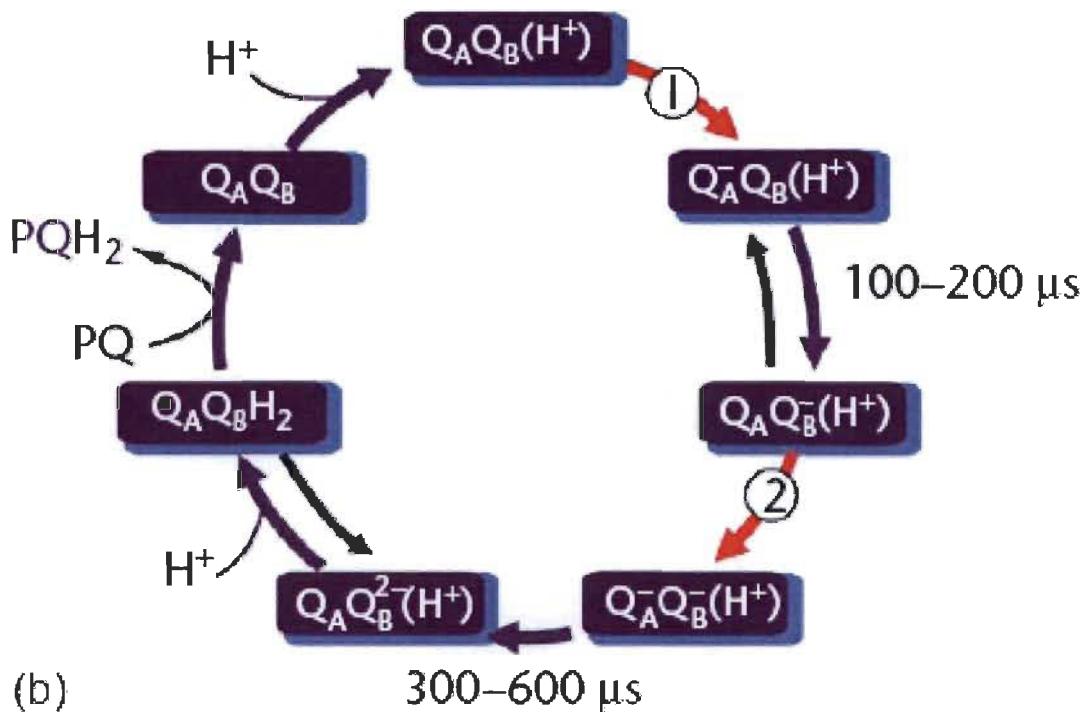


Figure 1.10 : Représentation schématique des réactions d'oxydoréduction entre les quinones A (Q_A), B (Q_B) et plastoquinones (PQ) (d'après Whitmarsh et Govindjee, 2002).

Une fois formée, la plastoquinone réduite PQH_2 se détache du site Q_B et elle va diffuser dans le lumen des thylacoïdes (Heller et al. 1998). Par la suite, les molécules PQH_2 réduisent les cytochromes b6f en libérant deux protons dans le lumen du thylacoïde, ce qui contribue à la formation du gradient transmembranaire de protons pour la synthèse de l'ATP. Les électrons reçus par les cytochromes b6f sont ensuite transférés à la plastocyanine puis au $P700^+$ du PSI (Faller et al. 2001).

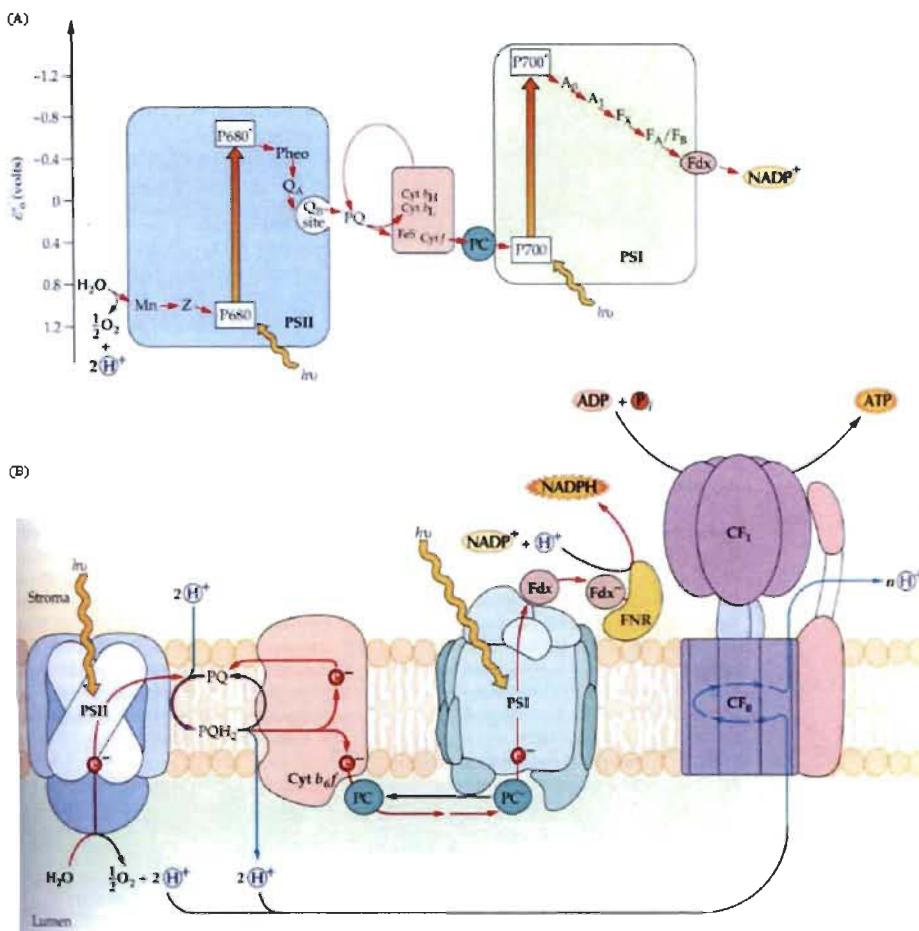


Figure 1.11 : (A) Représentation schématique du potentiel redox (valeurs moyennes de E_m) de chaque transporteur d'électrons dans la membrane de thylacoïde. (B) organisation des transporteurs d'électrons dans la membrane de thylacoïde. Les complexes membranaires sont les photosystèmes II et I, le cytochrome b6f, la plastocyanine et l'ATP synthétase. Les flèches indiquent le transfert des électrons (rouge) et la translocation de protons (bleu) (d'après Malkin et Niouugi 2000).

D'autre part, la majorité des herbicides agissent directement sur l'activité photochimique du PSII en bloquant le transport d'électrons au niveau de l'accepteur secondaire du PSII, Q_B associé à la protéine Dl. Par conséquent, ils diminuent la formation de l'ATP et du NADPH et induisent des effets néfastes sur la croissance et le développement des plantes. (Ikeda et al. 2003).

1.6 La fixation du CO₂

La compréhension des facteurs déterminant l'incorporation du CO₂ atmosphérique à l'échelle de la feuille est nécessaire aux études consacrées aux flux de carbone entre les plantes et l'atmosphère, et plus généralement au cycle du carbone dans les écosystèmes. En effet, la feuille est la principale interface entre la plante et l'atmosphère, et le lieu de la quasi-totalité des entrées de carbone d'une plante. L'énergie nécessaire à la fixation du CO₂ est fournie par les réactions photochimiques intervenant dans le stroma du chloroplaste au cours du cycle du Calvin. Ce dernier fonctionne en trois étapes successives : la première phase consiste à la fixation du CO₂ par une molécule de Ribulose 1,5 bisphosphate (RubP) catalysée par une enzyme chloroplastique: la rubisco (Ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase / oxygénase). Cette réaction vise à régénérer le RubP, intervenant dans le stroma chloroplastique, en utilisant l'ATP et le NADPH.

Le carbone incorporé ne servant pas à la régénération du RubP, permet la synthèse d'une molécule organique à trois carbones : le glycéraldéhyde-3-phosphate lequel pourra être exporté du cycle et servir à la synthèse d'amidon. La Rubisco possède également une activité oxygénase, compétitrice de l'activité carboxylase, qui permet l'oxydation du RubP par l'oxygène. Ce processus appelé photorespiration est à l'origine d'un nouveau cycle biochimique se répartissant dans trois compartiments cellulaires : chloroplastes, peroxysomes et mitochondries. La partition entre carboxylation et oxygénation du RubP est fonction des concentrations de CO₂ et d'O₂ au niveau des sites actifs de la Rubisco. Si l'on diminue la concentration en O₂, l'activité du cycle photorespiratoire décroît. Inversement, une plus faible disponibilité du CO₂ augmente l'activité du cycle photorespiratoire.

La répartition entre carboxylation et oxygénation est également affectée par la température : lors d'une élévation de la température foliaire, la solubilité de l'oxygène décroît moins vite que celle du CO₂, ce qui favorise la photorespiration. Pour une mole d'oxygène utilisée par la Rubisco, le cycle produit une demi-mole de carbone (libération d'une demi-mole de CO₂) et il a été estimé que 20 à 30 % du carbone fixé est consommé

par la photorespiration (Lawlor, 1993). Cette réaction aboutit à la formation de 3-phosphoglycérate (PGA). Pendant la deuxième phase, le PGA est réduit en triose phosphate (3 phosphoglycéraldéhyde) qui sera exportée dans le cytosol pour la formation de sucre. La dernière phase du cycle de Calvin comprend la régénération de la ribulose 1,5-bisphosphate (Raines, 2003).

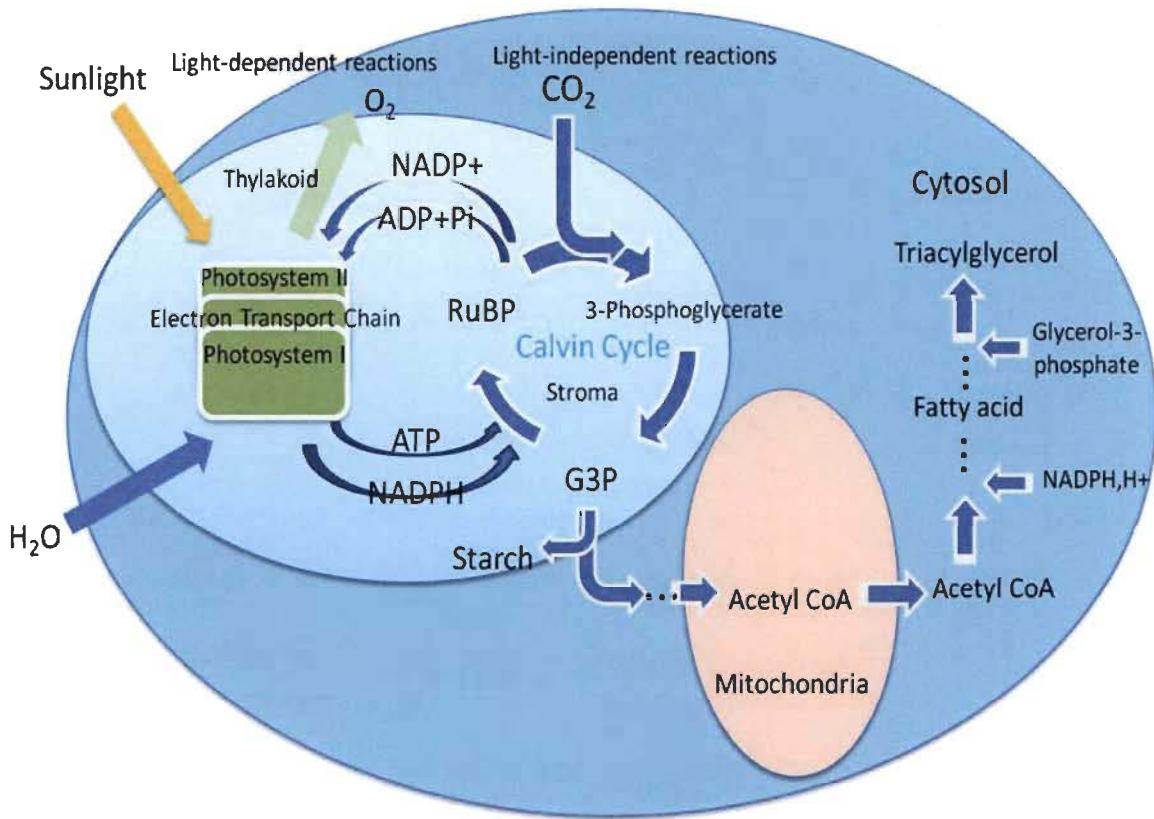


Figure 1.12 : Schéma de la photosynthèse, la fixation du CO_2 et l'accumulation du carbone dans les cellules de micro algues (Xianhai Zenga et al. 2011).

CHAPITRE II

FONDEMENTS THÉORIQUES

2.1 Dissipation d'énergie au niveau du photosystème II

L'énergie lumineuse absorbée par les pigments photosynthétiques n'est pas toute utilisée par les réactions photochimiques. Lorsqu'une molécule de chlorophylle (*a* et *b*) reçoit un photon, elle passe d'un état stable à l'état excité, ce dernier ayant un niveau d'énergie plus élevé. Il existe 4 voies de dissipation d'énergie au niveau du PS II (figure 2.1) :

- 1- Fluorescence
- 2- Photochimique
- 3- Non photochimique (chaleur)
- 4- Formation d'espèces réactives d'oxygène (ERO)

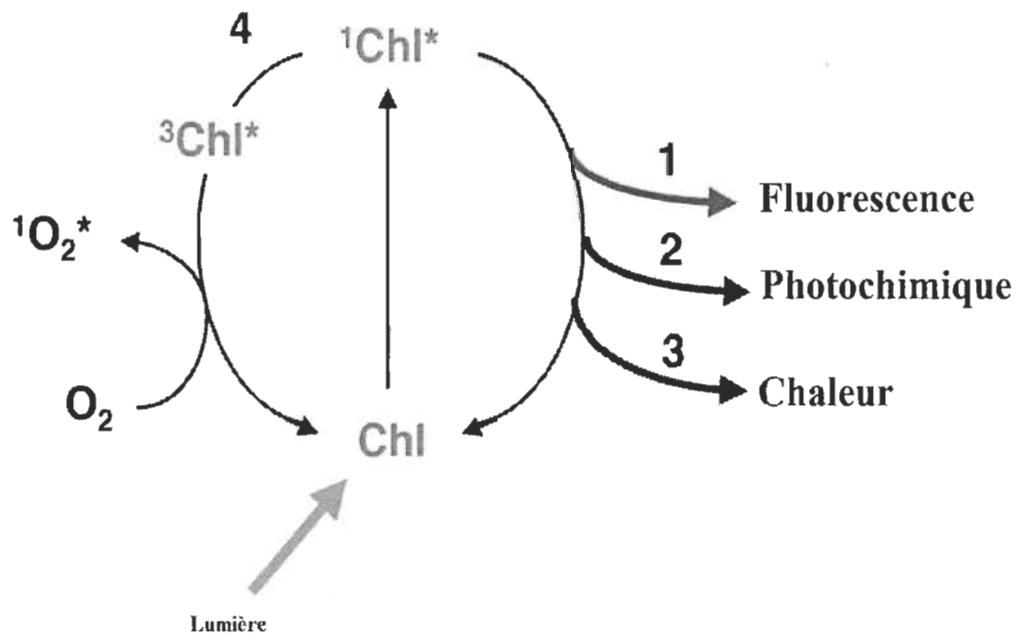


Figure 2.1 : Voies de dissipation d'énergie de la chlorophylle excitée du PSII (adapté de Müller et al. 2001).

Ces quatre destinations coexistent et sont en compétition. Dans les conditions normales, 90 % de l'énergie totale absorbée est utilisée par la photosynthèse et une partie variable entre 1 et 10 % sera dissipée sous forme de chaleur ou sous forme de fluorescence à partir de la *Chl a* au niveau du PSII. De toute façon, la diminution de la dissipation par l'une des voies entraînera automatiquement une augmentation de la dissipation via les autres voies.

2.1.1 Dissipation d'énergie sous forme de fluorescence

La mesure de fluorescence chlorophyllienne est une méthode d'investigation largement utilisée pour le suivi de l'activité photosynthétique sur algues, chloroplastes ou feuilles entières. Kautsky et Hirsh (1931) furent les premiers à découvrir que la fluorescence de la chlorophylle présentait une variation dans le temps lorsqu'une plante était illuminée en continu après adaptation à l'obscurité. Cette fluorescence réémise par les pigments photosynthétiques montre une intensité variable donnant une cinétique spécifique appelée aujourd'hui « effet Kautsky ». L'émission de fluorescence se produit au cours des transferts de l'énergie d'excitation parmi les molécules de *Chl a* par le mécanisme inverse de l'absorption, le pigment excité retourne à l'état fondamental et à un quantum lumineux correspondant à la différence d'énergie entre les deux états émis. Le chemin de retour à l'état fondamental le plus favorable est celui qui minimise la durée de vie de l'état excité.

Dès lors, si la désactivation par fluorescence est plus rapide qu'un mécanisme non fluorescent, c'est elle qui se produira. Plusieurs facteurs physiologiques, cinétiques et environnementaux peuvent affecter la dissipation d'énergie sous forme de fluorescence concernant son intensité en fonction du temps. Bien qu'elle ne représente qu'une faible partie des quanta absorbés (de 0.5 à 3 %), son étude fournit des informations sur la dissipation de l'énergie dans les photosystèmes, en particulier par la voie photochimique dans le PS II. Par contre, la fluorescence du PS I est indépendante du rendement photochimique.

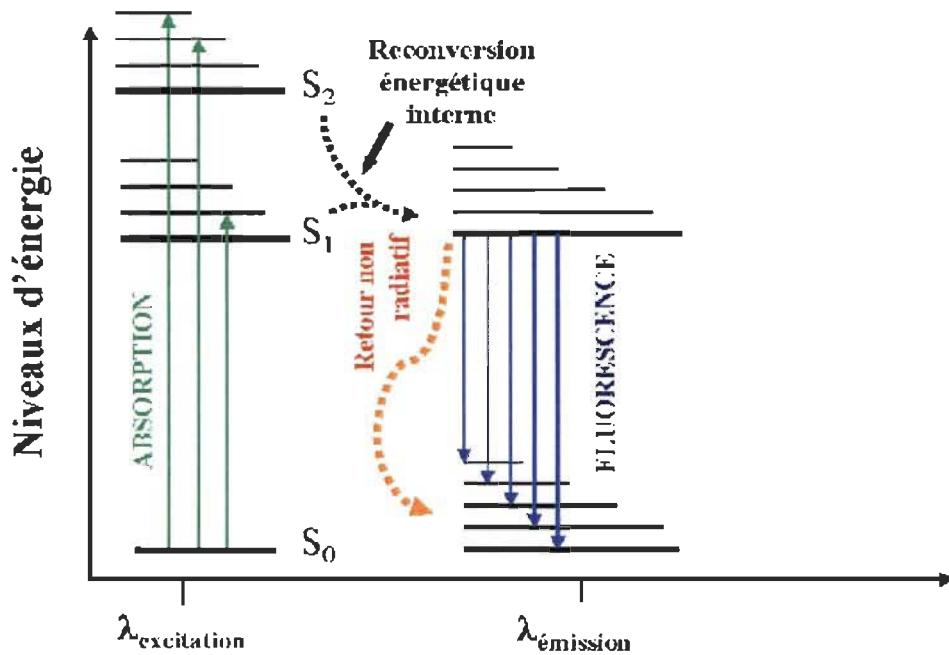


Figure 2.2 : Diagramme de Jablonski simplifié de l'absorption d'énergie des principales voies de dissipation en photosynthèse.

2.1.1.1 Fluorescence chlorophyllienne

La fluorescence chlorophyllienne provient principalement des *Chl a* des LHCII. Par contre, les *Chl b* servent comme pigments accessoires pour le transfert rapide d'énergie d'excitation aux molécules de *Chl a* (Lazar, 1999). Soit qu'il est dans un état ouvert fonctionnel ou fermé, le PS II existe sous deux états fluorescents : peu (ou pas) fluorescent à l'état ouvert et fortement fluorescent à l'état fermé. La fluorescence d'état ouvert correspond à la faible émission liée au transfert d'excitons dans les antennes. Dans l'état fermé, provoqué par exemple par l'envoi d'un éclair longue durée, l'arrivée d'un exciton dans le centre réactionnel du PSII conduit à une ré-émission de l'énergie non utilisée qui rend compte de la quantité d'énergie normalement transformée par l'activité photochimique (Govindjee, 1995).

Cependant, quand la dissipation d'énergie provenant de la séparation de charge au centre réactionnel du PSII n'est pas réalisée par le transport d'électrons (les transporteurs d'électrons sont à l'état réduit), la dissipation d'énergie par la fluorescence sera

intensifiée à cause de la recombinaison de la séparation de charge connue comme réduction de P680+ par la Pheo-. Quand l'accepteur primaire du PSII, Q_A , est dans l'état oxydé par la chaîne de transport d'électrons, la fluorescence va être diminuée (Duysens et Sweers, 1963; Papageorgiou, 1975).

La fluorescence variable, sous ces conditions, est directement dépendante de l'état d'oxydoréduction des transporteurs d'électrons du PSII et du PSI. Donc, lors d'une illumination d'intensité saturante, les accepteurs primaires d'électrons du PSII sont à l'état réduits (Q_A^-). Sous ces conditions, le rendement de fluorescence variable sera maximal (F_m), la différence entre l'intensité de fluorescence émise par les LHCn lorsque tous les centres réactionnels sont ouverts (Q_A) et lorsque les centres réactionnels sont à l'état fermé (Q_A^-) donne la fluorescence variable qui dépend de la capacité photochimique du PSII.

2.1.1.2 Le rendement et la cinétique de la fluorescence chlorophyllienne des photosystèmes

La photosynthèse repose sur deux photosystèmes (PSI et PSII) dont l'activité peut être assimilée à deux piles assurant le fonctionnement d'une centrale électrique à énergie solaire. Cette centrale convertit l'énergie solaire en énergie utilisable. Au cours de cette transformation, la centrale subit des pertes qui se traduisent chez les plantes par un dégagement de chaleur et une émission de fluorescence. Donc, l'énergie reçue est équivalente à l'énergie transformée plus les pertes. Plus le rendement de transformation sera important (la plante fonctionne correctement), moins les pertes seront significatives (faible émission de fluorescence / chaleur). En mesurant cette dissipation d'énergie, la fluorimétrie permet de rendre compte du rendement de transformation et donc de l'efficacité du processus de photosynthèse.

Cependant, il y a plusieurs questions fondamentales concernant l'interprétation de la cinétique de la fluorescence qui peuvent être liées au fait que plusieurs facteurs peuvent la modifier. La mesure de la cinétique de fluorescence chlorophyllienne est devenue un

outil important pour analyser au niveau moléculaire l'état des réactions photochimiques du PSII et du transport des électrons entre le PSII et le PSI. Lorsque l'énergie d'excitation n'est pas suffisante pour induire la séparation de charge, le centre réactionnel du PSII reste ouvert, c'est-à-dire que Q_A reste à l'état oxydé. Dans cet état, la fluorescence de base, F_0 , est émise en majorité par les antennes de chlorophylle α du PSII, mais aussi par une faible contribution du PSI (d'environ 20 % chez les plantes C3; Pfundel, 1998). Lorsque l'énergie d'excitation atteignant le centre réactionnel du PSII est assez élevée, la séparation de charges s'effectue, induisant une réduction de Q_A et un transport d'électrons entre le PSII et le PSI. Dans ce cas, le rendement de la fluorescence variable (F_v), émise par les antennes du PSII, dépendra de l'état d'oxydoréduction des transporteurs d'électrons entre le PSII et le PSI. Le rendement de la fluorescence maximale (F_m) est obtenu quand tous les Q_A sont réduits en présence d'une lumière saturante. À ce niveau, la capacité photochimique du PSII atteint son maximum. Ainsi, la fluorescence peut être utilisée pour étudier les processus de transfert de l'énergie lumineuse, l'efficacité des réactions photochimiques du PSII et le transport des électrons, qui sont interdépendants avec les autres processus biochimiques ou physiologiques liés à la photosynthèse (Lazâr, 1999; 2006; Krause et Jahns, 2003). Actuellement, l'utilisation du PAM (Pulse Amplitude Modulated) et du PEA (Plant Efficiency Analyser) permet de mesurer *in vivo* l'activité photosynthétique et les processus qui lui sont liés.

L'analyse du déclin de fluorescence des systèmes photosynthétiques fait apparaître une cinétique complexe, souvent formée de trois ou quatre composantes exponentielles dont les durées de vie s'échelonnent d'environ 50 ps à 2.5 ns. Ainsi, sur algues ou chloroplastes d'épinard, Hodges et Moya, (1987) ont déterminé la présence de trois composantes en F_0 et de quatre composantes en F_m . Cette complexité de la cinétique de fluorescence est attendue si on tient en compte de la grande hétérogénéité de l'appareil photosynthétique, constitué de deux photosystèmes (I et II), possédant chacun son propre système pigmentaire (Barber 1983), eux-mêmes constitués de différents types de complexes pigments-protéines (Bassi et Dainese, 1992). Cependant, les différentes composantes du déclin de fluorescence montrent des variations homogènes en durée de

vie et en rendement lorsque l'état d'oxydoréduction de l'accepteur primaire Q_A varie (Moya et al. 1986; Hodges et Moya, 1987; Keuper et Sauer, 1989).

Les trois composantes de la fluorescence sont toutes affectées en durée de vie par le quenching de la fluorescence. Une relation $\tau = f(\phi)$ linéaire est observée dans le cas du quenching photochimique (Moya et al. 1986). Ces deux aspects de la cinétique de fluorescence des systèmes chlorophylliens, hétérogénéité du déclin d'une part et variations des durées de vie de l'ensemble des composantes sous l'effet d'un quenching d'autre part, ont souvent semblé contradictoires. En effet, l'hétérogénéité du déclin signifie que l'énergie se trouve répartie entre plusieurs compartiments distincts, entre lesquels elle peut éventuellement circuler avec des constantes de cinétiques d'un ordre de grandeur inverse des durées de vie mesurées. Par contre, des variations homogènes des durées de vie suggèrent un quenching agissant sur l'ensemble des compartiments.

Différentes hypothèses ont été proposées à propos des structures physiques correspondant à ces compartiments. De ce fait, la difficulté à concilier entre l'hétérogénéité de la fluorescence, qui suggère une localisation des émissions, avec l'homogénéité des variations, qui suggère plutôt un effet délocalisé, explique pourquoi, jusqu'à ce jour aucun modèle satisfaisant de l'émission de fluorescence du PSII n'a pu être proposé. Cependant, pour tirer le meilleur profit des mesures de durée de vie de fluorescence sur couverts végétaux, il est nécessaire d'améliorer l'interprétation théorique des différentes émissions du déclin.

2.1.1.3 Paramètres de la fluorescence des chlorophylles

Lorsqu'une feuille est mise à l'obscurité pour quelques minutes, le système photosynthétique se met au repos, les chloroplastes ne sont plus énergisés, on détecte une fluorescence faible d'état ouvert F_0 dont le rendement est minimal. Si cette feuille est exposée à un éclair lumineux, le système photosynthétique répond par un signal de fluorescence comportant deux phases : une phase d'augmentation très rapide de l'intensité de fluorescence d'une valeur initiale F_0 à une valeur maximale F_m . Une

deuxième phase lente et descendante de l'intensité vers un état stationnaire F_s . Lorsqu'elle est présentée sur une échelle de temps logarithmique, cette cinétique montre les transitions: F_0 , F_J , F_I et F_P ($F_P = F_M$). Ces transitions représentent différents états d'oxydoréduction des transporteurs d'électrons associés au PSII.

Il est généralement convenu que la phase O-J représente la réduction de l'accepteur primaire d'électrons Q_A (Neubauer et Schreiber, 1987; Strasser et Govindjee 1992, Joly et Carpentier, 2007a). Cependant, l'origine exacte des phases J-I et I-P reste controversée (Schreiber, 2002; Lazar, 2006). Le niveau de fluorescence à la transition (F_I) correspond à la première réduction de Q_B ($Q_A^-Q_B^-$) (Strasser et al. 1995). La phase I-P reflète une accumulation progressive de Q_B doublement réduite ($Q_AQ_B^{2-}$) (Strasser et Govindjee, 1991). Récemment, Pospisil et Dau (2000; 2002) ont proposé une analyse quantitative simple pour éliminer ce problème. Ils ont fait une décomposition des courbes expérimentales d'IF des thylakoïdes isolés par l'utilisation de trois cinétique du premier ordre, correspondant aux trois phases de la montée O-J-I-P. Boisvert et al. (2006) ont utilisé la même méthode pour élucider l'origine de chaque étape. Ils ont trouvé de nouvelles preuves indiquant que seule la phase I-P est directement liée à la réduction du pool de PQ, alors que la phase J-I n'est pas liée à la fermeture complète du centre réactionnel du PSII.

Après la transition P, le rendement de fluorescence montre une diminution progressive, appelée effet «quenching ». Cette diminution est causée par le transfert des électrons du PSII vers le PSI et le NADP⁺ (Krause et Weis, 1991). La différence ($F_m - F_0$) est appelée fluorescence variable F_v , F_v/F_m est une mesure du rendement quantique maximum de la réaction photochimique du PSII. Ce rapport est au maximum de 0.83 chez les plantes supérieures, ce qui signifie que la quantité maximale d'électrons émise par un centre PS II ayant reçu une excitation est de 0.83 électron. Ce rendement de la réaction photochimique de 83 % pour le PSII est faible comparativement avec celui du PSI qui est de 95 %. Cette différence de rendement est due principalement au fait que la capture d'énergie par les antennes PSII est moins efficace à cause de sa vitesse qui est de 200 à 300 ps (durée de transfert d'électron du P680 vers l'accepteur secondaire Q_A),

comparativement au PS I avec un temps de capture d'énergie de l'ordre de 20 à 30 ps (durée de transfert de la charge vers A1 accepteur secondaire). Par contre, la vitesse de transfert d'électron par la chlorophylle excité P* est d'environ la même chez les deux photosystèmes isolés soit environ 3 ps. La différence des photosystèmes vient essentiellement du PSII qui a une différence d'énergie entre les états P*680 – Phéo et P₆₈₀⁺ – Phéo⁻ très faible. Ceci est dû aux propriétés très particulières de l'antenne interne du PSII qui a un maximum d'absorption situé à quelques nm seulement de la trappe (Trissl et Wilhem, 1993; Schatz et al. 1988).

2.1.2 Théorie de quenching de la fluorescence

La fluorescence est le processus d'émission lumineuse (UV-visible) lors de la relaxation radiative, entre l'état excité singulet (S_1) et l'état fondamental singulet (S_0), spontanée d'une espèce excitée par absorption d'un rayonnement incident. Comme nous l'avons expliqué précédemment, l'état excité S_1 peut être désactivé (atténué) par différents processus (figure 2.2). Parmi ces voies, on trouve celle non radiative biomoléculaire sous forme de quenching.

Le quenching de la fluorescence est un processus qui diminue l'intensité d'émission de la fluorescence. On distingue principalement deux mécanismes de quenching :

- 1- Quenching par collision ou dynamique
- 2- Quenching par formation d'un complexe entre le fluorophore et le quencher
C'est le quenching statique.

Le quenching peut se produire via deux processus : soit par transfert d'énergie ou bien par transfert d'électron. Dans la plupart des cas, les deux processus participent au phénomène de quenching de la fluorescence.

L'atténuation de la fluorescence peut être étudiée à l'aide de l'équation de Stern-Volmer suivante (Lakowicz 1993) :

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (2.1)$$

Où F_0 et F sont respectivement, les intensités de fluorescence en absence et en présence d'une concentration définie du quencher, K_{SV} et la constante de Stern-Volmer et Q la concentration du quencher. La constante K_{SV} peut être obtenue expérimentalement à

partir de la pente de la droite qui représente la variation de $\frac{F_0}{F}$ en fonction de $[Q]$. Il est important de signaler que l'obtention de la constante K_{SV} ne nous permet pas de confirmer à elle seule s'il s'agit d'un quenching dynamique ou statique puisqu'on aura la même pente dans les deux cas. En général on peut distinguer entre les deux mécanismes à l'aide de leur dépendance vis-à-vis de la température et la viscosité du milieu ou bien par les mesures de temps de vie de la fluorescence. En effet, quand le quenching se déroule de façon dynamique, la constante K_{SV} est exprimée comme suit :

$$K_{SV} = K_D = K_q t_0 \quad (2.2)$$

Où K_D est la constante de quenching bimoléculaire dynamique, K_q est la constante de vitesse de quenching et t_0 le temps de vie de la fluorescence en absence du quencher. Il a été confirmé que le quenching dynamique dépend fortement de la température, car ce mécanisme est contrôlé par le phénomène de diffusion du milieu qui dépend de sa part de la température, K_D augmente avec la température (Lakowicz, 1993). D'autre part, pour le quenching statique, il a été démontré par des mesures de temps de vie de fluorescence que ce mécanisme n'a aucune influence sur le temps de vie de fluorescence, contrairement au quenching dynamique qui conduit à la diminution du temps de vie de fluorescence. L'analyse des spectres d'absorption nous permet de différencier entre les deux mécanismes de quenching. On n'observe aucune modification dans le spectre d'absorption du fluorophore en cas d'un quenching dynamique. Par contre, le quenching statique conduit dans la majorité des cas à la formation de complexes non fluorescents à l'état fondamental, résultant en une perturbation du spectre d'absorption du fluorophore (Lakowicz, 1993; Valeur, 2002).

Il est à noter que le fluorophore peut subir simultanément l'action des deux mécanismes de quenching dynamique et statique. Dans ce cas, il n'y aura pas de linéarité dans

l'obtention de l'équation de Stern-Volmer. De ce fait, il y a une forme modifiée de cette équation qui tient compte des deux mécanismes.

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_D [Q]) \times (1 + K_{ass} [Q]) \quad (2.3)$$

Ce qui peut nous donner

$$\frac{\left(\frac{F_0}{F}\right) - 1}{[Q]} = (K_D + K_{ass}) + K_D K_{ass} [Q] \quad (2.4)$$

Où K_{ass} , est la constante d'association, avec $K_{ass} = K_{SV}$ (Lakowicz 1993). Alors, la valeur des constantes K_{ass} et K_D peut être obtenue expérimentalement à partir de la droite qui

représente la variation de $\frac{\left(\frac{F_0}{F}\right) - 1}{[Q]}$ en fonction du $[Q]$: la pente nous donne $K_D K_{ass}$ et à partir de l'intercepte on obtient $K_D + K_{ass}$.

2.1.3 Dissipation d'énergie sous forme de chaleur

Une partie de l'énergie absorbée par les antennes collectrices de lumière est dissipée sous forme non photochimique, en chaleur. Dans la photosynthèse, la dissipation d'énergie par la voie non photochimique peut montrer une considérable variation qui représente une part des mécanismes de protection de l'appareil photosynthétique contre un excès d'énergie lumineuse absorbée par les pigments (Niyogi, 2000). La dissipation d'énergie en excès sous forme de chaleur constitue la principale voie de régulation de l'énergie non dommageable dans les photosystèmes (Horton et al. 1996). Cette dissipation d'énergie peut prendre différentes voies selon les conditions environnementales et les propriétés spécifiques des espèces de plantes (Demmig-Adams and Adams, 1996).

La formation de xanthophylles, pigments de type caroténoïde, constitue un mécanisme biochimique qui permet la dissipation sous forme de chaleur de l'excès d'énergie lumineuse reçue par les feuilles de la plante. Ces pigments se forment à partir de la violaxanthine présente dans les membranes. Les xanthophylles impliquées dans ce processus sont associées à l'antenne du PSII. Le plus important mécanisme de régulation de la dissipation d'énergie par la voie non photochimique est le cycle des xanthophylles. Dans ce processus, contrôlé par l'enzyme violaxanthine dé-époxydase (violaxanthine: ascorbate oxydoréductase), la violaxanthine est transformée de façon réversible en zéaxanthine, via le pigment intermédiaire anthéraxanthine. Les étapes de ce processus sont présentées à la figure 2.3 La zéaxanthine peut accepter directement l'énergie d'excitation des chlorophylles des antennes collectrices de lumière, menant à la dissipation d'énergie sous forme de chaleur (Horton et al. 1996; Demmig-Adams et al. 1996). La liaison de la zéaxanthine avec les complexes protéiques du PS II se fait avec la participation de la protéine PsbS qui est essentielle à la régulation de la dissipation d'énergie sous forme de chaleur (Niyogi et al. 2004).

La protonation de la protéine PsbS suite à l'acidification du lumen induit un changement de conformation au niveau du PSII qui, avec la liaison de la zéaxanthine, permet la dissipation d'énergie sous forme de chaleur. Il a aussi été proposé que ce changement de conformation induit, au niveau du PSII, un transport non linéaire d'électrons impliquant le cytochrome b559, une sous unité périphérique du PSII. Ce transport alternatif permettrait de protéger le PSII lors d'un excès de lumière (Poulson et al. 1995).

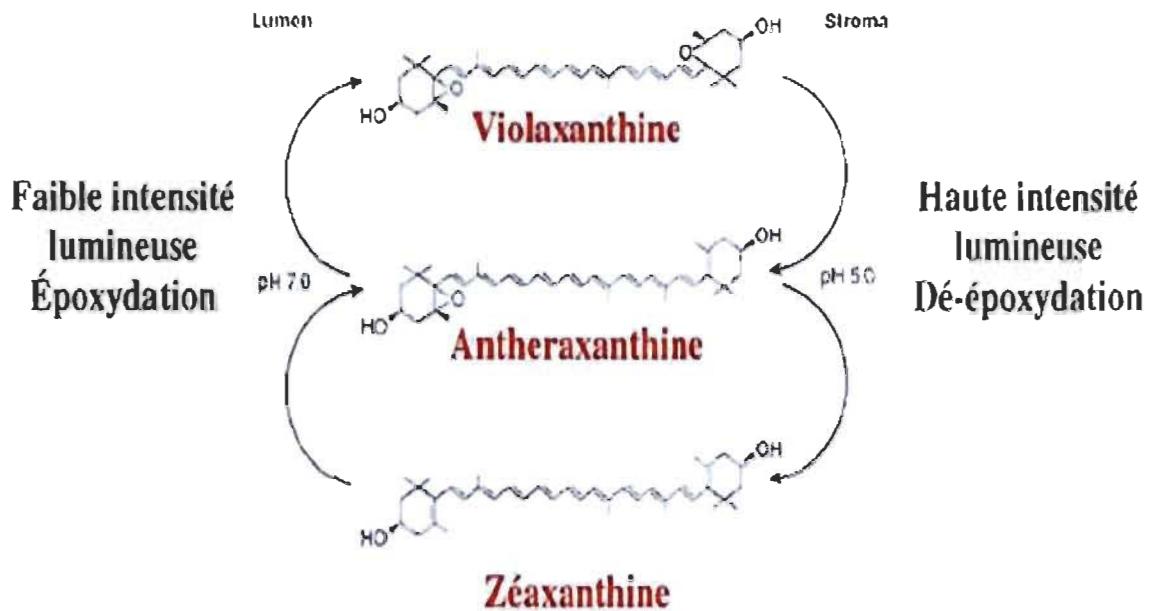


Figure 2.3 : Cycle des xanthophylles lors de la régulation de la dissipation d'énergie lumineuse. Les pH 7.0 et 5.0 sont les pH optimaux des enzymes zéaxanthine époxydase et violaxanthine dé-époxydase, respectivement (d'après Niyogi et al. 1997).

En dehors du cycle des xanthophylles, la zéaxanthine peut aussi se retrouver sous forme libre dans les membranes du thylacoïde, où elle agit comme antioxydant, protégeant les membranes contre la peroxydation des lipides (Moronsito et al. 2003). La zéaxanthine a aussi été suggérée comme jouant un rôle dans la synthèse de novo de la protéine D1 (Jahns et al. 2000).

2.2 Thermoluminescence

Thermoluminescence (TL) est une émission de faible lumière stimulée par le réchauffement des échantillons irradiés; elle résulte d'une recombinaison des paires préexistantes de charges qui avaient été stabilisées dans les trous de potentiel. Le réchauffement accroît l'énergie vibratoire qui permet aux recombinations des charges de se produire en surmontant les barrières d'énergie d'activation. Ce phénomène de

luminescence consiste en la réémission d'une énergie reçue par le biais d'une irradiation sous la forme d'un photon. Il s'explique par le passage des électrons d'un niveau d'état à un autre (état fondamental => état excité => état fondamental). C'est en retrouvant son état fondamental qu'il dégage un photon lumineux.

La TL peut être observée dans divers matériaux, y compris à l'état solide, minéral, acides aminés et des systèmes biologiques complexes, elle est largement utilisée dans la minéralogie, archéologie, rayonnement dosimétrie, la détection des aliments irradiés, avec différents instruments commerciaux qui sont en mesure de détecter l'émission de lumière bien au-dessus de la température ambiante (McKeever, 1988). Cependant, l'utilisation de la TL, pour analyser les systèmes photosynthétiques, nécessite des instruments très spécifiques, à savoir la possibilité de refroidir l'échantillon bien en deçà de 0 °C, tout en effectuant des sauts rapides/lents de la température combinée avec des modes d'éclairage complexes à partir de diverses sources de lumière (Gauthier et al. 2006; Gauthier et Carpentier, 2009).

La TL des systèmes photosynthétiques a d'abord été observée par Arnold et Sherwood (1957). Plusieurs approches sont disponibles (Sane et Rutherford, 1986; Déméter et Vass, 1984; Vass et Inoue, 1986; Vass et Govindjee, 1996) mettant l'accent sur certains aspects théoriques. L'apparition d'une émission lumineuse se produit à différentes températures (dépendamment de notre échantillon) montrant des bandes d'émission qui dépendent des conditions de préillumination. Plusieurs bandes de la TL photosynthétique ont été isolées et bien caractérisées. Il est maintenant confirmé que la plupart de ces bandes résultent de l'inversion de la séparation de charges induite par la lumière dans le PSII (Gauthier et al. 2010).

2.2.1 Émission des bandes de TL par la recombinaison activée thermiquement

La thermoluminescence consiste à mesurer une émission de lumière provoquée par un chauffage de l'échantillon. L'émission de lumière intervient à une température caractéristique qui dépend de l'état d'énergie de l'échantillon considéré (Vass, 2003).

Dans le photosystème II, la thermoluminescence provient de la recombinaison de charge entre la charge positive localisée sur le complexe de dégagement d'oxygène et l'électron stocké sur la quinone acceptrice Q_A ou Q_B .

Les mécanismes de recombinaison des charges ne sont pas bien élucidés, mais on considère généralement que ces mécanismes passent par une série d'équilibre à travers un nombre variable d'états intermédiaires de charges séparées (DeVault et al. 1983; deVault et Govindjee, 1990) pour produire finalement la paire de séparation des charges $P_{680}^+Pheo^-$ dans la configuration singulet ou triplet. Il existe en théorie une multitude de recombinaisons possibles entre les différents états de séparation de charges. Cependant, seules trois recombinaisons ont lieu à une vitesse significative. Elles sont schématisées dans la (figure 2.4). D'autre part, seule une de ces trois voies de recombinaisons donne lieu au TL, il s'agit de la voie indirecte dont la chlorophylle présente une configuration singulet activé P_{680}^+ qui contribue à la TL (Van Gorkom, 1985; Sonoike et al. 1991).

D'autre part, la voie radiative se traduit par l'émission d'un photon de la même longueur d'onde que la fluorescence émise par la *Chl*. Ce phénomène est appelé une luminescence retardée (Delay Luminescence, DL). Pour ce qui est de la troisième voie « voie directe », il ne donne pas lieu à la thermoluminescence. La température de recombinaison dépend en partie du potentiel redox des cofacteurs impliqués dans le processus de recombinaison.

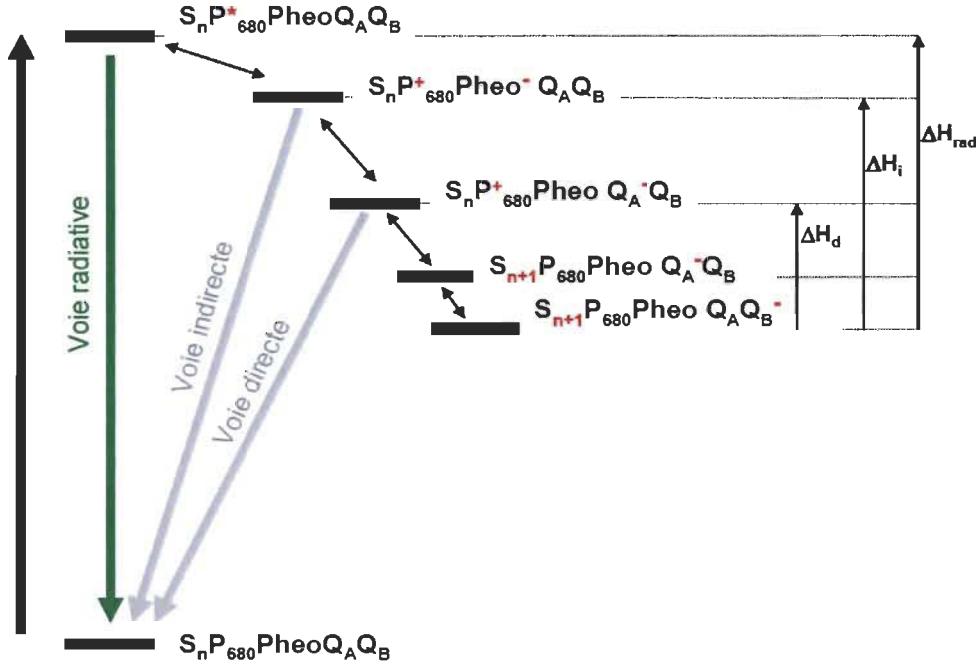


Figure 2.4 : Schéma représentant les voies de recombinaisons possibles entre les différents états de séparation de charges. Seule la voie indirecte donne lieu au TL.

2.2.2 Analyse des signaux de TL

L'intensité lumineuse émise par l'échantillon est mesurée par un photomultiplicateur dont la réponse de la photocathode s'étend entre deux valeurs de longueur d'onde. Les courbes de TL représentent donc l'intégrale du signal sur toutes les longueurs d'onde. Il peut être très utile de connaître la longueur d'onde d'émission qui dépend du centre de recombinaison. Parmi les approches de cinétique du processus photosynthétique de la TL, celle développée pour les applications pratiques dans lesquelles les équilibres multiples compliqués sont traités comme un seul équilibre du premier ordre. (Vass et al. 1981).

$$I_{TL} = cT \exp \left[\left(\frac{-E_a}{K_B T} \right) - \left(\left(\frac{s K_B T^3}{B E_a} \right) \times \exp \left(\frac{-E_a}{K_B T} \right) \right) \right] \quad (2.5)$$

D'où I_{TL} , T, k et B sont respectivement : l'intensité de TL, la température, la constante de Boltzmann et la rampe de chauffage. La recombinaison de charge est une réaction de transport des électrons, qui peut être décrite par la théorie de Marcus (Marcus et Sutin, 1985). Une version simplifiée peut aboutir au même résultat avec la formule d'Eyring :

$$K(T) = \frac{K_B}{h k T \exp\left(\frac{-\Delta G}{K_B T}\right)} \quad (2.6)$$

Où K_B est la constante de Boltzmann, h est la constante de Planck, k est le facteur de transmission, T est la température et ΔG est l'énergie libre d'activation qui représente la hauteur de la barrière d'activation. Sachant que :

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2.7)$$

Ou ΔH , T et ΔS sont l'enthalpie, la température et l'entropie respectivement. En remplaçant ΔH avec l'énergie d'activation E_a , on obtient :

$$K(T) = s T \exp\left(\frac{-E_a}{K_B T}\right) \quad (2.8)$$

Dont s est le facteur préexponentiel équivalant à :

$$s = \frac{K_B}{h k \exp\left(\frac{\Delta S}{K_B}\right)} \quad (2.9)$$

Afin de s'assurer de la validité de nos résultats et faire une comparaison entre les résultats expérimentaux et ceux théoriques, une simulation peut être faite en ajustant les différents paramètres à savoir : c (constante de proportionnalité), E_a (énergie d'activation) et s (facteur préexponentiel). De ce fait, la simulation des courbes de luminescence est d'une exactitude suffisante pour nous permettre la validation de nos

résultats et résoudre le problème des bandes de recouvrement. Ces simulations des courbes de luminescence nous fournissent les paramètres nécessaires pour calculer les différents paramètres dont on a besoin, à savoir : temps de demi-vie, $E_a\dots$, etc. Parmi les paramètres les plus utiles, on trouve la température maximale. Cette dernière nous permet de confirmer la nature de la bande ainsi que les transformations qu'il peut y avoir.

2.2.3 Attributions des bandes de TL

En pratique, les mesures de thermoluminescence se font en chauffant linéairement notre échantillon. Au fur et à mesure que la température s'élève apparaissent les différentes composantes de rayonnement émis. C'est la « courbe de thermoluminescence » donnant l'intensité de la TL en fonction de la température. Cette courbe peut présenter un ou plusieurs maxima appelés "pics". Chacun d'entre eux correspond au vidage d'un type de piège et est situé d'autant plus haut en température que l'énergie est plus élevée.

Afin de pouvoir attribuer les pics de TL des échantillons observés sur les thermogrammes, il est essentiel de bien comprendre les températures maximales qui caractérisent chaque bande. Pour plusieurs de ces composantes, les paires de charges responsables de chaque bande ont été identifiées. Si on applique la théorie des bandes d'énergie au cas d'un chloroplaste intact quand l'échantillon est chauffé entre 2 à 70 °C, on observe quatre bandes (les plus connues) : la bande Q, la bande B, la bande AG et la bande C.

Les charges retenues dans les pièges vont être libérées, ce qui se traduit par un retour des électrons dans le sens inverse. Ils circulent à nouveau, jusqu'à rencontrer un centre de recombinaison. Bien sûr, plus un piège est profond, correspondant au niveau d'énergie la moins proche, plus il faudra d'énergie pour libérer ces électrons. Les électrons ne retournent donc pas en même temps lors du chauffage. En fait, l'élévation progressive de la température entraîne le vidage successif des électrons les moins proches vers les plus loin.

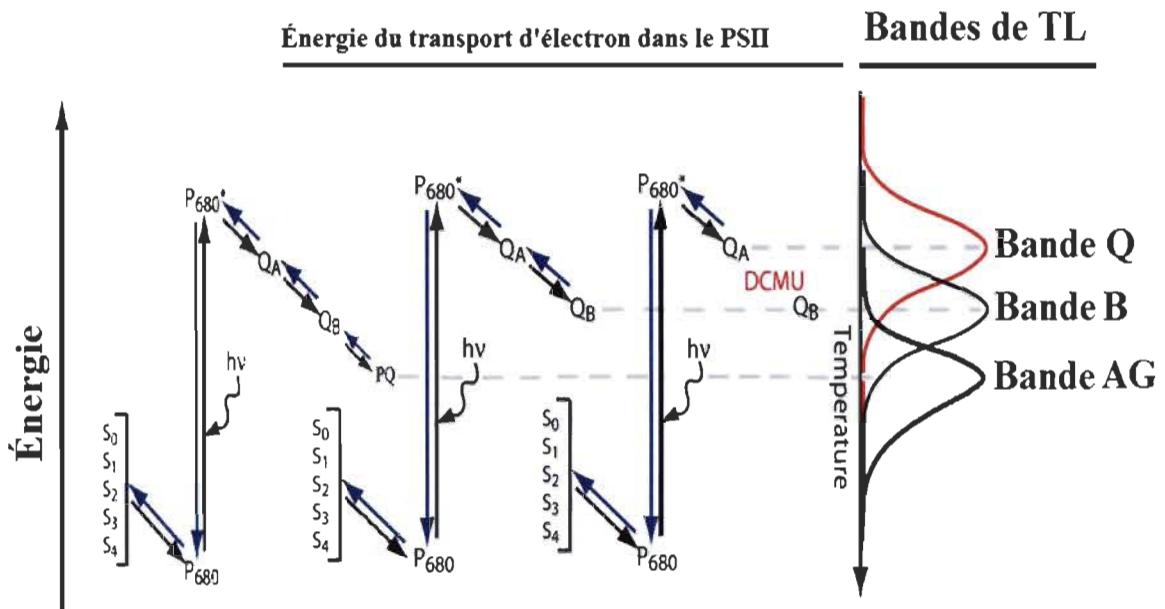


Figure 2.5 : Représentation schématique des principales bandes de thermoluminescence dans le PSII à une température entre 0 °C et 72 °C dans des chloroplastes intacts.

2.2.3.1 La bande Q (à pH physiologique)

La bande Q de thermoluminescence n'est détectable qu'après ajout de DCMU, inhibiteur d'électron entre Q_A et Q_B dans le PSII, à une température optimale entre 0 et 10 °C pour les feuilles (Rubin et Venedikov, 1969) et entre 10 et 20 °C pour les matériaux isolés à savoir des chloroplastes intacts et thylakoïdes (Sane, 2004; Vassiliev et al. 2001). L'inhibition d'électron entre ces deux sites du PSII permet la suppression de la bande B pour les thylakoïdes ainsi que les bandes (B et AG) pour les feuilles et les chloroplastes intacts. La bande Q provient de la recombinaison des charges de S₂Q_A⁻ (Demeter et Vass, 1984; Rutherford et al. 1982). Le blocage du transport d'électron avec le DCMU permet une stabilisation de la charge négative dans le site Q_A, qui reste réduit, ce qui se traduit par une augmentation de luminescence sous forme de bande de thermoluminescence.

2.2.3.2 La bande B (à pH physiologique)

La bande B de thermoluminescence apparaît à une température optimale entre 30-40°C. Elle est caractéristique des thylakoïdes comme on peut l'avoir dans les feuilles et dans les chloroplastes intacts, Inoue et Shibata, (1977) ont confirmé la corrélation de cette bande avec le complexe de dégagement d'oxygène, particulièrement en présence de cluster de Mn fonctionnellement actif. La bande B est principalement due à la recombinaison de charge des centres $S_2Q_B^-$ et de $S_3Q_B^-$ (Rutherford et al. 1982). Elle représente une période d'oscillation de quatre dans les thylakoïdes et les chloroplastes intacts, après une excitation avec une série de flashes saturants (Inoue et Shibata, 1976; 1977; Demeter et Vass, 1984; le présent travail). Sachant que le nombre de flashes a un effet sur l'intensité lumineuse ainsi que les états S de recombinaison, le traitement des données d'oscillation confirme que les états S_2 et S_3 sont impliqués dans la production de cette bande de TL (Rutherford et al. 1982; Demeter et Vass, 1984).

D'autre part, dépendamment du pH la bande B ne peut pas être décomposée en deux bandes à un pH supérieur ou égal au pH physiologique, les recombinaisons des centres réactionnels $S_2Q_B^-$ et de $S_3Q_B^-$ provoquent la même bande de TL en ce qui concerne la température maximale ainsi que la forme de la bande. Par contre, à un pH inférieur à 7, elles montrent deux bandes distinctes nettes nommées les bandes B_1 et B_2 , avec un décalage de quelques degrés de la température maximale (Inoue, 1996). Le spectre d'émission de la bande B a un maximum à environ 690 nm (Sonoike et al. 1991).

2.2.3.3 La bande AfterGlow (AG) (à pH physiologique)

Bertsch et Azzi (1965) ont décrit pour la première fois une luminescence retardée (Afterglow, AG) superposée à une décroissance de luminescence allant vers une lumière rouge lointaine (> 700 nm). D'autre part, Björn (1971) a montré que cette bande était liée au flux cyclique d'électrons et a confirmé l'effet de l'augmentation de la température sur la bande AG. Elle était initialement observée dans les algues, puis a été confirmée chez les plantes supérieures (Nakamoto et al. 1988). Dans ce travail, on a été les

premiers à confirmer cette bande dans un matériel in vitro (chloroplastes intacts). La bande AG reflète un retour de flux d'électrons provenant du stroma vers le pool de plastoquinone puis vers le site Q_B du PSII, permettant la recombinaison des charges des centres S₂Q_B et S₃Q_B (Sundblad et al. 1988). Il convient de souligner que même si la bande AG est généralement induite par la lumière rouge lointaine qui excite préférentiellement le PSI. Elle est originaire du PSII (Hideg et al. 1991). La faible absorption de la lumière rouge lointaine par le PSII (10-15 %) est suffisante pour activer la recombinaison des états S2 et S3. La bande AG est caractérisée avec une température maximale entre 40 et 50 °C (Ducruet et al. 2005b).

D'autre part, la spectroscopique photo acoustique a confirmé un déclenchement d'écoulement cyclique d'électrons dans le PSI dans cette gamme de température, en conduisant les électrons du stroma vers le côté accepteur du PSII (Havaux, 1996). L'ajout d'un inhibiteur comme le DCMU supprime la bande AG, résultant en deux bande Q et C, à 17 °C et 52 °C respectivement. Une propriété de base d'émission d'AG est sa suppression par 5µM d'antimycine A, comme déjà indiqué par Björn (1971) et confirmé par ce travail dans des chloroplastes intacts. Dans certaines conditions particulières, une émission de la bande AG apparaît après une lumière blanche. Cela se produit lorsque l'utilisation d'énergie photosynthétique (ATP + NADPH) est ralentie par un manque de CO₂ ou de phosphore (Palmqvist et al. 1986). Elle a été aussi observée dans les jeunes feuilles de pois (Miranda et Ducruet, 1995).

2.2.3.4 Autres bandes de thermoluminescence

Il existe d'autres bandes de thermoluminescence allant d'une température -160 °C jusqu'à des hautes températures, à titre informatif, on a présenté quelques une dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1

L'origine des bandes de TL et leurs pics de température maximale

Bandes de TL	Pics de température (°C)	Origine/Paire de charge	Références
Bandes Z	-160	Chl ⁻ Chl ⁺	(Sonoike et al. 1991)
Bandes Zv	-80 à -30	P680 ⁺ Chl ⁺ Q _A ⁻	(Vass et al. 1989; Chapman et al. 1991)
Bandes A	-15	S ₃ Q _A ⁻	(Demeter et al. 1985; Koike et al. 1986)
Bandes A _T	-15	His ⁺ Q _A ⁻	(Ono and Inoue, 1991; Kramer et al. 1994),
Bandes C	50 - 55	TyrD ⁺ Q _A ⁻	(Demeter et al. 1993; Johnson et al. 1994)
Bandes Mo	70	Chl ⁺ lipide peroxyde ⁻	(Inoue, 1996)

CHAPITRE III

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

Le présent chapitre contient toute la documentation nécessaire sur les expériences réalisées. Nous débutons par une description du matériel utilisé, ensuite l'étude en détail des préparations faites ainsi que la détermination de la concentration en chlorophylle dans nos échantillons en plus du degré d'intégrité pour les chloroplastes intacts, de même que différents appareillages et logiciels utilisés. Les différents produits chimiques employés lors d'isolation ou de traitement des membranes photosynthétiques seront aussi décrits.

3.1 Matériel utilisé

Les feuilles d'épinards ont été achetées commercialement dans un marché local métro (Trois-Rivières, Québec, Canada) et utilisées immédiatement pour l'isolation des fractions membranaires photosynthétiques. Toutes les manipulations ont été effectuées sur la glace et en présence de lumière verte.

3.2 Préparation des chloroplastes

Les échantillons de chloroplastes intacts ont été préparés à partir des feuilles d'épinards, suivant la méthode de Joly et Carpentier (2011). 40 g de ces derniers furent lavés et coupés avec l'eau distillée. Elles ont été broyées pendant 10-15 secondes (la durée de broyage ne doit pas être longue afin d'éviter le bris total des chloroplastes) dans une solution de 150 mL contenant : (Tampon A) 0.50 M Hepes NaOH (pH 7.6), 0.33 M sorbitol, 2 mM EDTA, 1 mM MgCl₂ à l'aide d'un mixeur de cuisine. L'intégrité des chloroplastes dépend beaucoup du temps de broyage, car plus le temps est long plus les débris présents dans la solution peuvent briser les chloroplastes et ainsi donner un mauvais rendement d'intégrité. Après le broyage nous filtrons le mélange à l'aide d'un

« miracloth ». Le filtrat est rapidement centrifugé à 850 g pendant 1 minute. Le culot récupéré contenant des chloroplastes intacts est mis en suspension dans une solution contenant : (Tampon B) 50 mM Hepes NaOH (pH 7.6), 0.33 M sorbitol, 2 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 10 mM KCl and 2 mM NaCl. Une seconde centrifugation à 850 g pendant 1 minute permet le lavage de notre matériel et d'obtenir ainsi des chloroplastes intacts. Ces derniers sont mis en suspension dans un volume de 1 mL du tampon B pour utilisation. Le ratio Fv/Fm était toujours de 0.80 ± 0.01.

3.3 Détermination de la concentration en chlorophylle (*a* et *b*) des échantillons

La concentration en chlorophylle (*a* et *b*) de nos échantillons de chloroplastes intacts ou de thylakoïdes a été déterminée selon la méthode d'écrite par Porra et al. (1989).

Méthodologie :

- 1- Prendre 10µL de l'échantillon
- 2- Ajouter l'échantillon à 5mL d'acétone 80 % (V/V)
- 3- Homogénéiser le mélange avec un agitateur (vortex) pendant 2 minutes
- 4- Mesurer l'absorbance du filtrat à 663 nm (A₆₆₃) et à 647 nm (A₆₄₇) avec spectrophotomètre Perkins Elmer Lambda 40 (Perkin Elmer, Wellesley, Massachusetts, USA)
- 5- Calcul de la concentration en chlorophylle (*a* et *b*) à l'aide de l'équation suivante :

$$[\text{Chl}] \text{ en mg mL}^{-1} = 0.5x [(7.34 A_{663}) + (17.76 A_{647})] \quad (3.1)$$

Le résultat obtenu représente la concentration totale en chlorophylle *a* et *b* dans notre échantillon en mg mL⁻¹.

3.4 Dosage et calcul d'intégrité des chloroplastes

L'intégrité des chloroplastes a été calculée par la mesure d'évolution d'oxygène, en utilisant Oxylab système (Hansatech Instruments, Norfolk, Angleterre), dans les

échantillons de chloroplastes intacts à température de la pièce sous une lumière blanche saturante pendant 1 min avec et sans choc osmotique, comme décrit par Joly et Carpentier (2011). La concentration de chlorophylle (*a et b*) totale dans ces préparations de chloroplastes a été de $12,5 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$. Le pourcentage de chloroplastes intacts est calculé avec l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage d'intégrité (\%)} = [(\text{O}_2 \text{ FeCN + osm} - \text{O}_2 \text{ FeCN}) / \text{O}_2 \text{ FeCN+osm}] \times 100 \quad (3.2)$$

Où $\text{O}_2 \text{ FeCN + osm}$ et $\text{O}_2 \text{ FeCN}$ sont les taux d'évolution d'oxygène en présence de ferricyanure avec et sans choc osmotique respectivement, comme décrit par Carpentier (2011). Les préparations de nos échantillons ont eu un pourcentage d'intégrité moyen de $80 \pm 2 \text{ \%}$.

3.5 Dégagement d'oxygène standard

Le taux de dégagement d'oxygène (TDO) dans des chloroplastes intacts a été mesuré à la température de la pièce en utilisant l'électrode d' O_2 de Clark (Hansatech instruments). Le principe de cette technique réside dans l'application d'une différence de potentiel de 0.7V entre l'anode (en argent) et la cathode (en platine). Cela permet à l' O_2 présent dans la solution d'être ionisé en hydroxyle au contact de la cathode suivant la réaction ci-après :



Cette réaction génère un très faible courant, proportionnel à la concentration en O_2 contenue dans l'échantillon de chloroplastes intacts. Par la suite, ce courant est amplifié et mesuré. Un thermorégulateur est connecté à la chambre d'électrode afin de limiter la variabilité de la température, qui peut fausser les mesures (figure 3.1). Les échantillons ont été éclairés avec une lumière blanche continue.

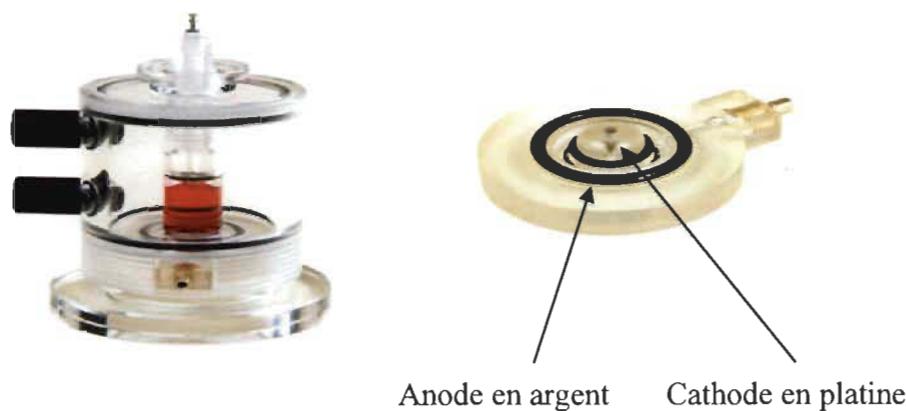


Figure 3.1 : Électrode d'oxygène de Clark.

3.6 Mesure d'induction de fluorescence

Les mesures d'induction de fluorescence dans les échantillons de chloroplastes intacts ou de thylakoïdes ont été effectuées à la température de la pièce en utilisant le Plant Efficiency Analyser (Hansatech, King' Lynn, Norfolk, UK). Les échantillons ont été dilués à une concentration finale de 25 µg Chl/mL dans un tampon contenant 50 mM Hepes-NaOH (pH 7.6), 0.33 mM sorbitol, 2 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 10 mM KCl, 10 mM NaCl. Le milieu d'analyse est une cellule cylindrique d'un volume total de 1 mL où on introduit un agitateur magnétique afin d'assurer une bonne homogénéisation avant chaque prise de mesure. Les échantillons ont été adaptés à la noirceur pendant 1 minute à température pièce et ont été excités avec une lumière actinique rouge ($\lambda = 655$ nm et intensité de 3000 µmol photons m⁻²s⁻¹) fournie par six diodes émettrices de lumière (DEL). La fluorescence a été détectée par une photodiode de type PIN après un passage dans un filtre de 50 % de transmission de lumière rouge lointain à 720 nm. Comme le signal de fluorescence obtenu dans les 40 premières µs est attribué à des artefacts dus au temps de réponse de l'instrument, ces données n'ont pas été incluses dans l'analyse des courbes d'induction de fluorescence. Donc, le signal à 40 µs est pris comme F₀, la fluorescence initiale. La fluorescence variable F_v, différence entre la fluorescence minimale F₀ et la fluorescence maximale F_m dans les échantillons, a été utilisée pour calculer les ratios F_v/F_m.

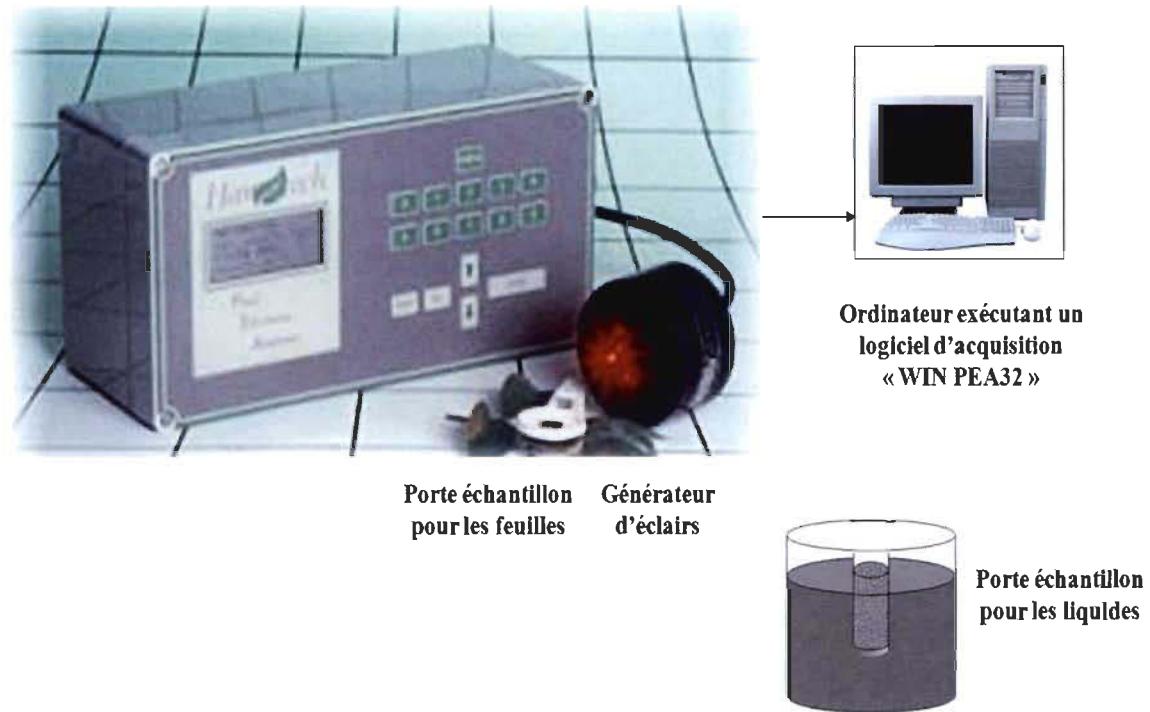


Figure 3.2 : Dispositif expérimental pour les mesures d’induction de fluorescence PEA (Plant Efficiency analyser), source lumineuse en mode on, porte échantillon pour les feuilles et pour les liquides et un ordinateur exécutant un logiciel d’acquisition.

3.7 Analyses des données d’induction de fluorescence

L’analyse quantitative des courbes d’induction de fluorescence a été effectuée à l’aide d’une somme de trois cinétiques par un logiciel Sigma Plot (SSI, Richmond, Californie, USA) permettant de faire des régressions non linéaires, à l’aide de l’équation suivante comme décrit par Joly et al. (2009) :

$$F(t) = F_0 + A_{O-J} \left(1 - e^{-K_{O-J}t}\right)^{S_{O-J}} + A_{J-I} \left(1 - e^{-K_{J-I}t}\right)^{S_{J-I}} + A_{I-P} \left(1 - e^{-K_{I-P}t}\right)^{S_{I-P}} \quad (3.3)$$

Où $F(t)$ est la fluorescence à un temps t , F_0 est la fluorescence initiale, A_{O-J} , A_{J-I} , A_{I-P} sont les amplitudes des phases O-J, J-I et I-P respectivement, S_{O-J} , S_{J-I} et S_{I-P} sont les facteurs sigmoïdaux pour chaque phase, K_{O-J} , K_{J-I} et K_{I-P} sont les constantes de vitesse de ces mêmes phases.

3.8 Mesure de thermoluminescence

Les mesures de thermoluminescence des échantillons de chloroplastes intacts ainsi que de thylakoides ont été effectuées avec un équipement construit en notre laboratoire et décrit par (Ducruet, 2003; Gauthier et al. 2006). L'échantillon d'analyse a été mis dans un porte-échantillon de 15 mm de diamètre relié directement avec une plaque thermoélectrique à effet Peltier (Duratec, Marlow industries Inc., Dallas, TX, USA) qui permet la régulation de la température durant l'expérience. Le milieu d'analyse a été d'un volume total de 300 μL , dans un tampon contenant 50mM Hepes NaOH (pH 7.6), 0.33 M sorbitol, 2 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 10 mM KCl and 2 mM NaCl), avec une concentration finale en chlorophylle de 200 $\mu\text{g Chl/mL}$ de chloroplastes intacts ainsi que pour les thylakoides. Le porte-échantillon a été couvert par un disque de verre (Hellma 202-OS) et a été fermé par un couvercle qui laisse passer le guide à fibre optique relié à un photomultiplicateur (PMT) analogue sensible à la lumière (Hamamatsu H7711-50, Ichino, Japon). Pour éviter un endommagement du PMT par le chauffage de l'échantillon durant l'expérience, on a utilisé les bras d'un guide ayant cinq fibres optiques fournies par Walz (Effeltrich, Germany) dont on ne laisse ouvert que celui utilisé pour transmettre la luminescence récupérée auprès des échantillons.

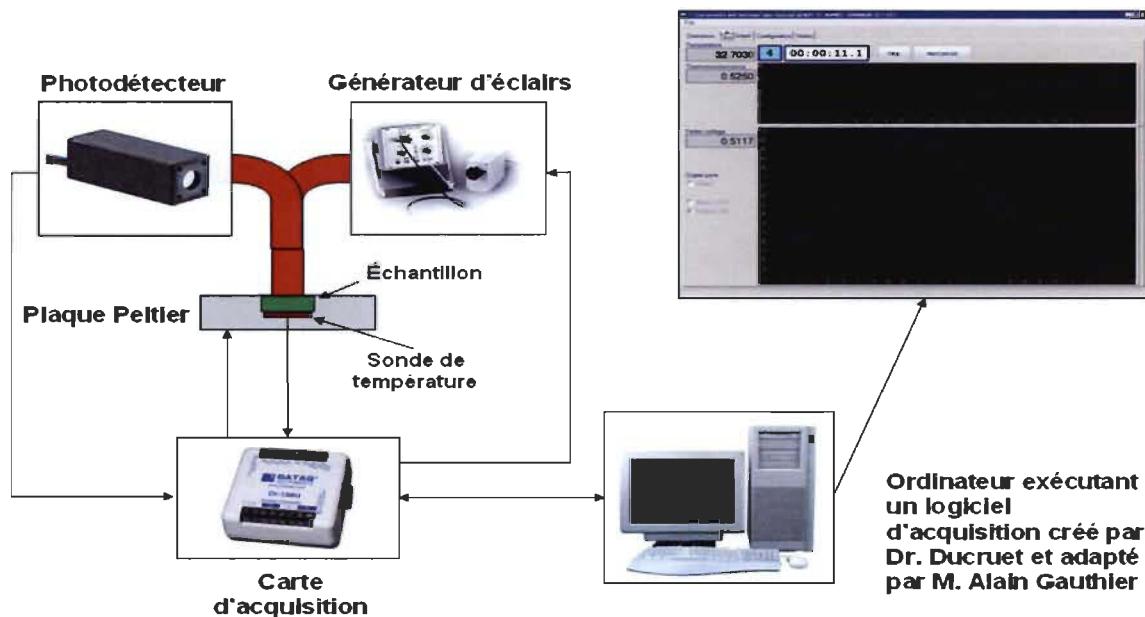


Figure 3.3 : Dispositif expérimental pour les mesures de thermoluminescence.

Avant la prise de mesure, les échantillons sont adaptés à la noirceur pendant une durée de 2 minutes à 20 °C. La température a ensuite été amenée à 2°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 au CDO qui provoquent habituellement des artefacts de mesure selon Ducruet (2003). De courts éclairs blancs sursaturants, obtenus à l'aide de XE-ST Pump Flash (Walz, Effeltich, Germany), d'une durée de 1µs et espacés d'une seconde, ont été appliqués pour initier la séparation de charge dans le PSII. Le chauffage linéaire subséquent (2 à 72 °C) des échantillons dans le noir total a activé la recombinaison des paires de charges du PSII, lesquelles sont détectables par l'apparence de bandes d'émissions de TL à des températures optimales caractéristiques (Ducruet, 2003).

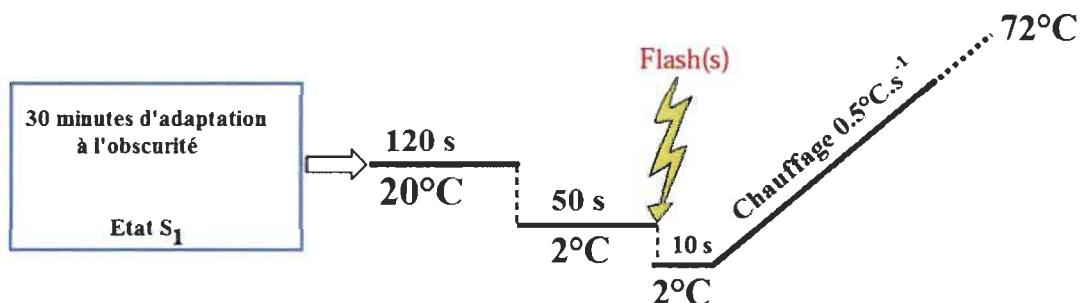


Figure 3.4 : Protocole de mesure des émissions de thermoluminescence. Après 30 minutes d'adaptation à l'obscurité, les échantillons sont illuminés par des flashes saturants à 2 °C, puis sont chauffés à un taux de 0,5 °C/s. Les états S₂ et S₃ sont considérés comme stables avant l'étape de chauffage.

3.9 Acquisition et analyses des données de thermoluminescence

Le signal de TL provoqué par un ou des éclairs a été acquis par une carte d'acquisition DAQPad-1200 (National Instruments, USA) qui permet de communiquer les commandes du logiciel vers l'équipement à travers un convertisseur analogique – numérique connecté à un ordinateur. Les données acquises sous forme ASCII ont été analysées avec un logiciel ThermoLite, un programme développé dans notre laboratoire sous une version pour le DOS par Dr Jean Marc Ducruet (Ducruet et Miranda, 1992) et adapté par Alain Gauthier. Le traitement des résultats a été fait par le logiciel Sigma plot.

3.10 Mesure des changements d'absorption à 830 nm

La photooxydation et la réduction de la chlorophylle spéciale du PSI (P700) ont été mesurées par le changement d'absorption à 820 nm (ΔA_{820}) à l'aide d'un fluorimètre PAM-101 (Pulse Amplitude Modulated Chl Fluorimètre de Walz, Effeltrich, Allemagne) équipé d'une unité ED-P700DW. Cette unité est un appareil à double détecteur de longueur d'onde émetteur et détecte strictement les changements d'absorbance différentiels entre 810 nm et 860 nm, avec un maximum à 820 nm pour le cation radical $P700^+$, mais ne détecte pas l'absorbance de la plastocyanine (Klughammer and Schreiber 1998). Une lumière rouge lointaine de ($75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) pour nos mesures a été obtenue en faisant passer le faisceau d'une source lumineuse Filtre-Lite (Microview, Thornhill, ON, Canada) à travers un filtre RG-9 (Schott, Mainz, Germany). Le tampon utilisé contient 50 mM Hepes-NaOH (pH 7.6), 0.33 mM sorbitol, 2 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 10 mM KCl, 10 mM NaCl, avec une concentration de 500 µg Chl ml⁻¹. Toutes les mesures ont été prises à la température de la pièce.

3.11 Mesure des spectres de fluorescence

Les spectres d'émission de fluorescence à température ambiante (25 °C) ont été mesurés avec un spectrofluorimètre Perkin-Elmer LS55 équipé d'un photomultiplicateur R928 sensible à la portion rouge du spectre. La fluorescence chlorophyllienne a été excitée à 436 nm comme décrit par Rajagopal et al. (2003). La lumière incidente passe en premier lieu dans un monochromateur qui sélectionne la longueur d'onde, elle traverse ensuite un polariseur rotatif (ou analyseur) qui oriente le champ électrique de la lumière. Enfin, elle pénètre les fentes d'excitation et d'émission du fluorimètre qui étaient réglées à 5 et 2.5 nm respectivement, puis traverse l'échantillon qui a une concentration finale constante en chlorophylle de 5 µg / mL. Alors, la fluorescence est émise dans toutes les directions. La détection du signal à la sortie se fait par décompte des photons. L'analyse et le traitement des spectres de fluorescence ont été faits par le logiciel SigmaPlot.

CHAPITRE IV

AFTERGLOW THERMOLUMINESCENCE MEASURED IN ISOLATED CHLOROPLASTS

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en 2011 dans le journal Photochemistry and Photobiology: Belatik, A., Essemine, J., Hutchandani, S et Carpentier, R., Afterglow thermoluminescence measured in isolated chloroplasts.

RESUME

La bande afterglow (AG) de thermoluminescence, mesurée dans les feuilles des plantes provient de la recombinaison de paire des charges $S_2/S_3Q_B^-$ dans le photosystème II (PSII) initié par le flux d'électrons inverse de réducteurs du stroma vers le plastoquinone (PQ), ensuite vers le site Q_B dans les centres du PSII qui sont dans les états $S_2/S_3Q_B^-$. Dans ce travail nous montrons que cette luminescence, absente dans les membranes isolées des thylacoïdes, peut être mesurée chez les chloroplastes intacts qui conservent leur contenu du stroma, y compris le pool d'accepteur d'électrons (ferrédoxine / $NADP^+$) du photosystème I. Les propriétés de la bande AG extraites des chloroplastes intacts sont similaires à ceux dans les feuilles en termes de température maximale, la période de modulation quatre, la stimulation par la lumière rouge lointaine et l'inhibition par l'antimycine A.

Afterglow thermoluminescence measured in isolated chloroplasts**Ahmed Belatik, Jemaa Essemine, Surat Hotchandani and Robert Carpentier***

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

*Correspondence to : Dr Robert Carpentier, Groupe de Recherche en Biologie Végétale (GRBV), Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7, Email : robert.carpentier@uqtr.ca

Keywords: thermoluminescence, afterglow, chloroplasts, photosystem II

ABSTRACT

The thermoluminescence afterglow (AG) measured in plant leaves originates from the $S_2/S_3Q_B^-$ charge pair recombination in photosystem II (PSII) initiated by reverse electron flow from stromal reductants to PQ and then to the Q_B site in PSII centers that are in the $S_2/S_3Q_B^-$ state. In this work we show that this luminescence, absent in isolated thylakoid membranes, can be measured in intact chloroplasts that retain their stromal content including the electron acceptor pool (oxidized ferredoxin/NADP $^+$) of photosystem I. The properties of the chloroplasts AG emission is similar to the AG in leaves in terms of temperature maximum, period-four modulation, far-red light stimulation, and antimycin A inhibition.

INTRODUCTION

In oxygenic photosynthetic organisms, chloroplasts photosystem II (PSII) catalyses the light-driven electron transport from water to plastoquinone (1). The electron transfer components of PSII are embedded within the two reaction center polypeptides named D1 and D2 as depicted by the most recent crystal structure resolved at 1.9 Å (2). Light energy absorbed by pigment-protein complexes is quickly transferred to the photochemical reaction centers (RC). Within the PSII RC, the rapid release of an electron from the reaction center P680 to a pheophytin (Pheo) molecule produces the charge separated state, P680+Pheo- (3). Two quinones, QA and QB, are located at the acceptor side of PSII with a H-bounded non-heme iron is between (4). Charge stabilization takes place through electron transfer from Pheo⁻ to the primary quinone acceptor, QA, in less than 200 ps (5) and reduction of the cationic radical P680⁺ by Y_Z (Tyrosine 161 of D1 subunit), in 10-500 ns (6). As a result, PSII centers in the Y_ZP680⁺Pheo⁻QA state are stabilized as Y_Z⁺P680PheoQA⁻ states in sub μs time scale. The secondary quinone acceptor of PSII, QB, receives the electrons from QA⁻ in a two-step process. Following protonation of the doubly reduced QB, plastoquinol (PQH₂) is released from the QB pocket and is replaced by an oxidized PQ molecule from a pool to sustain the photochemical competence of PSII (7, 8).

On the donor side, the Mn cluster of the oxygen evolving complex (OEC) reduces Y_Z in 30-1300 μs (9). Though the structure of the OEC is known with the relative position of each Mn atoms and Ca cofactors (10), its exact functioning and bioenergetics are still a matter of debate (11, 12). The basic function of the OEC implies the successive generation of oxidation potential, following the absorption of four quanta of excitation light, as the driving force for the Mn cluster to cycle through the S-states, S₀ → S₁ → S₂ → S₃ → (S₄) → S₀, with half-times of about 30, 110, 350, and 1300 μs, respectively, for every forward transition (13). Concurrent with the release of dioxygen from water, the S₄-state decays to the S₀-state after the 4th flash.

Besides forwards electron transfer, charge recombination between positive charges located at the donor side of PSII and negative charges at the acceptor side also occur.

Charge recombination in PSII can be analyzed by thermoluminescence (TL) in pre-illuminated photosynthetic materials such as intact leaves, isolated thylakoid membranes, or PSII submembranes fractions (14, 15). Charge recombination of P680+QA⁻ is known to occur probably via the intermediate state P680+Pheo⁻ (4). However, this type of recombination cannot be studied by themoluminescence. The main charged pairs giving rise to luminescent recombination are S₂QA⁻ or S₂/S₃QB⁻. The resulting Q and B bands, respectively, have been extensively studied over a broad range of temperatures (14-16). Recombination of S₂QA⁻ is measurable when the forward electron transfer is curtailed beyond QA⁻ (14, 15). The yield of TL originating from S₂QA⁻ recombination is usually maximal at ~ 5-20°C, compared to the peaking temperatures of 20-35°C for back-reactions involving S₂/S₃QB⁻ charge pairs (14, 16). Notably, the B-band emission follows a period-four oscillation pattern. The flash-dependent yield of B-band emission is frequently employed as a powerful method to examine the redox states of the intermediate carriers at the donor and acceptor sides of PSII.

Another thermoluminescence band occurring with a maximum at ~ 40-45°C, the so-called afterglow (AG) band, was mainly observed in leaves (17). This emission was first observed as delayed luminescence appearing about 1-4 min after the end of far-red illumination in intact systems such as intact chloroplasts, protoplasts, algae and leaves (18, 21). It was shown that this delayed luminescence peak corresponds to the AG band of thermoluminescence (17) and is attributed to a S₂/S₃QB⁻ charge pair recombination initiated by a reverse electron flow from stromal reductants to PQ and then to the QB site in PSII centers originally in S₂/S₃QB state (22, 23). The AG band is therefore suppressed in the presence of DCMU that blocks the QB site (22). The amplitude of the thermoluminescence AG also follows a period-four oscillation pattern and is amplified by a pre-exposure to far-red light (23, 24).

The sensitivity of the AG band to far-red light is associated with the reduction of stromal acceptors by photosystem I (PSI) and is therefore initiated by a process coincident with the PSI cyclic electron flow (25, 26). Hence, this luminescence is absent in isolated

thylakoid membranes where the stromal components are lost during the isolation procedure. Though the AG was observed in several systems as delayed luminescence, the thermoluminescence AG band was only observed in leaves and recently in the green algae *Chlamydomonas reinhardtii* (27). In this study, we demonstrate that the AG band can also be observed in isolated intact chloroplasts that retain the stromal components. Chorophyll fluorescence induction and the oxidation/reduction kinetics of P700 were used to highlight the involvement of cyclic electron transport and stromal components. The observed emission exhibited similar properties as in intact leaves and was inhibited by antimycin. The interest of using intact chloroplasts to study the properties of the AG band and cyclic electron transport around PSI to prevent interference with the leaf structure and infiltration problemss with specific chemicals is discussed.

MATERIAL AND METHODS

Chloroplasts isolation

Chloroplasts were isolated from fresh market spinach (*Spinacia oleracea L.*) leaves as described elsewhere (28), and were kept in the dark in 50mM Hepes NaOH (pH 7.6), 0.33M sorbitol, 2mM EDTA, 1mM MgCl₂, 1mM NaCl, and 10mM KCl. Intact chloroplasts were diluted to 25 µg ml⁻¹. All materials used for chloroplast isolation were maintained at 4°C. Chlorophyll concentration was calculated following the procedure outlined by Porra et al. (29).

Chloroplasts intactness assay and calculation

The intactness of chloroplasts was calculated by the measurement of oxygen evolution in chloroplast preparations at 24°C under saturating white light for 1 min with and without osmotic shock using Oxylab system (Hansatech Instruments, Norfolk, England) as described previously (28). The concentration of total chlorophyll in these chloroplast preparations was 12.5 µg ml⁻¹.

The intactness of chloroplast was calculated with the following equation:

$$\text{percentage of intact chloroplasts} = [(O_2 \text{ FeCN + osm} - O_2 \text{ FeCN}) / O_2 \text{ FeCN+osm}] \times 100 \quad (1)$$

where $O_2 \text{ FeCN + osm}$ and $O_2 \text{ FeCN}$ are, respectively, the ferricyanide-supported oxygen evolution rates measured with or without osmotic shock (28). The typical chloroplast preparations yield $80 \pm 2\%$ intact chloroplasts.

Thylakoid membranes isolation

Thylakoid membranes were prepared from fresh market spinach (*Spinacia oleracea L.*) leaves as described elsewhere (30), and were stored in the dark in 50mM Hepes NaOH (pH 7.6), 0.33M sorbitol, 2mM EDTA, 1mM MgCl₂, 1mM NaCl, and 10mM KCl. Thylakoid membranes were diluted to 25 µg ml⁻¹.

Chlorophyll fluorescence induction

Chlorophyll a fluorescence induction (FI) measurements were performed at room temperature using the Plant Efficiency Analyser (Hanasatech, King' Lynn, Norfolk, UK). For chloroplast and thylakoid membranes, the assay medium consisted of 50 mM Hepes-NaOH (pH 7.6), 0.33mM sorbitol, 2mM EDTA, 1mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, 10 mM KCl, and 10 mM NaCl with a final chlorophyll concentration of 25 µg ml⁻¹. The red excitation light peaking at 655 nm with an intensity of 1800 µmol m⁻² s⁻¹ was obtained from six light emitting diodes. As the fluorescence signal during the first 40 µs is ascribed to artifacts due to a delay in response time of the instrument, these data were not included in the analyses of FI traces.

For a quantitative analysis, FI traces corresponding to O-J, J-I and I-P rises were fitted with the sum of three Chapman-Richards functions, shown in eq. 2, by non linear regression using Sigma Plot (SSI, Richmond, California, USA) as described previously (31):

$$F(t) = F_0 + A_{O-J} \left(1 - e^{-k_{O-J}t}\right)^{s_{O-J}} + A_{J-I} \left(1 - e^{-k_{J-I}t}\right)^{s_{J-I}} + A_{I-P} \left(1 - e^{-k_{I-P}t}\right)^{s_{I-P}} \quad (2)$$

where F(t) is the fluorescence at any time t, F₀ is the fluorescence level at time zero, A is amplitude, k is the rate constant, and S is the sigmoidal factor of each phase of FI, respectively.

Redox state of P700

Photooxidation and subsequent dark reduction of P700 were monitored as light-induced absorbance changes at 820 nm, (Δ_{A820}), at room temperature, using the ED-P700DW dual wavelength emitter detector connected via a PAM-101 fluorometer (Walz, Effeltrich, Germany). The ED-P700DW unit detects strictly the differential absorbance changes at 820 nm (Δ_{A820}) ascribed to the P700⁺ radical absorption and removes the plastocyanin absorbance changes (32). Photon flux density of far red (FR) light (75 µmol m⁻² s⁻¹) was obtained by passing the beam from a Filtre-Lite light source (Microview,

Thornhill, ON, Canada) through a RG-9 filter (Schott, Mainz, Germany). The assay medium contained 50 mM Hepes-NaOH (pH 7.6), 0.33 mM sorbitol, 2mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, 10 mM KCl, 10 mM NaCl, and a final chlorophyll concentration of 500 µg ml⁻¹.

Thermoluminescence

Measurements of thermoluminescence were performed using home-built equipment. The complete description of the design and functional aspects are described elsewhere (14, 33). Chloroplasts or thylakoid membranes were diluted to a final chlorophyll concentration of 200 µg mL⁻¹ in a medium containing 20 mM Tricine-NaOH (pH 7.8), 400 mM sucrose, 10 mM KCl, 10 mM NaCl, and 5 mM MgCl₂. About 300 µL of the suspension was added to the sample compartment (15 mm diameter) positioned just above the Peltier plate and covered with a Hellma 202-OS disc window. The sample chamber was closed with a holder bearing the light guide connected to the photomultiplier. The sequence of incubation periods and flash illumination was as follows. The samples were pre-incubated for 60 s at 20°C. Then the temperature was brought down to 2°C within 36 s and kept for 60 s. An actinic single turn-over saturating white flash of about 2 µs pulse width (setting 10, XE-STC, Walz, Germany), or a sequence of flashes, was then applied to initiate charge separation in PSII. In some experiments, the samples were pre-illuminated for 15 s with FR light to promote AG emission. Photon flux density of FR light (75 µmol m⁻² s⁻¹) was obtained by passing the beam from a Filtre-Lite light source (Microview, Thornhill, ON, Canada) through a RG-9 filter (Schott, Mainz, Germany). Finally, a linear warming (0.5 °C s⁻¹) of the 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 (14, 33). The glow curves were decomposed with asymmetric bands using Matlab software as previously described by Ducruet and Miranda (34) to obtain the proportion of B and AG bands.

RESULTS

Chlorophyll a fluorescence induction

In order to characterize the integrity of the isolated intact chloroplasts, their fluorescence induction (FI) curves were compared with those of the isolated thylakoid membranes and intact leaves (Fig. 1). Typical O-J-I-P traces were obtained from intact chloroplast preparations that were similar to the ones obtained from whole leaves with three phases O-J, J-I and I-P, occurring in the time scale of 1, 20 and 300 ms, respectively (15, 34). Noteworthy, the J-I phase of the induction is evidenced by a I step in both intact chloroplasts and leaves whereas, even though the J-I phase is still part of the induction, a clear I step cannot be observed in isolated thylakoid membranes unless suitable electron acceptors are added (35).

The appearance of I step in both intact chloroplasts and leaves is governed by the reduction/oxidation kinetics of the PQ pool. It was further shown that the presence of a distinct I step is associated with the sigmoidal nature of the I-P rise (35, 36). The sigmoidal factor, S, can be determined from the decomposition of the three phases of the fluorescence induction by non-linear regression of eq.2 as demonstrated previously (35, 36, see also Materials and Methods). The amplitudes and sigmoidal factors of the three phases of FI are presented in Table 1. It should be mentioned that sigmoidicity indicates how steep is the rise of a particular curve. With $S = 1$, the rise is exponential and sigmoidicity is absent while the values of S much superior to 1 suggest an S-shaped or sigmoidal rise of the curve.

As seen in Table 1, the sigmoidicity is present ($S > 1$) mostly for the I-P phase in leaves and intact chloroplasts (intactness of 80%), but is absent ($S = 1$) in isolated thylakoid membranes which presented an intactness of 0% as measured with an osmotic shock (see Materials and Methods). The sigmoidal factor is also absent for the O-J and J-I phases in both isolated and intact materials. This is due to the fact that, as mentioned in our earlier work (31), the processes responsible for the O-J and J-I phases, i.e., the reduction of Q_A and Q_B quinone acceptors by PSII, respectively, follow first-order

kinetics in all thylakoid, intact chloroplast and leaf samples, and, thus, lead to the exponential rises of O-J and J-I components in both intact and isolated samples with $S \sim 1$ (see eq. 2). The I-P phase, however, mainly involving the reduction of PQ pool by PSII, follows first-order kinetics only in the case of isolated thylakoids but exhibits a complex reduction kinetics in intact chloroplasts and leaves. As a result, the I-P rise in isolated thylakoids is exponential with $S_{IP} = 1$, but in intact materials the rise is rather S-shaped or sigmoidal in character having $S_{IP} \gg 1$.

By working with different percentages of chloroplast intactness, obtained by mixing various proportions of osmotically-shocked and intact chloroplasts, it was found that the sigmoidal factor of I-P phase (S_{IP}) increased as the percentage of intactness increased (inset of Fig. 1), suggesting the increased complexity of oxidation/reduction kinetics of the PQ pool in more intact materials. From the inset of Fig. 1, the extrapolation of chloroplast intactness to 100% from the linear regression yield a value of sigmoidal factor $S_{IP} = 6.2$ approaching that obtained in intact leaves.

Photooxidation of P700 by far-red light

The kinetics of P700 photooxidation were monitored in terms of the changes in absorbance at 820 nm to examine the effect of the degree of chloroplast intactness on PSI activity (Fig. 2A). The photooxidation kinetics of P700 during 15-s of far-red illumination, predominantly absorbed by PSI and resulting in the formation of $P700^+$ with absorption maximum at 820 nm, proceeded in two steps. As shown in the figure, the initial fast phase was followed by a small dip before the steady state was reached at the end of the slower phase in all chloroplast samples with differing degree of intactness. The initial fast phase has been shown to originate from the oxidation of P700 by the endogenous pool of NADP⁺ acting as PSI acceptors (37). A more pronounced initial phase was observed as chloroplast intactness was increased, showing that a larger pool of NADP⁺ acceptors is present in intact chloroplasts thereby enhancing the oxidation of P700. The decline thereafter is due to a re-reduction of $P700^+$ by electrons coming from the PQ pool that is maintained in reduced state by far-red light due to cyclic electron

transport around PSI and also this illumination can excite 10-15% of PSII centers (38). This decline is more intense in intact chloroplasts as cyclic PSI is more active with the presence of stromal components.

Considering that the far-red light can excite about 15% of PSII centers and can bring about the reduction of $\text{P}700^+$ by the electrons transferred to it by linear electron transport from PSII through the PQ pool, blocking of this electron transfer pathway results in a stronger oxidation of P700. In addition to this reduction route of $\text{P}700^+$, there exists another reduction pathway, namely, the ferredoxin (Fd)- and NADP(H)-mediated cyclic electron flow to PQ pool and then to $\text{P}700^+$. Thus, preventing this cyclic pathway to occur leads to an increase in P700 photooxidation.

This is, indeed, what is observed in Fig. 2B where one can note a stronger photooxidation of P700 in the presence of DCMU and MV. This is because DCMU curtails the electron flow from Q_A^- to Q_B , which, in turn, stops the transfer of electrons from Q_B to the PQ pool and eventually to $\text{P}700^+$. MV, on its part, is used as an efficient PSI artificial electron acceptor that prevents the recycling of electrons towards the PQ pool and then to P700. Thus, the combination of DCMU and MV alleviates the re-reduction of $\text{P}700^+$ and improves the extent of steady state oxidation of P700. This is demonstrated by the removal of the fast and middle phases of dark re-reduction of $\text{P}700^+$ observed after switching-off far-red light in the presence of DCMU and MV (Inset of Fig. 2B, *vide-infra*).

As the chloroplast intactness increases, the effectiveness of DCMU and MV in augmentation of P700 oxidation gradually decreases. This is illustrated more clearly in Fig. 2C, where the percent increase in P700 photooxidation, defined by the increase in $\Delta_{\text{A}820}$ in DCMU- and MV-treated samples relative to that in untreated samples, is plotted against chloroplast intactness. The decreasing effect of these additives with intactness is due to the increased size of the endogenous NADP^+ pool available in intact chloroplasts which, by itself, is able to oxidize P700 efficiently, thus diminishing the impact of the presence of DCMU and MV. From Fig. 2C, it can be extrapolated from the linear

regression that at 100% intact chloroplasts, the size of the NADP⁺ pool would be sufficient for the complete oxidation of the P700 population. These results stress the role of intactness in providing an ample supply of pool of PSI acceptors.

In order to better appreciate the importance of NADP⁺ and ferredoxin-quinone oxidoreductase (FQR) pathways enabling the cyclic electron transport to occur, the re-reduction kinetics of oxidized P700 ($P700^+$) after termination of FR light was analyzed in untreated (control) and DCMU- and MV-treated chloroplasts (Fig. 2B, inset). The dark decay in control chloroplasts can be fitted with three exponentials. The fast component with amplitude of $34 \pm 2\%$ and $t_{1/2}$ of 42 ± 2 ms is ascribed to the reduction of $P700^+$ by PSII electrons accumulated in the PQ pool (39, 40). The middle component with amplitude of $24 \pm 1\%$ and $t_{1/2}$ of 156 ± 7 ms and slow component with amplitude of $42 \pm 2\%$ and $t_{1/2}$ of 1240 ± 70 ms are assigned to the reduction of $P700^+$ by cyclic electron transport mediated by FQR and NAD(P)H dehydrogenase (Ndh), respectively, involved in the moderate and slow reduction of the PQ pool; Ndh is localized in the stroma lamellae proximal to PSI (41-43).

In intact chloroplasts treated with DCMU and MV, only a slow mono-exponential decay of $P700^+$ in the dark with a $t_{1/2}$ of 8940 ± 240 ms is, however, observed. The fast and middle components were suppressed by DCMU and MV, respectively. This explains why an increase in the photooxidation of P700 was observed in the presence of DCMU and MV (Fig. 2B) since they cut down the two main reduction routes (fast and middle) by which the amount of oxidized P700 could be re-reduced. The remaining component (slow phase) does not seem to be affected by these additives. This decay, as in control chloroplasts, is due to the reduction of $P700^+$ via NAD(P)H dehydrogenase (Ndh) pathway. Thus, a pool of stromal reductants remains available for this slow reaction.

Thermoluminescence

The TL glow curves for isolated thylakoid membranes, chloroplasts and spinach leaf following two single turn-over white flashes, are displayed in Fig. 3 (upper panel). The

TL signal from spinach leaves consisted of a maximum located at about 42°C, characteristic of the AG band appearing in the vicinity of 40-50°C. As mentioned, this band is related to recombination of $S_2/S_3Q_B^-$ charge pairs formed from the back electron transfer from stromal reductants towards PSII centers initially in S_2/S_3Q_B states. A shoulder at around 20°C representing the B band that originates from the recombination of $S_2/S_3Q_B^-$ charge pairs produced by the process of linear electron transport from PSII was also found as has usually been observed in plant leaves (15, 16, 23). The glow curve of thylakoid membranes, however, provided a well-defined single band with a maximum at 33°C, coinciding with the temperature optimum (30-40°C) for B band in this type of material (14). The AG band was absent in thylakoid membranes.

In chloroplasts (80% intactness, unless otherwise stated), the emission was clearly different from the glow curve of thylakoid membranes, but resembled somewhat that for the leaves. It was characterized by a broad band with a maximum at about 42°C, coinciding with the usual position of the AG band in leaves. However, both the thylakoid membranes and intact chloroplasts when incubated in a solution of 50 µM DCMU, known to block the electron flow beyond Q_A , presented quasi-identical glow curves (Q band) with a single maximum at 17°C, corresponding to the S_2/Q_A^- charge recombination (Fig. 3, lower panel). The reason for the absence of either B or AG band is that since DCMU stops the electron flow past Q_A , the formation of Q_B^- and state S_3 is not realized. As a result, the luminescent charge pairs $S_2/S_3Q_B^-$, responsible for both B and AG bands, although, produced differently, are not present.

The broad thermoluminescence band of chloroplasts with various degree of intactness could be decomposed into two components with emission peaks at 29-35 and 42°C, attributed, respectively, to B and AG bands (Fig. 4). This attribution is in agreement with the previous assignment of two components with glow peaks at similar temperatures in leaves (23). The amplitude and area of each component were determined for various preparations with different proportions of intact chloroplasts. The component attributed to B band decreased whereas the second component attributed to AG band increased as the percentage of chloroplast intactness augmented (Fig. 5). The increasing

chloroplast intactness renders the availability of stromal reductants in greater and greater amounts, giving rise to a stronger influx of electrons via cyclic electron transport from stroma reductants to PSII centers. This produces a large number of AG luminescent, S2/S3QB⁻, charge pairs, which otherwise were present in non-recombinant S2/S3QB state, thereby resulting in an intense or stronger AG emission band. The results in Fig. 5 thus suggest that the stromal content of the chloroplast, and, hence, its intactness, is required to obtain the AG band, as the thylakoids devoid of stroma and with zero intactness do not show any AG band. With 80% intact chloroplasts, as seen in Fig. 5, the AG/B ratio calculated from the linear regressions was 1.58. An extrapolation to 100% intact chloroplasts yielded an AG/B ratio of 3.41.

The chloroplasts AG band was further characterized to confirm if its properties bore resemblance to those of the AG band in leaves. The area of AG band was calculated for various numbers of pre-flashes and the results are presented in Fig. 6. From previous data obtained with plant leaves, a maximum is expected after two flashes and a minimum after 4 flashes, illustrating a period-four oscillation pattern (23, 24). Exactly same behaviour, i.e., a period-four oscillation pattern, has been observed for intact chloroplasts in the present study (Fig. 6).

In Fig. 7, the emission from thylakoid membranes is compared with the glow curve of intact chloroplasts in the presence of 5 μ M antimycin A (AA), an inhibitor of electron donation from stromal donors to the PQ pool through the cyclic FQR pathway (44). Strikingly, the afterglow component at 48°C completely disappeared, and the spectrum from chloroplasts with AA was very close to that obtained with thylakoids where only B band can be observed. This result highlights the importance of stromal reductants and the process of cyclic electron transport for the generation of AG band. The glow curve obtained from chloroplasts pre-illuminated with far-red light rather than with white flashes, is also shown in the figure. A broad band, similar to that seen in chloroplasts pre-illuminated with white flashes (Fig. 3) is observed. Once again, after deconvolution, this broad band resulted in two components, i.e., B and AG bands. The AG/B ratio of 1.98 in chloroplasts (80% intactness) preilluminated with far-red light is slightly higher compared to that (1.58) obtained with two white flashes.

DISCUSSION

In the present study, it is shown that AG thermoluminescence can be observed in intact chloroplasts. Further, the phenomena of AG thermoluminescence along with re-reduction of P700⁺ in the dark, points to the participation of cyclic electron transport in intact chloroplasts brought about by the presence of PSI acceptor pool/stromal reductants. These features, it should be stated, are observed only in intact chloroplasts and intact leaves but not in isolated thylakoid membranes. This, thus, emphasizes the importance of the intactness in materials which helps preserve the stromal content while it is lost in thylakoids during the isolation procedure.

The intact chloroplasts used in the present study share similar chlorophyll fluorescence properties as whole leaves. This is evidenced by their similar triphasic FI curves and by a sigmoidal factor, S_{I-P}, of the I-P phase, >> 1. In contrast, in isolated thylakoid membranes with zero intactness, the I-P phase lacked sigmoidicity. The I-P phase is mainly related to the photoreduction of the plastoquinone pool by PSII. This reduction process, as mentioned before, follows a first-order kinetics in isolated thylakoids, resulting in an exponential or non-sigmoidal rise of I-P phase with S_{I-P} = 1 (eq. 2 and Table 1). However, in intact chloroplasts or leaves that contain PSI electron acceptors, i.e., the oxidized Fd and NADP⁺, the reduction of PQ pool is complicated by its concurrent re-oxidation by P700⁺, and, therefore, is not a first order process. The cyclic electron flow via FQR and NADPH dehydrogenase (Ndh) routes may also influence the kinetics of PQ reduction in intact materials. Consequently, the I-P rise in intact chloroplasts and leaves is not exponential but is rather S-shaped or sigmoidal with S_{I-P}>> 1. The sigmoidicity in chloroplasts could thus serve as an indicator of their intactness. It also reveals the presence of a pool of PSI acceptors, and, as such, represents the fingerprint of PSI activity on FI (31).

The photooxidation kinetics of P700 observed under far-red illumination was also influenced by the presence of the pool of PSI acceptors (oxidized ferredoxin and/or NADP⁺) in significant amount in intact chloroplasts. This was shown by the minimal increase of P700 photooxidation with the addition of DCMU and MV compared to the

control (Fig. 2B). This is due to fact that in intact chloroplasts the endogenous acceptors were already present in sufficient quantity to insure almost complete photooxidation of P700 without requiring any further addition of exogenous acceptors.

During far-red illumination, P700 is oxidized and the stromal acceptors are reduced. In the following dark period, the reduced acceptors are responsible for the re-reduction of oxidized P700 through cyclic pathways involving the reduction of the PQ pool by ferredoxin-quinone oxidoreductase (FQR) and NAD(P)H dehydrogenase (Ndh) (Fig. 2B, inset) (45). Thus, the presence of stromal reductants, as a result of the intactness of chloroplast, plays an important role in the re-reduction kinetics of oxidized P700.

The same intactness also plays a key role in the generation of AG luminescence in chloroplasts. AG luminescence, as mentioned before, is related to the temperature-assisted back electron flow from stromal reductants to PSII centers to produce charge recombining AG luminescent $S_2/S_3Q_B^-$ pairs which were initially present in non-recombinating S_2/S_3Q_B state. The intactness secures the presence of stromal acceptors in abundance, and enables the cyclic electron transport activity of PSI to come into play. This is seen in Fig. 5 where one can note that in chloroplast with zero intactness, there is no AG luminescence; however, as the intactness, or in other words, as the size of the PSI acceptor pool increases, the intensity of AG band also increases, even surpassing the intensity of B band. The role of intactness, and hence, of stromal acceptors is further supported by the complete absence of afterglow emission in thylakoids (Fig. 3- upper pannel and Fig. 7) in which stromal components have been lost during the isolation procedure. The presence of a pool of stromal acceptors in chloroplasts is, therefore, mandatory for the occurrence of an AG band. As seen in Fig. 7, far-red illumination promotes the reduction of this pool and leads to AG emission. As such, the formation of reduced species responsible for AG thermoluminescence and dark re-reduction of P700 share a common pathway of electron transfer through cyclic PSI electron flow.

The observed chloroplasts AG band presented similar properties as in leaves, for example, (i) its period-four oscillation, (ii) induction by far-red light, and, (iii) inhibition by antimycin A. Further, its maximum at about 42°C also coincides with the maximum of emission observed in leaves (Fig. 3) (11), and is consistent with the enhancement of PSI cyclic electron flow above 40°C (38).

As described above, the recycling of electrons from stromal donors to PQ pool, leading to the AG emission, can occur via two pathways, the FQR-mediated cyclic electron transport and the slow Ndh-mediated route. However, depending upon the species, the relative contribution of each pathway may differ. For example, it has been shown by Havaux et al. (26) that while FQR plays a major role in tobacco leaves, it had only a very minor role in *Arabidopsis* leaves. In the present study with spinach chloroplasts, as shown in Fig. 7, the total disappearance of AG band in chloroplasts treated with antimycin A, an inhibitor of electron donation via FQR pathway, suggests that the FQR-mediated cyclic electron transport is a dominant pathway in giving rise to the AG emission in spinach chloroplasts.

Knowing that AG luminescence can occur only when the PSII centers are initially in S_2/S_3Q_B state, and a B band can be obtained with PSII centers in $S_2/S_3Q_B^-$ state, Ducruet et al. (23) calculated the theoretical values of the ratio of AG/B bands in samples pre-illuminated with two single turn-over flashes and with far-red light. They found a ratio of 5.1 for the former while a ratio of 2 was obtained for the latter. A ratio of 1.98 was obtained in the present study with 80% intact chloroplasts exposed to far-red light, which is quite close to the predicted value of 2. However, an AG/B ratio of 3.41 was obtained for pre-illuminated chloroplasts with two single turn-over flashes for intactness extrapolated to 100% (Fig. 5), which is rather inferior to the predicted value of 5.1. Similar low values have also been reported for the leaves (25). It was tentatively proposed that misses in the advancement of the S-states of the OEC could explain this discrepancy as they modify the population of centers in the S_2/S_3QB state (25). However, there is no evidence of increased misses in our oscillation pattern shown in Fig. 6.

Afterglow thermoluminescence has been shown to be an interesting probe to study various stress conditions in leaves under *in vivo* conditions and to provide early indication of changes in the electron transport status (24, 25, 46, 47). It can also be used to monitor cyclic PSI electron flow (25, 26). However, it is often difficult to infiltrate inhibitors or specific chemicals in leaves. Various leaf species may respond differently to added inhibitors as reported before (26). This is not always clear if this is due to the different leaf structure or different chloroplasts physiology. The exact concentration of additives at the thylakoid level is not known in leaves. The use of chloroplasts to study the various properties of the afterglow band and its relationship with PSI electron transport is of special interest as the chloroplasts retain their endogenous stromal content and can be readily treated with known concentrations of various additives. The chloroplasts can, thus, serve as an excellent *in-vitro* model to perform various photosynthetic studies.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. We also thank J. Harnois for the professional assistance rendered throughout this study.

REFERENCES

1. Wydrzynski, T. and K. Satoh (2006) Photosystem II: The Light-Driven Water-Plastoquinone-Oxidoreductase, in: T.Wydrzynski and K.Satoh (Eds.). Advances in photosynthesis and Respiration, Springer-Verlag.
2. Umena, Y., K. Kawakami, J.-R. Shen and N. Kamiya (2011) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at 1.9Å resolution. *Nature* **473**, 55-60.
3. Rappaport, F. and B. A. Dinner (2008) Primary photochemistry and energetics leading to the oxidation of the Mn₄Ca cluster and to the evolution of molecular oxygen in photosystem II. *Coord. Chem. Rev.* **252**, 259-272.
4. Ishikita, H. K. Hasagawa and T. Nogushi (2011) How does the QB site influence propagate to the QA site in photosystem II? *Biochemistry* **50**, 5436-5442.
5. Dekker, J. P. and R. Van Grondelle (2000) Primary charge separation in photosystem II. *Photosynth. Res.* **63**, 195-208.
6. Diner, B. A. and G. T. Babcock (1996) Structure, Dynamics, and Energy Conversion Efficiency in Photosystem II, in: D.R. Ort, C.F. Yocum (Eds.), Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 213-247.
7. Dau, H. and M. Haumann (2009) Principles, efficiency and blueprint character of solar energy conversion in photosynthetic water oxidation. *Acc. Chem. Res.* **42**, 1861-1870.
8. Gauthier, A., D. Joly, S. Boisvert and R. Carpentier (2010) Period-four modulation of photosystem II primary quinone acceptor (Q_A) reduction/oxidation kinetics in thylakoid membranes. *Photochem. Photobiol.* **86**, 1064-1070.
9. Renger, G. (2001) Photosynthetic water oxidation to molecular oxygen: apparatus and mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* **1503**, 210-228.

- 10.** Kawakami, K., Y. Umena, N. Kamiya and J.-R. Shen (2011) Structure of the catalytic, inorganic core of oxygen-evolving photosystem II at 1.9Å resolution. *J. Photochem. Photobiol. B* 104, 9-18.
- 11.** Sproviero, E. M., J. A. Gascon, J. P. McEvoy, G. W. Brudvig and V. S. Batista (2008) Quantum mechanics/molecular mechanics study of the catalytic site of water splitting in photosystem II. *J. Amer. Chem. Soc.* 130, 3428-3442.
- 12.** Renger, G. (2011) Light induced oxidative water splitting in photosynthesis; energetics, kinetics and mechanism. *J. Photochem. Photobiol. B* 104, 35-43.
- 13.** Dekker, J. P., J. J. Plijter, L. Ouwehand and H. J. Van Gorkom (1984) Kinetics of manganese redox transitions in the oxygen-evolving apparatus of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 767, 176-179.
- 14.** 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.
- 15.** Vass, I. and Govindjee (1996) Thermoluminescence from the photosynthetic apparatus. *Photosynth. Res.* 48, 117-126.
- 16.** Sane, P. V. (2004) Thermoluminescence: a Technique for Probing Photosystem II, in: R. Carpentier (Ed.), *Photosynthesis Research Protocols*, Humana Press. Totova, New Jersey, USA. 229-248.
- 17.** Desai, T. S., S. S. Rane, V. G. Tatake and P. V. Sane (1983) Identification of far-red-induced relative increase in the decay of delayed light emission from photosynthetic membranes with thermoluminescence peak V appearing at 321 K. *Biochim. Biophys. Acta* 724, 485-489.
- 18.** Bertch, W. F. and J. R. Azzi (1965) A relative maximum in the decay of long-term delayed light emission from the photosynthetic apparatus. *Biochim. Biophys. Acta* 94, 15-26.

- 19.** Björn, L. O. (1971) Far-red induced, long-lived afterglow from photosynthetic cells. Size of afterglow unit and plants energy accumulation and dissipation. Photochem. Photobiol. 13, 5-20.
- 20.** Sunbald, L.-G., W. P. Schröder and H.-E. Åkerlund (1989) S-state distribution and redox state of QA, in relation to luminescence decay kinetics. Biochim. Biophys. Acta 973, 47-52.
- 21.** Hideg, E., M. Kobayashi and H. Inaba (1991) The far red induced slow component of delayed light from chloroplasts is emitted from photosystem II. Photosynth. Res. 29, 107-112.
- 22.** Miranda, T. and J. M. Ducruet (1995) Characterization of the chlorophyll thermoluminescence afterglow in dark-adapted or far-red-illuminated plant leaves. Plant. Physiol. Biochem. **33**, 689-699.
- 23.** Ducruet, J. M., M. Roman, J. M. Ortega and T. Janda (2005) Role of the oxidized secondary acceptor Q_B of photosystem II in the delayed afterglow chlorophyll luminescence. Photosynth. Res. **84**, 161-166.
- 24.** Krieger, A., S. Bolte, K. J. Dietz and J. M. Ducruet (1998) Thermoluminescence studies on the facultative crassulacean-acid-metabolism plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. Planta. **205**, 587-594.
- 25.** Ducruet, J. M., M. Roman, M. Havaux, T. Janda and A. Gallais (2005) Cyclic electron flow around PSI monitored by afterglow luminescence in leaves of maize inbred lines (*Zea mays* L.): correlation with chilling tolerance. Planta **221**, 567-579.
- 26.** Havaux, M., D. Rumeau and J. M. Ducruet (2005) Probing the FQR and NDH activities in cyclic electron transport around photosystem I by the afterglow luminescence. Biochim. Biophys. Acta **1709**, 203-213.

27. Ducruet, J. M., A. Serrano, M. Roncel and J. M. Ortega (2011) Peculiar properties of chlorophyll thermoluminescence emission of autotrophycally or mixotrophycally grown *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Photochem. Photobiol. B* **104**, 301-307.
28. Joly, D. and R. Carpentier (2011) Rapid isolation of intact chloroplasts from spinach leaves. In: Carpentier R (ed) *Photosynthesis Research Protocols*. Springer, New York. 321-325.
29. Porra, R. J., W. A. Thompson and P. E. Kriedemann (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophyll 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.
30. Joly, D., C. Bigras, J. Harnois, S. Govindachary and R. Carpentier (2005) Kinetic analyses of the OJIP chlorophyll fluorescence rise in thylakoid membranes. *Photosynth. Res.* **84**, 107–112.
31. Joly, D. and R. Carpentier (2009) Sigmoidal reduction kinetics of the photosystem II acceptor side en intact photosynthetic during fluorescence induction. *Photochem. Photobiol. Sci.* **8**, 167-173.
32. Klughammer, C. and U. Schreiber (1998) Measuring P700 absorbance changes in the near infrared spectral region with a dual wavelength pulse modulation system. In: Garab G (ed) *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. V, 4357–4360.
33. Gauthier, A., S. Govindachary, J. Harnois and R. Carpentier (2006) Interaction of N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine with photosystem II as revealed by thermoluminescence: reduction of the higher oxidation states of the Mn cluster and displacement of plastoquinone from the QB niche. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**, 1547-1556.

34. Ducruet, J. M., T. Miranda (1992) Graphical and numerical analysis of thermoluminescence and fluorescence Fo emission in photosynthetic material. *Photosynth. Res.* **33**, 15-27.
35. Strasser, R. J. and Govindjee (1992) On the O-J-I-P fluorescence transients in leaves and D1 mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*, in: N. Murata (Ed.), *Research in Photosynthesis*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp. 23-32.
36. Joly, D. and R. Carpentier (2007) The oxidation/reduction kinetics of the plastoquinone pool controls the appearance of the I-peak in the O-J-I-P chlorophyll fluorescence rise: Effects of various electron acceptors. *J. Photochem. Photobiol. B* **88**, 43-50.
37. Joly, D., E. Jemâa and R. Carpentier (2010) Redox state of the photosynthetic electron transport chain in wild-type and mutant leaves of *Arabidopsis thaliana*: Impact on photosystem II fluorescence. *J. Photochem. Photobiol. B* **98**, 180-187.
38. Joliot, P. and A. Joliot (2006) Cyclic electron flow in C3 plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**, 362-368.
39. Bukhov, N., S. Govindachary, S. Rajagopal, D. Joly and R. Carpentier (2004) Enhanced rates of $P700^+$ dark-reduction in leaves of *Cucumis sativus L.* photoinhibited at chilling temperature. *Planta* **218**, 852-861.
40. Vassiliev, I. R., M. L. Antonkine and J. H. Golbeck (2001) Iron-sulfur clusters in type Ireaction centers. *Biochim. Biophys. Acta* **1507**, 139-160.
41. Govindachary, S., C. Bigras, J. Harnois, D. Joly and R. Carpentier (2007) Changes in the mode of electron Changes in the mode of electron flow to photosystem I following chilling-induced photoinhibition in a C3 plant, *Cucumis sativus L.* *Photosynth. Res.* **94**, 333–345.

- 42.** Shikanai, T., T. Endo, T. Hashimoto, Y. Yamada, K. Asada and A. Yokota (1998) Directed disruption of the tobacco *ndhB* gene impairs cyclic electron flow around photosystem I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 9705–9709.
- 43.** Kofer, W., H. U. Koop, G. Wanner and K. Steinmüller (1998) Mutagenesis of the genes encoding subunits A, C, H, I, J and K of the plastid NAD(P)H-plastoquinone-oxidoreductase in tobacco by polyethylene glycol-mediated plastome transformation. *Mol. Gen. Genet.* **258**, 166–173.
- 44.** Burrows, P. A., L. A. Sazanov, Z. Svab, P. Maliga and P. J. Nixon (1998) Identification of a functional respiratory complex in chloroplasts through analysis of tobacco mutants containing disrupted plastid *ndh* genes. *EMBO J.* **17**, 868–876.
- 45.** Endo, T., T. Shikanai, F. Sato and K. Asada (1998) NAD(P)H dehydrogenase-dependent, antimycin A-sensitive electron donation to plastoquinone in tobacco chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* **39**, 1226-1231.
- 46.** Bukhov, N. and R. Carpentier (2004) Alternative photosystem-I driven electron transport routes: mechanisms and functions. *Photosynth. Res.* **82**, 17-23.
- 47.** Sajnani, C., J. L. Zurita, M. Roncel, J. M. Ortega, M. Baron and J. M. Ducruet (2007) Changes in photosynthetic metabolism induced by tobamovirus infection in *Nicotiana benthamiana* studied *in vivo* by thermoluminescence. *New Phytol.* **175**, 120-130.
- 48.** Roncel, M and J. M. Ortega (2005) Afterglow thermoluminescence band as possible early indicator of changes in the photosynthetic electron transport in leaves. *Photosynth. Res.* **84**, 167-172.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Typical traces of chlorophyll a fluorescence rise in spinach leaves, intact chloroplasts and isolated thylakoid membranes. Intact chloroplast and thylakoid membranes were isolated from spinach leaves. The traces were normalized at F_0 . Insert: variation of I-P sigmoidal factor, S_{I-P} , as a function of chloroplast intactness. See Materials and Methods for details.

Figure 2. Original traces of far-red light-induced oxidation kinetics of P700 monitored as absorbance changes at 820nm: (A) in chloroplasts with different percentages of intactness indicated by the number adjacent to traces, (B) same as A but in the presence of 50 μM DCMU and 25 μM MV, (C) Relationship between ΔA_{820} (absorbance amplitude changes at 820nm) increase (%) versus chloroplasts intactness; ΔA_{820} increase (%) = $[(\Delta A_{820} \text{ in the presence of DCMU and MV} - \Delta A_{820} \text{ of Ctrl}) / \Delta A_{820} \text{ in the presence of DCMU and MV}] \times 100\%$.

Insert: photooxidation and dark re-reduction kinetics in intact chloroplasts without additive (Ctrl) or in the presence of 50 μM DCMU and 25 μM MV. The up and down arrows represent FR-light on and off, respectively.

Figure 3. Upper panel: Thermoluminescence spectra of spinach leaves, chloroplasts and thylakoid membranes. Lower panel: Thermoluminescence spectra of intact chloroplasts and thylakoid membranes obtained in the presence of 50 μM DCMU. See Materials and Methods for details.

Figure 4. Decomposition of the glow curve of chloroplasts with various degree of intactness into B and AG bands. See details in materials and Methods.

Figure 5. The relative area of B and AG bands versus chloroplast intactness (%) calculated from Fig. 4.

Figure 6. Afterglow band area in intact chloroplasts as a function of various pre-illumination flash numbers.

Figure 7. Thermoluminescence glow curves in intact chloroplasts in the absence or presence of $5\mu\text{M}$ antimycin A (AA) obtained with 15-s pre-exposure to far-red light. The glow curve of thylakoid membranes (pre-illuminated with 2 single turn-over white flashes) is also included for comparison.

Table 1

Amplitude (A) and sigmoidal factor (S) of the three phases of chlorophyll fluorescence induction in different samples

Samples	Phases					
	<u>O-J</u>		<u>J-I</u>		<u>I-P</u>	
	A	S	A	S	A	S
Leaf	48 ± 4	1.2 ± 0.1	34 ± 3	1.1 ± 0.1	18 ± 2	7.8 ± 0.9
Chloroplasts (80% intact)	32 ± 3	1.42 ± 0.08	51 ± 4	1	16 ± 2	5.2 ± 0.6
Thylakoids	46 ± 4	1.1 ± 0.1	27 ± 3	1	26 ± 3	1

Figure 1

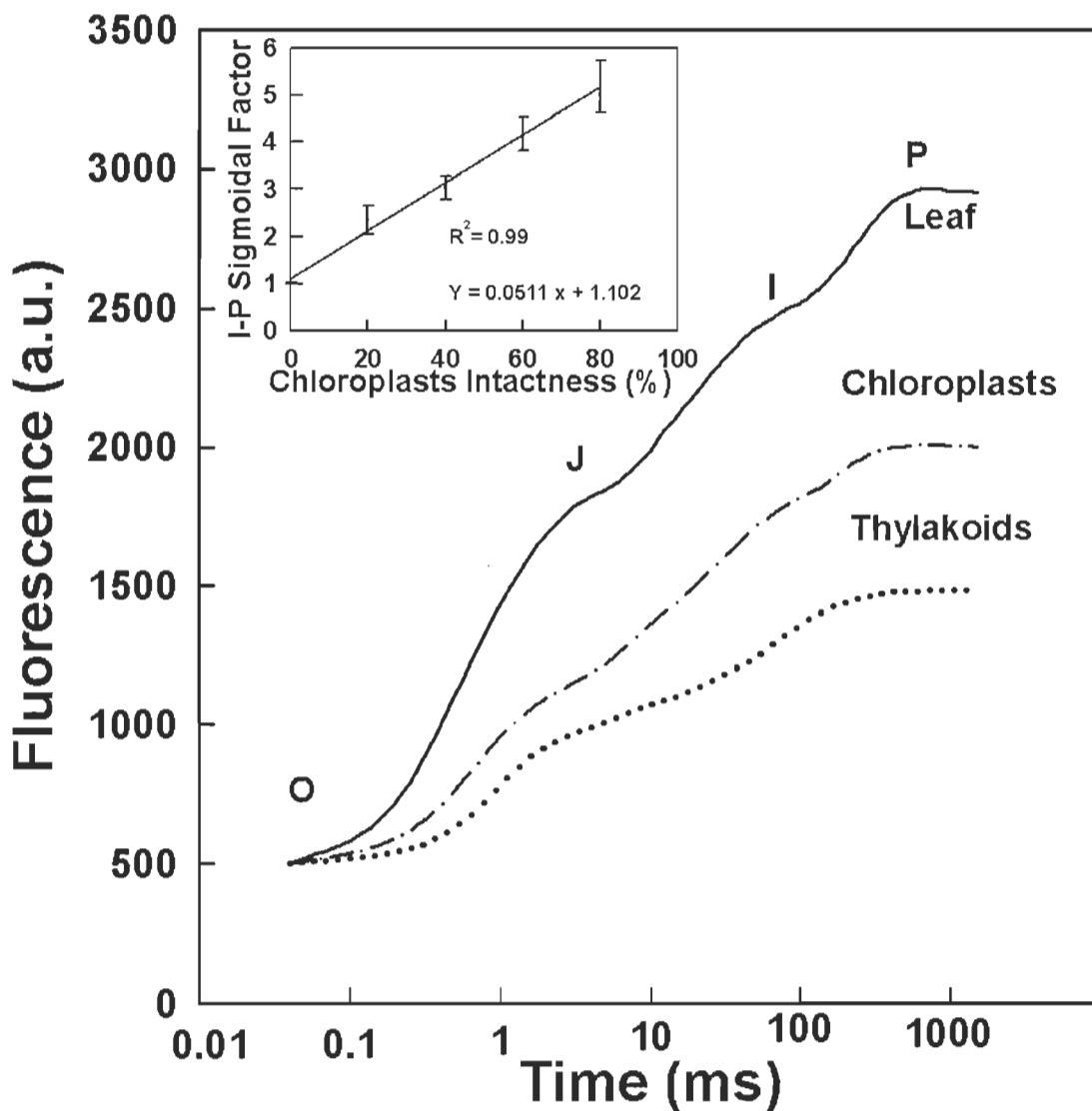


Figure 2

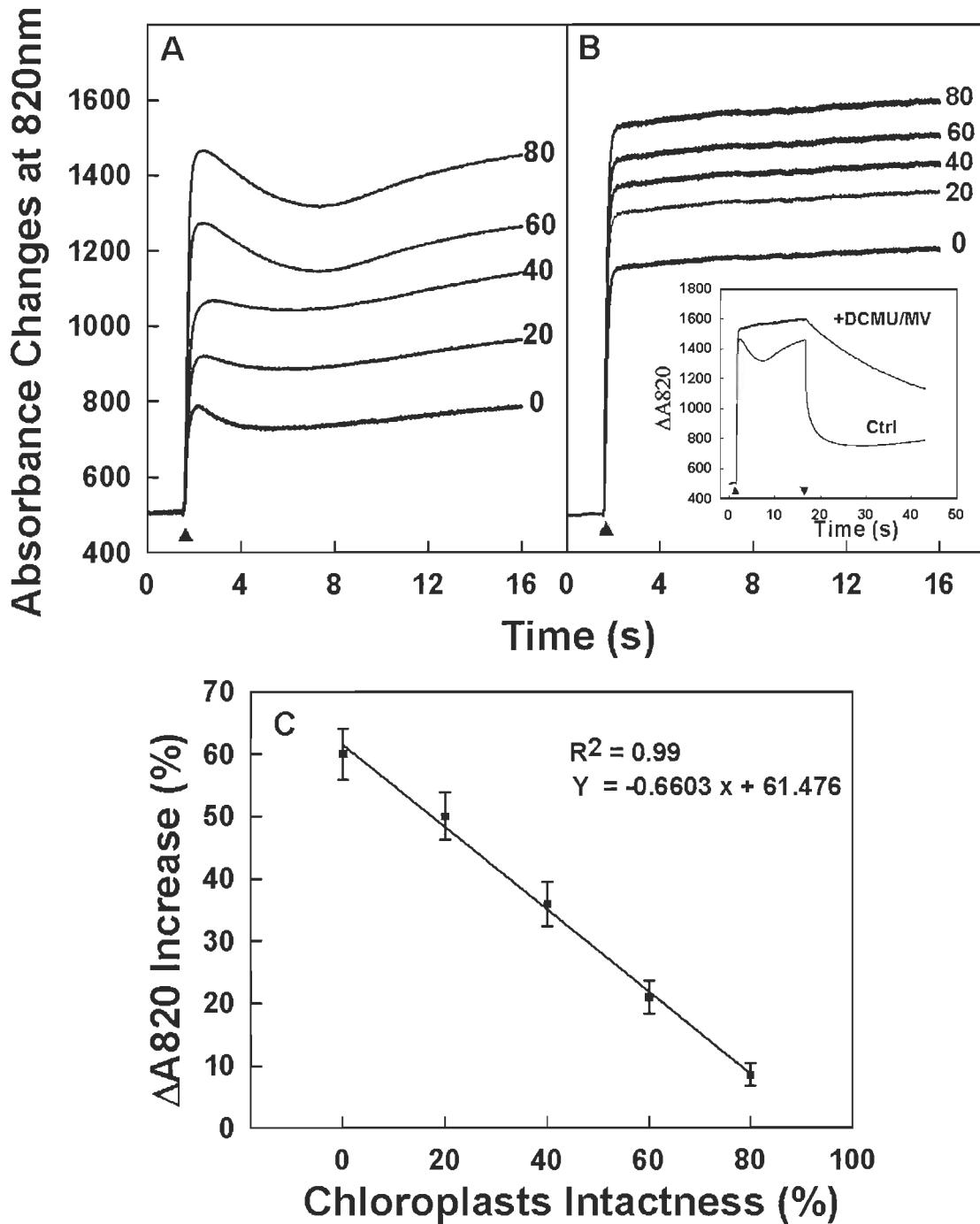


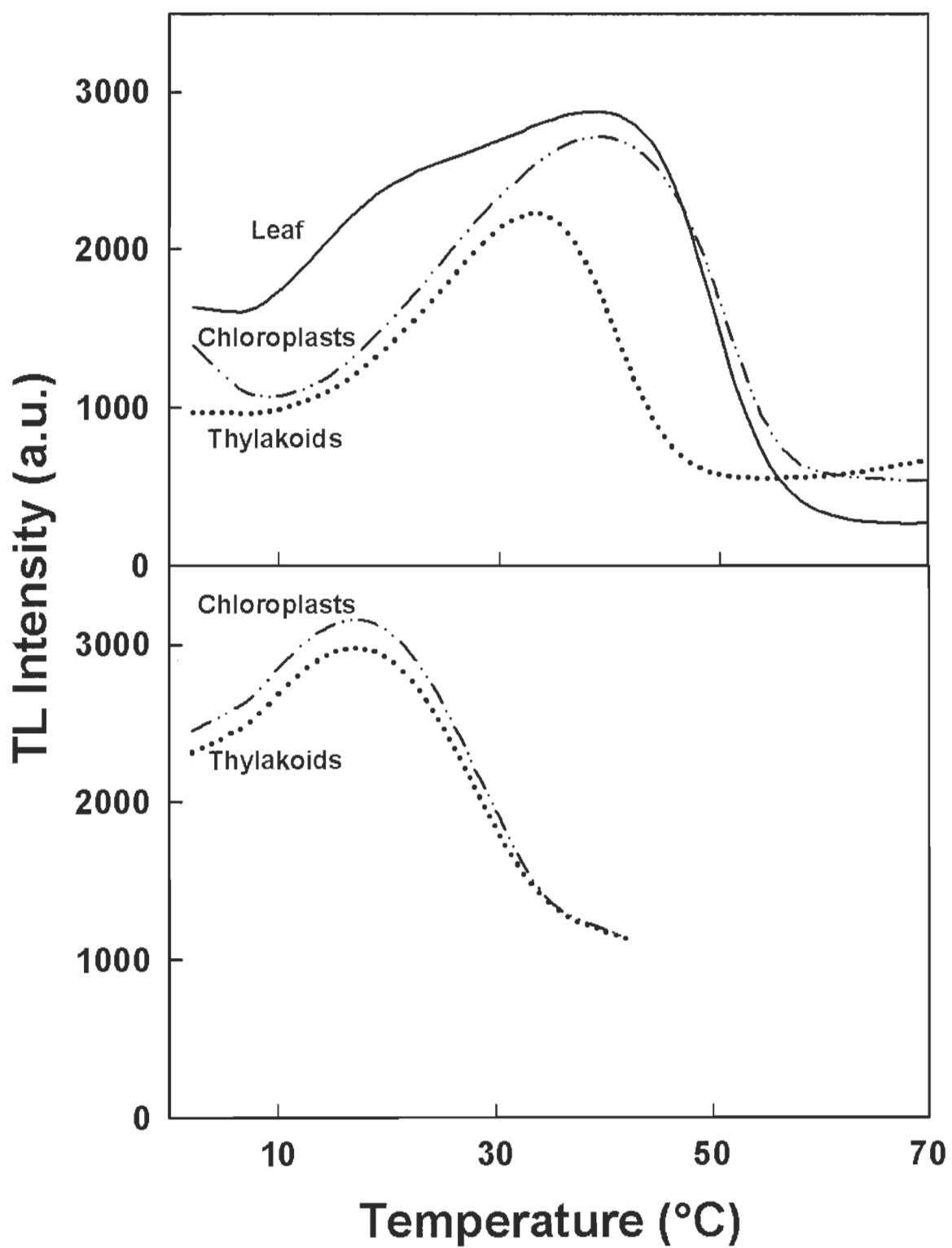
Figure 3

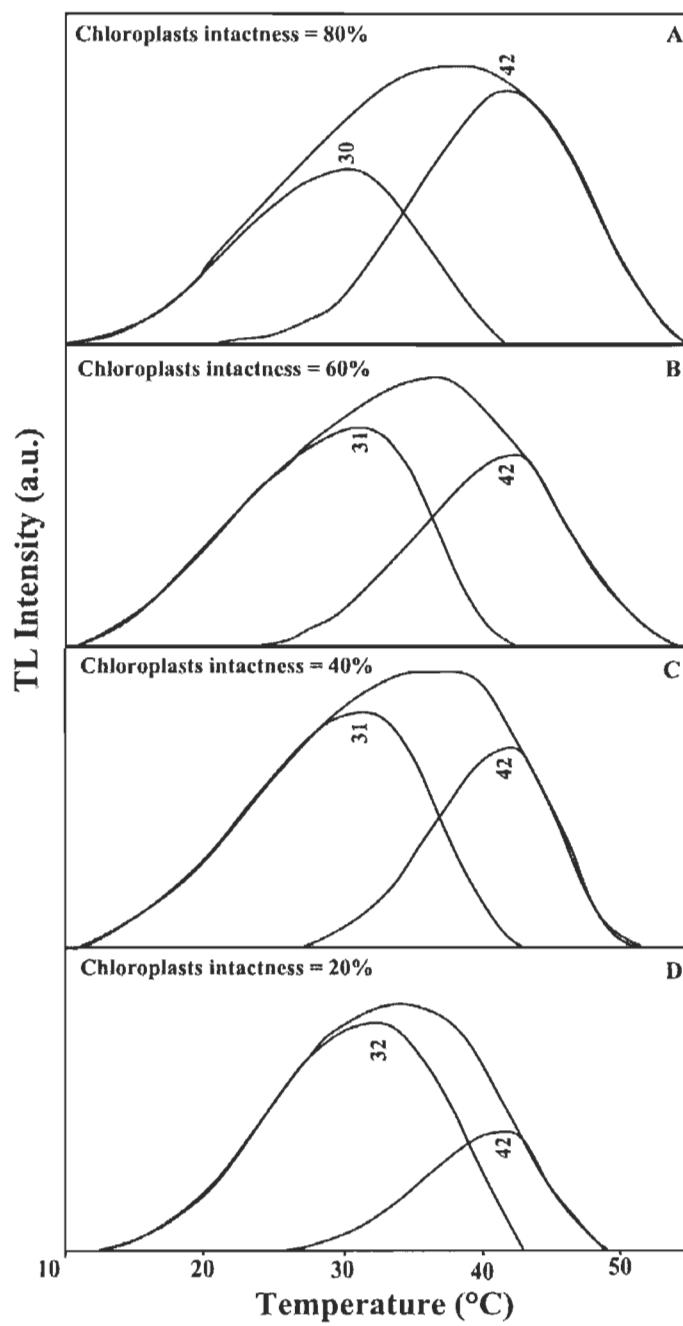
Figure 4

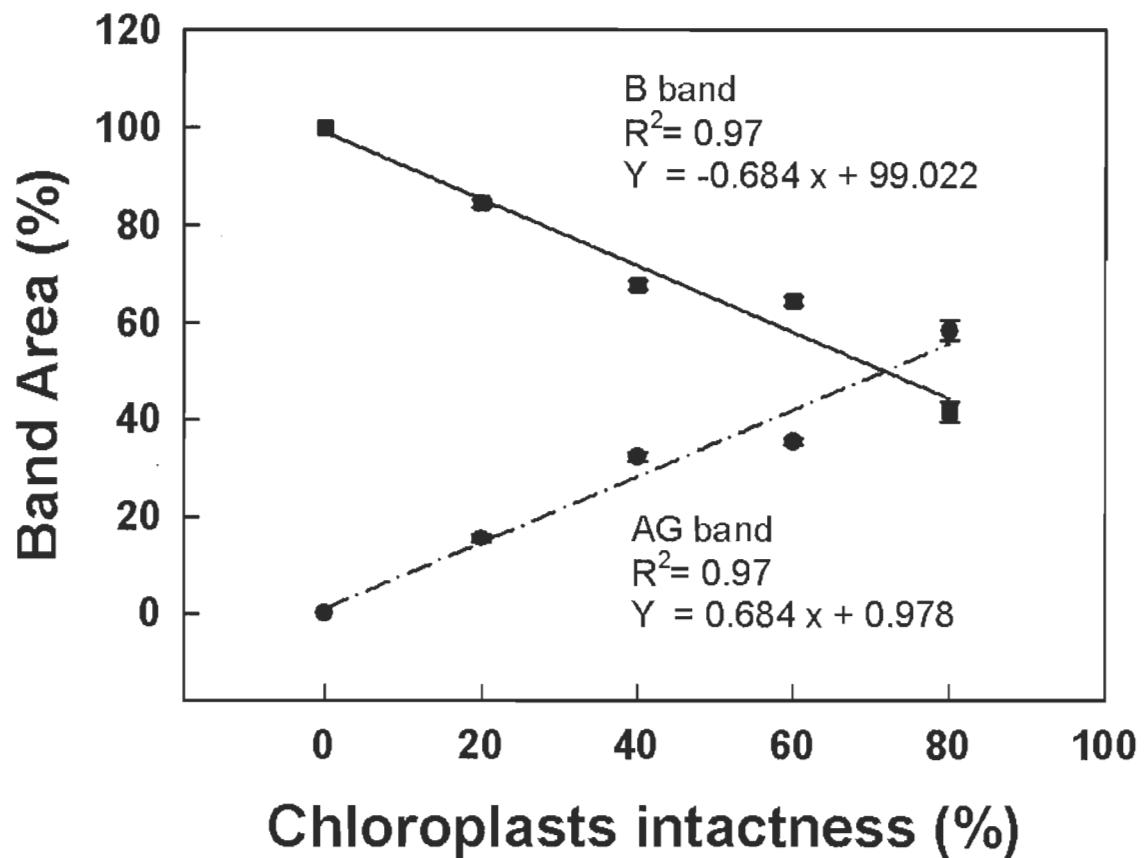
Figure 5

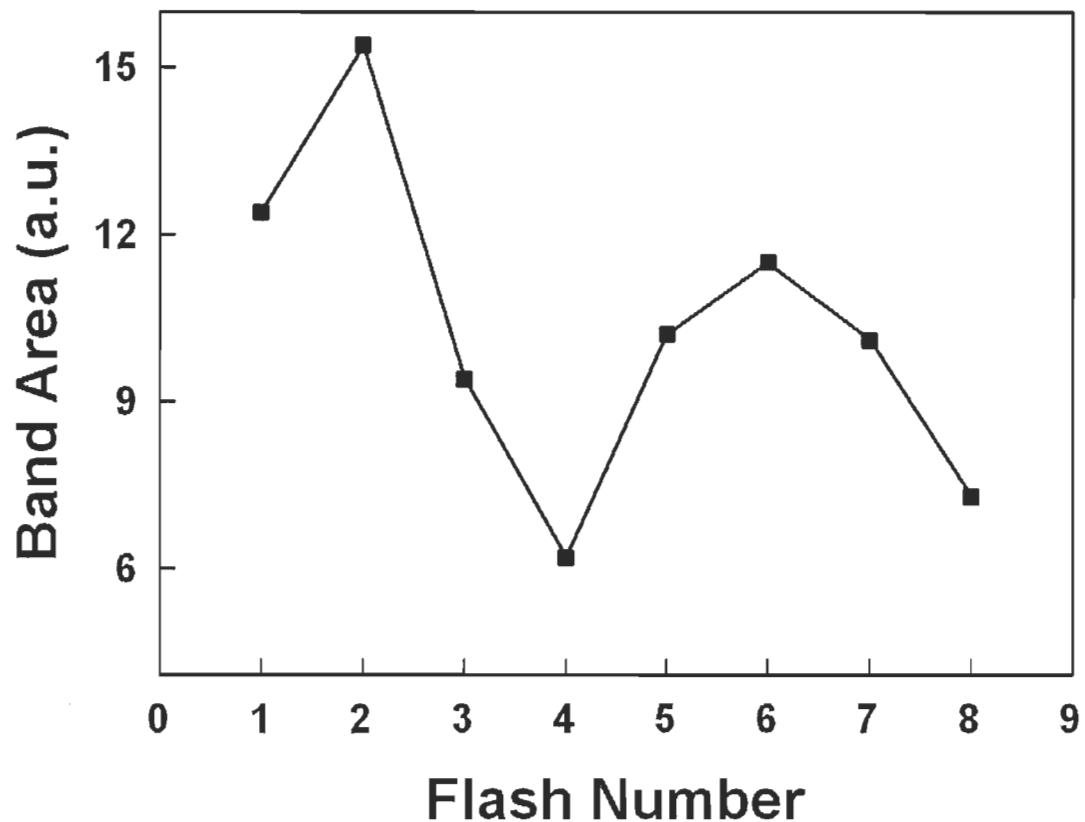
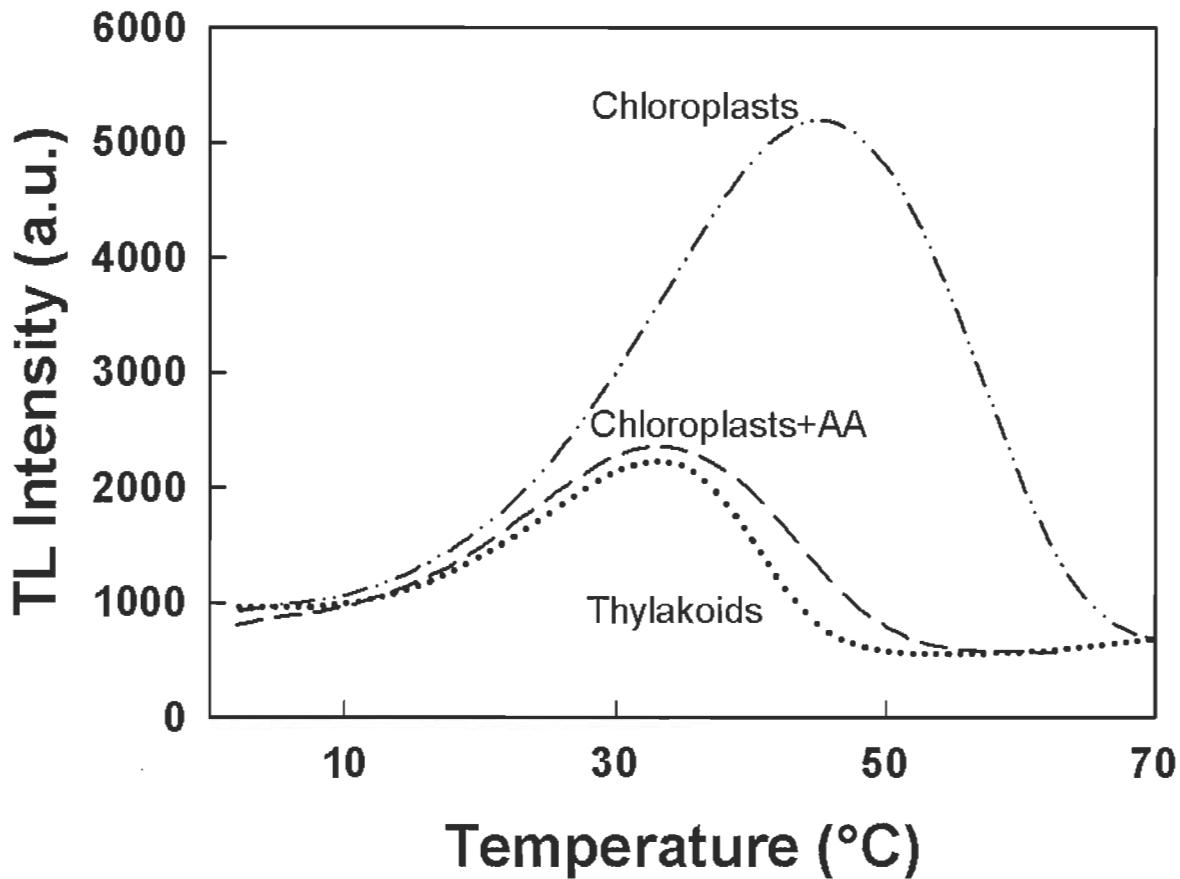
Figure 6

Figure 7

CHAPITRE V

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Le présent chapitre comprend les analyses qui ont été effectuées à l'aide des résultats supplémentaires que nous avons obtenus en laboratoire lors de notre projet et ne font pas partie de l'article publié. Ce chapitre est divisé en deux sections principales qui traiteront successivement l'optimisation du procédé d'isolation des chloroplastes intacts ainsi que l'étude du rôle spécifique du DBMIB dans le transport d'électrons au sein de l'appareil photosynthétique.

5.1 L'optimisation du procédé d'isolation des chloroplastes intacts

Avant de discuter des résultats expérimentaux, nous allons tout d'abord analyser les performances de l'intégrité des chloroplastes que nous avons obtenus. En effet, pour une extrapolation des conclusions d'une étude *in vitro* vers une étude *in vivo*, il est important que les organelles étudiées soient similaires dans les deux conditions. Par exemple, si nous voulons étudier l'effet d'un stress sur les chloroplastes des feuilles, il sera plus adéquat de travailler dans des conditions *in vitro* afin de mieux maîtriser tous les paramètres (ajout des différents additifs chimiques, inorganiques..., etc.). La transposition des conclusions de cette étude *in vitro* vers l'*in vivo* n'est possible que si l'intégrité des chloroplastes est la même dans les deux conditions. C'est la raison pour laquelle la première partie de notre projet a porté sur l'optimisation du degré d'intégrité des chloroplastes isolés des épinards.

Il convient de dire que David Joly est le premier à travailler dans notre laboratoire sur des chloroplastes intacts, avec un rendement d'intégrité des chloroplastes qui était de $70 \pm 1\%$. Donc, notre objectif était d'améliorer ce rendement. Pour ce faire, j'ai dû optimiser différents paramètres lors de plusieurs expériences et tests.



Figure 5.1 : Schéma des différentes étapes lors d'isolation des chloroplastes.

Le premier paramètre lors de l'étape 1 (figure 5.1) était lors du broyage des épinards. J'ai compris que travailler avec un mixeur à une vitesse supérieure provoque une détérioration des chloroplastes et par ce fait, diminue le rendement d'intégrité. Donc, j'ai optimisé cette étape en travaillant avec une vitesse moyenne « touche Mix » et de ne pas utiliser « touche purée ».

Un autre paramètre, c'est le temps de travail durant la première étape. Plus la durée est longue plus il va y avoir des dommages aux chloroplastes, cela est dû au tampon 1 qui provoque un choc osmotique. Donc, j'ai pu savoir qu'un temps maximum de travail à la première étape ne doit pas dépasser 1 minute. L'autre paramètre au niveau de la première étape est la vitesse de centrifugation qui était 750 g, je l'ai augmentée à 850 g. L'augmentation de la vitesse de centrifugation permet la récupération d'un maximum possible de chloroplastes intacts de notre surnageant.

Au niveau de la deuxième étape (figure 5.1), on a optimisé deux paramètres: la vitesse de centrifugation ainsi que les composants du tampon 2. Pour ce qui est de la vitesse de

centrifugeuse, elle a été augmentée du 750 à 850 g. Alors, pour ce qui est du tampon utilisé on a augmenté la concentration de sorbitol de 0.33 M à 0.50 M (tableau 5.1). La concentration de sorbitol est primordiale, car elle permet d'éviter le choc osmotique des chloroplastes intacts lors d'isolation dû à la différence de concentration entre la quantité de sucre présent à l'intérieur et à l'extérieur des chloroplastes.

Un autre facteur très important a pu être vérifié soit le matériel utilisé pour l'isolation. Les feuilles des épinards donnent un très bon rendement comparativement aux feuilles du pois. Cette différence s'explique par la fragilité de la feuille du pois comparativement à celle des épinards. La feuille de pois se détériore plus rapidement si on utilise une vitesse de centrifugation élevée. Cette hypothèse a été vérifiée en changeant la vitesse de centrifugeuse à la baisse pour les pois (700 g) dans les deux étapes, cela s'est traduit par une amélioration du rendement d'intégrité.

Finalement, pour avoir un bon rendement d'intégrité des chloroplastes, il faut tenir compte des différents paramètres lors de l'isolation à savoir : le choix de matériels, la vitesse de centrifugation qui doit dépendre du genre de feuilles utilisées, le temps entre les deux étapes d'isolation et l'utilisation des tampons qui doivent être fraîchement préparés.

Tableau 5.1

Paramètre d'isolation à 70 et 80 °C d'intégrité pour les chloroplastes intacts

Tampon	Composants	Concentration finale Rendement 70 ± 1 %	Concentration finale Rendement 80 ± 2 %
A	Hepes -NaOH pH 6.9	50mM	50mM (pH =7.2)
	Sorbitol	0.33mM	0.33mM
	EDTA	2mM	2mM
	MnCl ₂	1mM	1mM
	MgCl ₂	1mM	1mM
	Centrifugeuse	750 g	850g
B	Hepes -NaOH pH 7.6	50mM	50mM
	Sorbitol	0.33mM	0.50mM
	EDTA	2mM	2mM
	MnCl ₂	1mM	1mM
	MgCl ₂	1mM	1mM
	KCl	10mM	10mM
	NaCl	10mM	10mM
	Centrifugeuse	750g	850g

5.2 Étude du rôle du DBMIB dans le transport d'électrons

Dibromothymoquinone (DBMIB) ou 2,5-dibromo-3-isopropyl-6-methylbenzoquinone, est une quinone artificielle de poids moléculaire 321.993 g mol⁻¹, avec une température de fusion de 70-72°C. Cette molécule est largement utilisée pour étudier le transport d'électrons dans l'appareil photosynthétique (Trebst et al. 1970; Trebst, 2007; Bukhov et al. 2003; Rajagopal et al. 2003).

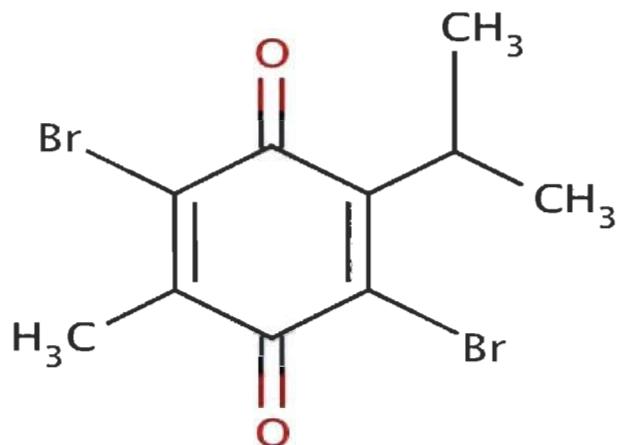


Figure 5.2 : Structure chimique du DBMIB

Le DBMIB a été introduit par Draber et al. (1970) comme un antagoniste de la plastoquinone dans les plantes vertes, bloquant le flux d'électrons entre les deux photosystèmes (II et I). Le même auteur (Trebst, 1974) a montré l'inhibition par le DBMIB du transfert cyclique d'électrons autour du PS I de la même manière que le transfert linéaire d'électrons au niveau du site Qo du complexe cytochrome b6/f. Plus tard, on a montré que le DBMIB inhibe le transport des électrons dans les mitochondries (Poole et Haddock, 1975) et *Escherichia coli* (Loschen et Azzi, 1974) en inhibant les fonctions dans les deux systèmes d'ubiquinone. Huber et Edwards (1975) ont suggéré une sensibilité du DBMIB au flux d'électron cyclique et linéaire après la PQ. Sun et Crane (1976) ont montré que l'inhibition par le DBMIB chez *E. coli* pourrait être inversée par l'addition d'ubiquinone. Baltscheffsky (1974) est le premier à confirmer un effet inhibiteur du DBMIB chez les bactéries. En utilisant de faibles concentrations de DBMIB, il a signalé une forte inhibition de la photophosphorylation et du transport d'électrons. Le site d'inhibition du transport d'électrons a été considéré comme entre les cytochromes b et C₂, dans la voie de transport cyclique d'électrons de *R. rubrum*. Récemment, Roberts et al. (2004) ont montré que l'orientation du complexe fer/ soufre dans la protéine est affectée par le DBMIB. D'autre part, il a été confirmé que le DBMIB quench la fluorescence au niveau du PSI (Rajagopal et al. 2003), ainsi qu'au niveau du PSII (Bukhov et al. 2003).

Le DBMIB sera un outil extrêmement utile pour sonder l'implication des benzoquinones dans les réactions photochimiques de la photosynthèse. Pour ce faire, nous allons effectuer des mesures de thermoluminescence avec deux éclairs sur des échantillons de chloroplastes intacts et de thylakoïdes, avec et sans la présence de différentes concentrations de DBMIB, ainsi que de la fluorescence à température ambiante pour des chloroplastes intacts. Rappelons que deux éclairs nous permettent d'avoir un maximum d'intensité de thermoluminescence. Ils amènent la majorité des centres réactionnels luminescents dans l'état S_2/S_3Q_B et $S_2/S_3Q_B^-$ qui favorise les deux bandes AG et B présentes dans les chloroplastes intacts (Ducruet, 1992).

5.2.1 Effet du DBMIB sur les bandes AG et B de thermoluminescence

Les courbes d'émission de TL pour les chloroplastes intacts sans traitement (Ctrl) et celles traitées avec du DBMIB sont effectuées avec deux flashes saturants. Le signal de TL pour les chloroplastes intacts (figure 5.3, Ctrl) se composait d'un maximum d'émission situé à une température maximale de 41.4 °C, caractéristique de la bande AG, qui correspondait avec une température maximale théorique entre 40-50 °C (Ducruet, 2003). Cette bande est liée à la recombinaison des paires de charges des états $S_2/S_3Q_B^-$ formée par le transfert d'électrons à partir des réducteurs du stroma vers les accepteurs du centre du PSII, à partir des états S_2/S_3Q_B (Ducruet, 2003; Ducruet et al. 2005). La bande de thermoluminescence de chloroplaste intact a été décomposée en deux composantes de 39 % et 61 %, avec des pics d'émission à 32 et 44 °C attribués, respectivement aux bandes B et AG. Ce qui nous a donné un ratio AG/B de 1.56. Ce résultat est en concordance avec des résultats antérieurs (Ducruet et al. 2005).

Au cours de traitement avec les différentes concentrations de DBMIB, l'intensité de fluorescence diminue avec un léger déplacement du maximum d'émission vers des températures plus élevées, de 41.4 °C à 44 °C (figure 5.3 trace 20 µM). L'inhibition est d'autant plus forte que la concentration en DBMIB augmente. La figure 5.3 révèle également que le positionnement des pics de la température maximale des bandes AG et B dépend de la concentration de DBMIB ajouté. En présence de 20 µM de DBMIB, la

bande B a été probablement complètement supprimée, cela explique le décalage du reste de la bande AG vers une température plus élevée.

Le changement du ratio des populations initiales $S_0 : S_1$ et $Q_B^- : Q_B$ après deux flashes provoque un effet sur les côtés donneur et accepteur qui se traduit par les états de recombinaison des charges : S_2Q_B , S_3Q_B , $S_2Q_B^-$, $S_3Q_B^-$ (Ducruet et al. 2005). Cette situation est favorable pour les deux bandes B et AG à titre égal (50 % -50 %) avec un ratio 1 :1. De cela, nous pouvons confirmer que le DBMIB quench la fluorescence au niveau de la bande B plus que celle de la bande AG, vu que la bande B disparaît plus rapidement que la bande AG. Par contre, on observe qu'à forte concentration en DBMIB toutes les courbes tendent vers une suppression complète.

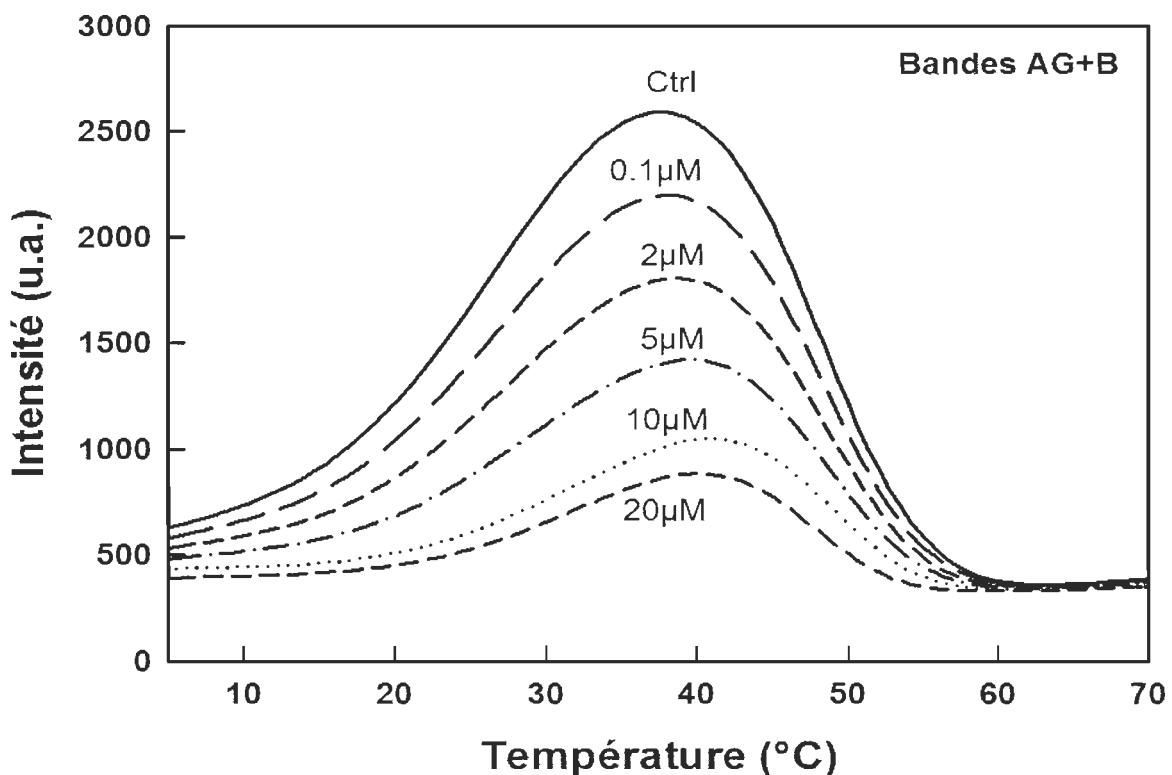


Figure 5.3 : Évolution des bandes AG et B présentes dans les chloroplastes intacts en absence (Ctrl) et en présence de 0.1, 2, 5, 10 et 20 μM de DBMIB.

5.2.1.1 La constante de Stern-Volmer pour les bandes AG et B de thermoluminescence

Le quenching suit la relation de Stern-Volmer $F_0 / F = 1 + K_{SV} [Q]$ où F_0 et F sont les émissions de fluorescence chlorophyllienne en absence et en présence du DBMIB respectivement, K_{SV} est la constante Stern-Volmer, et $[Q]$ est la concentration de la quinone DBMIB. La courbe de tendance dans l'intervalle de concentration étudiée (0.1 au 20 μM) est linéaire avec un coefficient de corrélation de 0.98. La pente a donné une valeur de K_{SV} de $1,03 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Ce résultat obtenu est similaire à des études faites auparavant et qui ont donné des valeurs de même ordre de grandeur pour le PSI et PSII (Bukhov et al. 2003; Rajagopal et al. 2003).

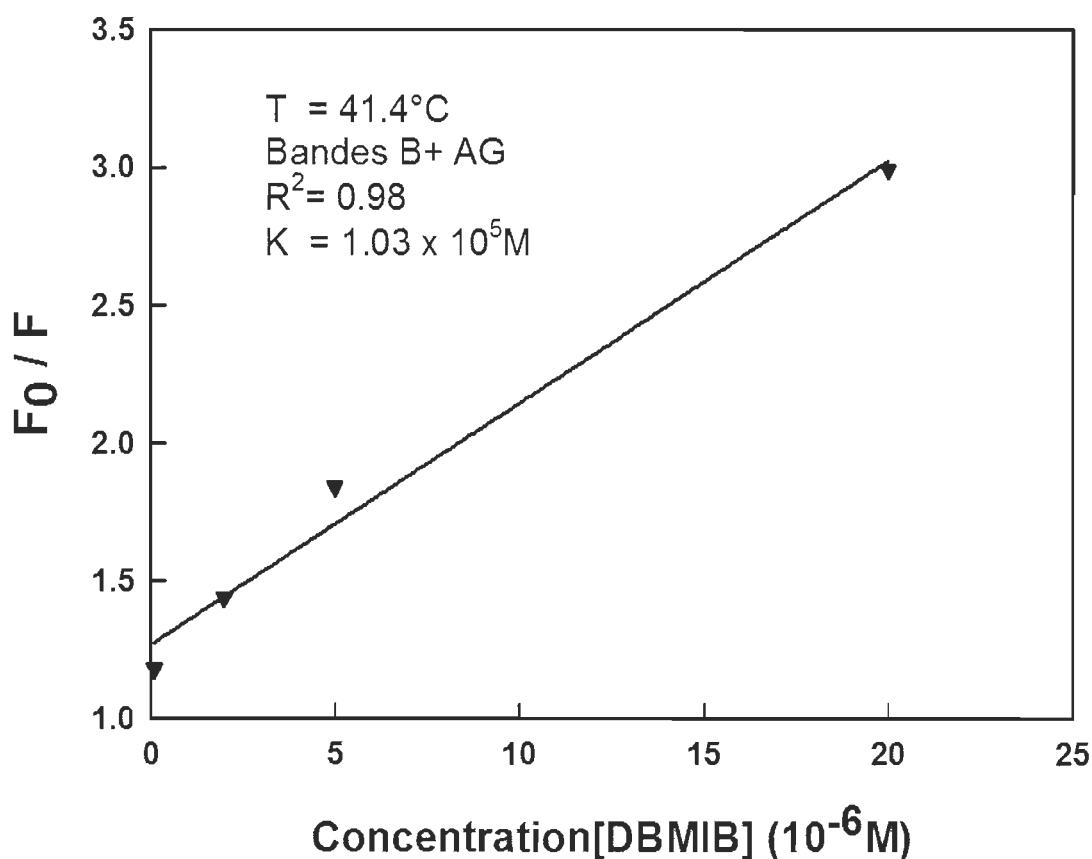


Figure 5.4 : Variation du rapport d'intensité de fluorescence en fonction de la concentration en DBMIB dans des chloroplastes intacts (bandes B et AG) par thermoluminescence.

5.2.2 Effet du DBMIB sur la bande B de thermoluminescence

La figure 5.5 montre les courbes de TL des thylakoïdes isolées des épinards sans traitement (Ctrl) ainsi qu'en présence de différentes concentrations de DBMIB. La courbe de TL (Ctrl) montre un maximum d'émission d'intensité luminescente avec un pic d'une température maximale de 38 °C qui coïncide avec la température optimale (30-40 °C) pour la bande B dans ce type de matériel (Ducruet, 2003). Cette dernière provient de la recombinaison de charges des états $S_2/S_3Q_B^-$ produites par le processus de transport linéaire d'électrons au niveau du PSII (Ducruet et al. 2005).

La figure 5.5 révèle également que le rendement de l'intensité de la bande B et sa température maximale sont dépendants de la concentration du DBMIB ajoutée. En présence de 10 µM de DBMIB, la bande B a perdu 65 % de sa fluorescence totale avec un décalage vers le bas de la température maximale (38 °C à 36 °C), comparativement aux chloroplastes intacts qui ont perdu, après 10 µM DBMIB, 65 % de la fluorescence totale de la courbe. Cela explique le décalage de la température de la bande des chloroplastes intacts vers une température supérieure qui est due à la suppression de la bande B après ajout de 20 µM de DBMIB. Donc, il ne reste que la bande AG avec une température maximale supérieure à celle de la bande B.

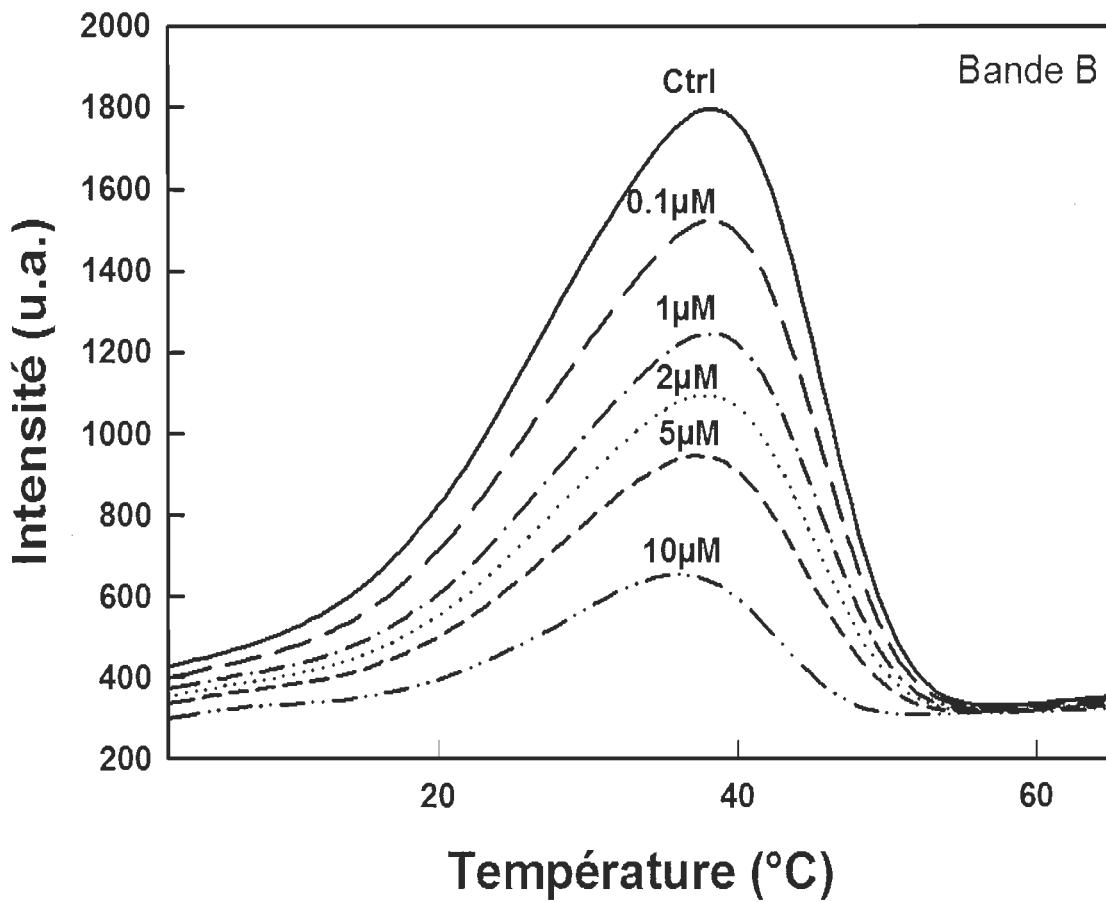


Figure 5.5 : Évolution de la bande B présente dans les thylakoïdes en absence (Ctrl) et en présence de 0.1, 1, 2, 5 et 10 μM de DBMIB.

5.2.2.1 La constante de Stern-Volmer pour la bande B de thermoluminescence

La figure 5.6 montre la courbe de variation du rapport d'intensité de fluorescence en fonction de la concentration en DBMIB pour la bande B. La courbe de tendance dans l'intervalle de concentration étudiée (0.1 à 10 μM) est linéaire avec un coefficient de corrélation de 0.98. La pente a donné une valeur de K_{SV} de $1,54 \times 10^5 M^{-1}$ pour la bande B, supérieure à celle des bandes AG +B des chloroplastes intacts. Ce résultat obtenu est en accord avec l'hypothèse qu'on a supposée auparavant, le DBMIB quench plus la bande B que la bande AG. Les valeurs de la constante de Stern-Volmer confirment que le DBMIB quench plus la fluorescence au niveau des thylakoïdes qu'au niveau des chloroplastes intacts. Ceci peut être expliqué par la nature de chaque

membrane. Les thylakoides sont exposés directement au DBMIB et, par ce fait, ils sont plus affectés par les réactions du DBMIB, comparativement aux chloroplastes intacts qui ont une double membrane qui limite possiblement l'accès du DBMIB à l'intérieur des chloroplastes pour réagir avec différents sites.

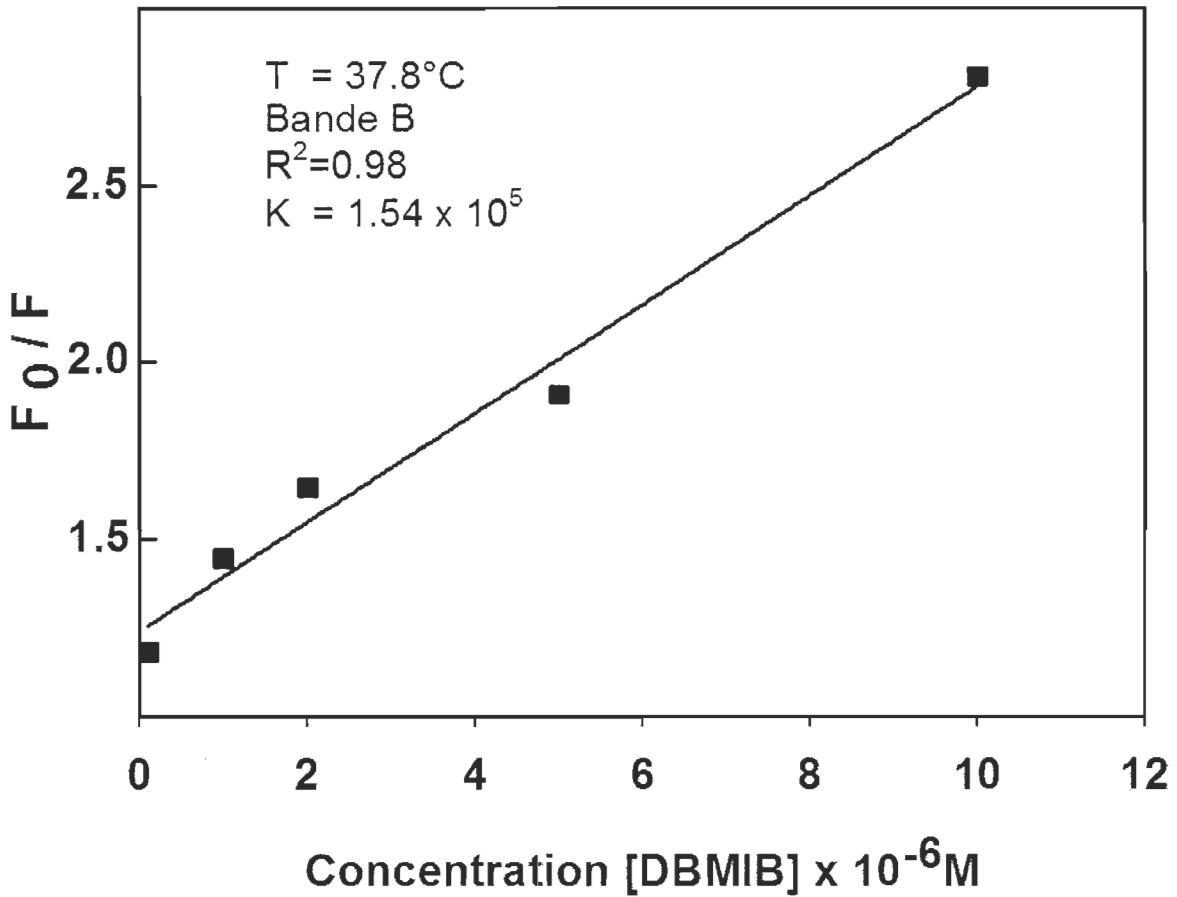


Figure 5.6 : Variation du rapport d'intensité de fluorescence en fonction de la concentration en DBMIB dans des thylacoïdes (bande B).

5.2.3 Effet du DBMIB sur la bande Q de thermoluminescence

Pour identifier le site d'action de DBMIB dans la chaîne de transport linéaire d'électrons, les courbes de TL ont été enregistrées après deux simples flashes saturants. La présence de 50 μM de DCMU, inhibiteur de transport d'électrons entre les quinones Q_A et Q_B , se

traduit par la suppression de la bande B pour les thylakoïdes et les bandes B et AG pour les feuilles (Ducruet et al. 2005) et les chloroplastes intacts (ce travail).

La suppression des bandes B et AG s'accompagnent par l'apparition de la bande Q avec une température maximale de 16 °C, correspondant à la recombinaison de charges $S_2Q_A^-$ (Vassiliev et al. 2001). L'inhibition du flux d'électrons entre Q_A et Q_B empêche la réalisation des états S_3 et bloque l'arrivée des électrons de la quinone secondaire Q_B qui sont responsables des recombinaisons des charges S_3Q_B et $S_3Q_B^-$ ainsi que S_2Q_B et $S_3Q_B^-$. La figure 5.7 montre les courbes de TL des chloroplastes intacts isolés des épinards sans traitement ainsi que ceux traités avec différentes concentrations de DBMIB. La courbe de TL (Chloroplastes +DCMU) montre un maximum d'émission d'intensité luminescente avec un pic d'une température maximale de 16 °C qui coïncide avec la température optimale (10-20 °C) pour la bande Q dans ce type de matériel (Ducruet et al. 2005). Une diminution progressive de la bande Q a été observée lorsque la concentration de DBMIB a été augmentée, avec 10 µM de DBMIB l'intensité de la bande Q a été réduite de 34 %.

La comparaison entre les trois bandes B, AG et Q nous permet de conclure que le DBMIB quench moins fort la bande Q que les bandes B et AG. Cela s'explique par le fait que l'action au niveau de la bande Q se fait juste au niveau d'un seul site (Q_A). Par contre, pour la bande AG, les sites d'action du DBMIB sont multiples (Cyt b6f, PSI) donc l'effet du quenching est plus efficace. Pour ce qui est de la bande B, le quenching est plus important par rapport à la bande AG, cela est dû probablement au fait que les chloroplastes intacts ont des doubles membranes qui limitent un peu l'effet du DBMIB, comparativement aux thylakoïdes qui sont dans le liquide et donc facile d'accès.

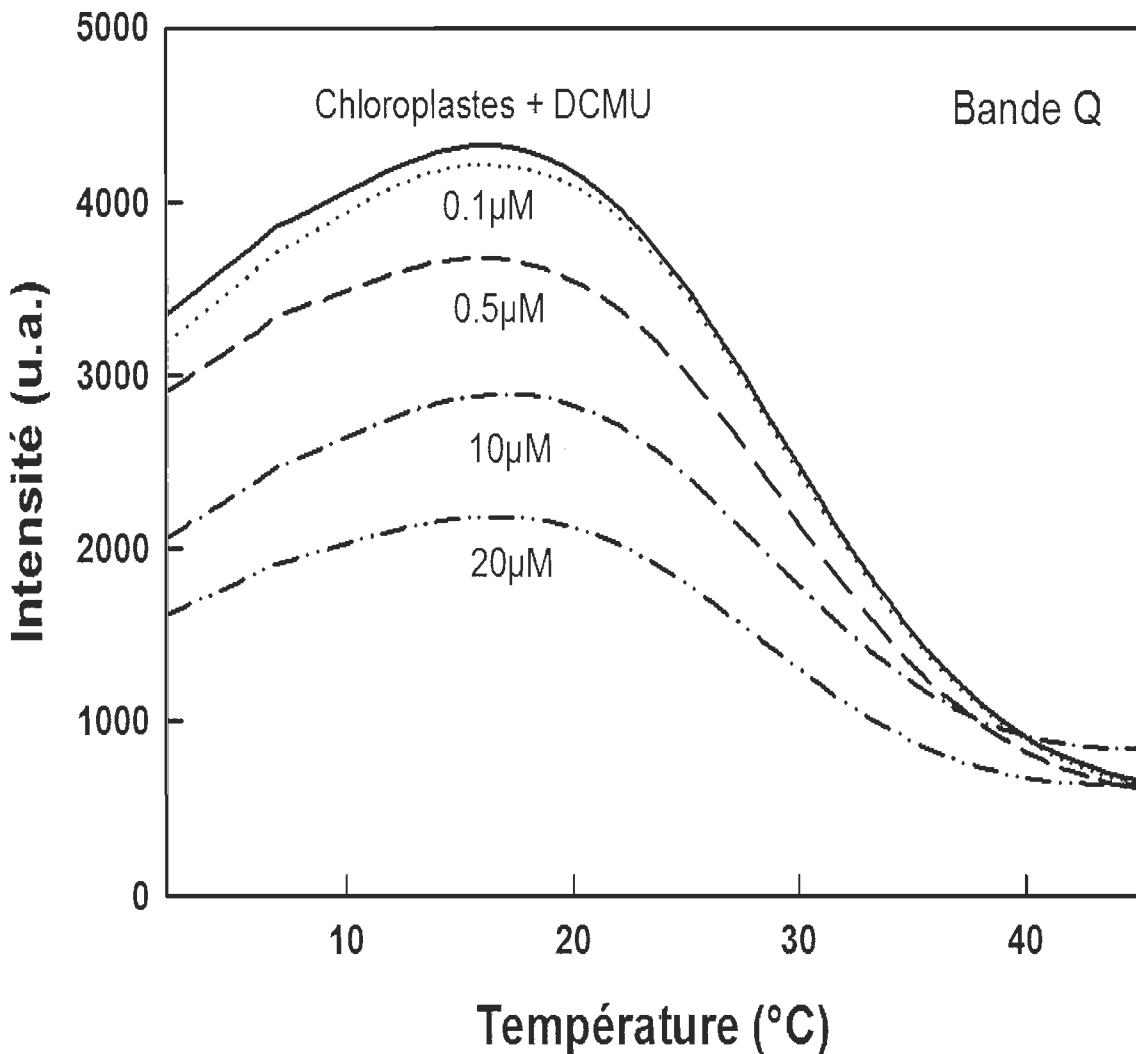


Figure 5.7 : Évolution de la bande Q présente dans les chloroplastes intacts en absence (chloroplastes + DCMU) et en présence de 0.1, 0.5, 10 et 20 μM de DBMIB.

5.2.3.1 La constante de Stern-Volmer pour la bande Q de thermoluminescence

La figure 5.8 montre la courbe de variation du rapport d'intensité de fluorescence en fonction de la concentration en DBMIB pour la bande Q. La courbe de tendance dans l'intervalle de concentration étudié (0.1 au 20 μM) est linéaire avec un coefficient de corrélation de 0.98. La pente a donné une valeur de K_{SV} de $4,41 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ pour la bande Q, inférieure à celle des bandes AG et B des chloroplastes intacts ($K_{\text{SV}} = 1,03 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$)

et de la bande B dans les thylakoides ($K_{SV} = 1,54 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$). Ce résultat obtenu est en accord avec l'hypothèse qu'on a supposée auparavant, que le DBMIB quench plus la bande B que la bande AG, et par ce fait, on confirme qu'effectivement la constante de Stern-Volmer de la bande B est un peu supérieure à celle de la bande AG. La différence du degré de quenching du DBMIB montre une restriction différente dans différents endroits de l'appareil photosynthétique.

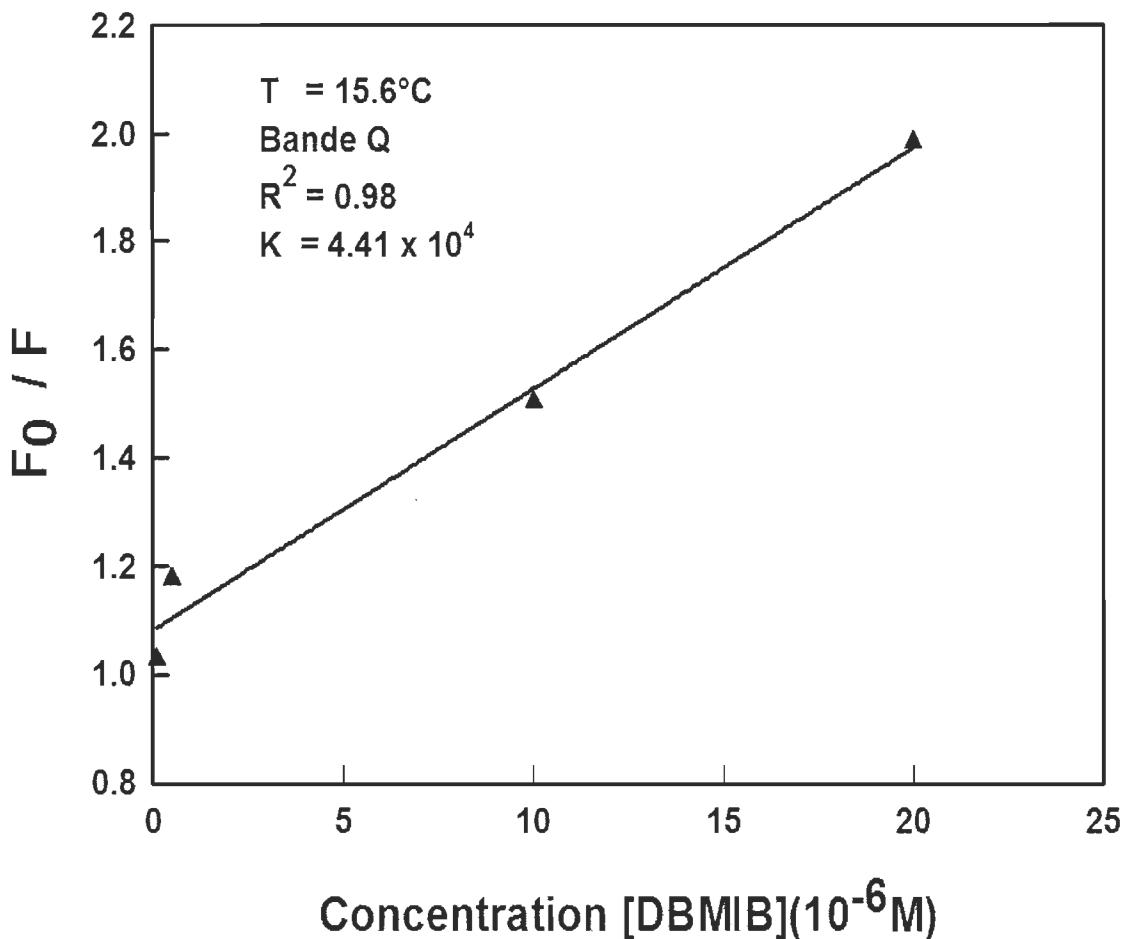


Figure 5.8 : Variation du rapport d'intensité de fluorescence en fonction de la concentration en DBMIB dans des chloroplastes intacts traités avec DCMU (bande Q).

5.2.4 Effet du DBMIB sur les chloroplastes intacts par fluorescence

L'effet de la quinone DBMIB sur les propriétés photochimiques des membranes photosynthétiques a été étudié dans des membranes isolées de chloroplastes intacts. La figure 5.9 montre le spectre de fluorescence mesuré à la température ambiante chez les chloroplastes intacts en l'absence et en présence de différentes concentrations (0,1 à 20 µM) de DBMIB à une longueur d'onde d'excitation de 436 nm. La courbe mesurée dans l'échantillon non traité a montré un pic maximal à 689 nm avec un épaulement à 725 nm, caractéristique d'émission de fluorescence pour ce type de matériels (Rajagopal et al. 2003).

La variation relative de l'intensité de fluorescence mesurée au maximum de chaque bande vibronique est la même. L'inhibition est d'autant plus forte que la concentration en DBMIB augmente, les chloroplastes intacts sont efficaces pour éteindre cette fluorescence. On observe qu'à forte concentration en DBMIB toutes les courbes tendent vers une valeur résiduelle très faible du rapport F/F_0 . Les spectres d'excitation de fluorescence sont identiques lorsque l'on observe la fluorescence du côté des faibles longueurs d'onde (689 nm) ou du côté d'épaulement (725 nm) du spectre d'émission, aucun déplacement du spectre d'excitation n'est observé. Néanmoins, aux très fortes concentrations en DBMIB, la fluorescence totale du complexe devient pratiquement nulle.

La fluorescence des chloroplastes intacts décroît linéairement avec la température. Cette décroissance du rendement quantique de fluorescence en fonction de la température est attribuée à une augmentation de la constante de désactivation non radiative. La valeur élevée de la constante de Stem-Volmer confirme bien que le DBMIB est un très bon quencheur de fluorescence au niveau des bandes B et AG.

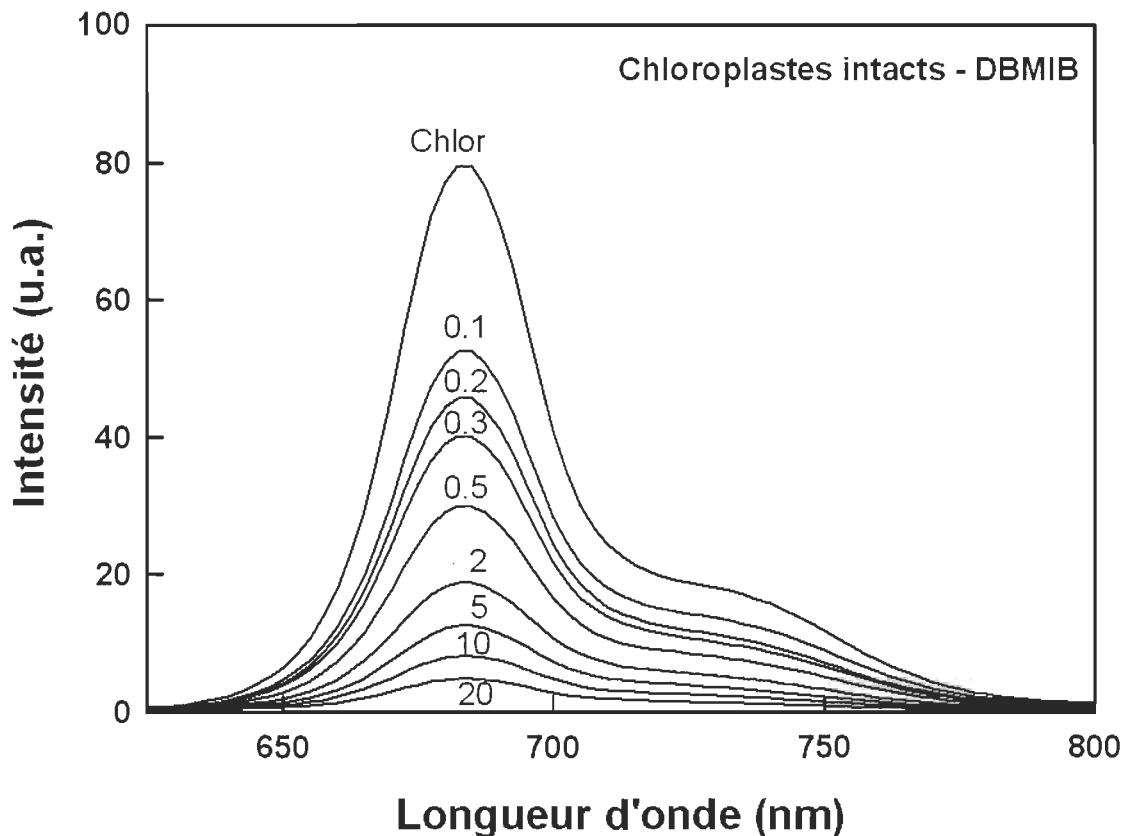


Figure 5.9 : Spectres d'émission de fluorescence mesurée dans des chloroplastes intacts en l'absence d'additif (Chlor) ou en présence de 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 2, 5, 10 et 20 μM de DBMIB.

5.2.4.1 La constante de Stern-Volmer pour la fluorescence

La figure 5.10 montre la courbe de variation du rapport d'intensité de fluorescence en fonction de la concentration en DBMIB à température ambiante. La courbe de tendance dans l'intervalle de concentration étudiée (0.1 à 20 μM) est linéaire avec un coefficient de corrélation de 0.99. La pente a donné une valeur de K_{SV} de $7.38 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ pour les chloroplastes intacts. Comparativement à une valeur de la constante de Stern-Volmer de $1.03 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ avec thermoluminescence pour le même matériel (bandes AG et B), on constate une augmentation avec la fluorescence à température ambiante. Cela s'explique par la différence de température. Pour la thermoluminescence on a calculé K_{SV} à 41.4 °C, par contre, pour la fluorescence, c'était à température de la pièce.

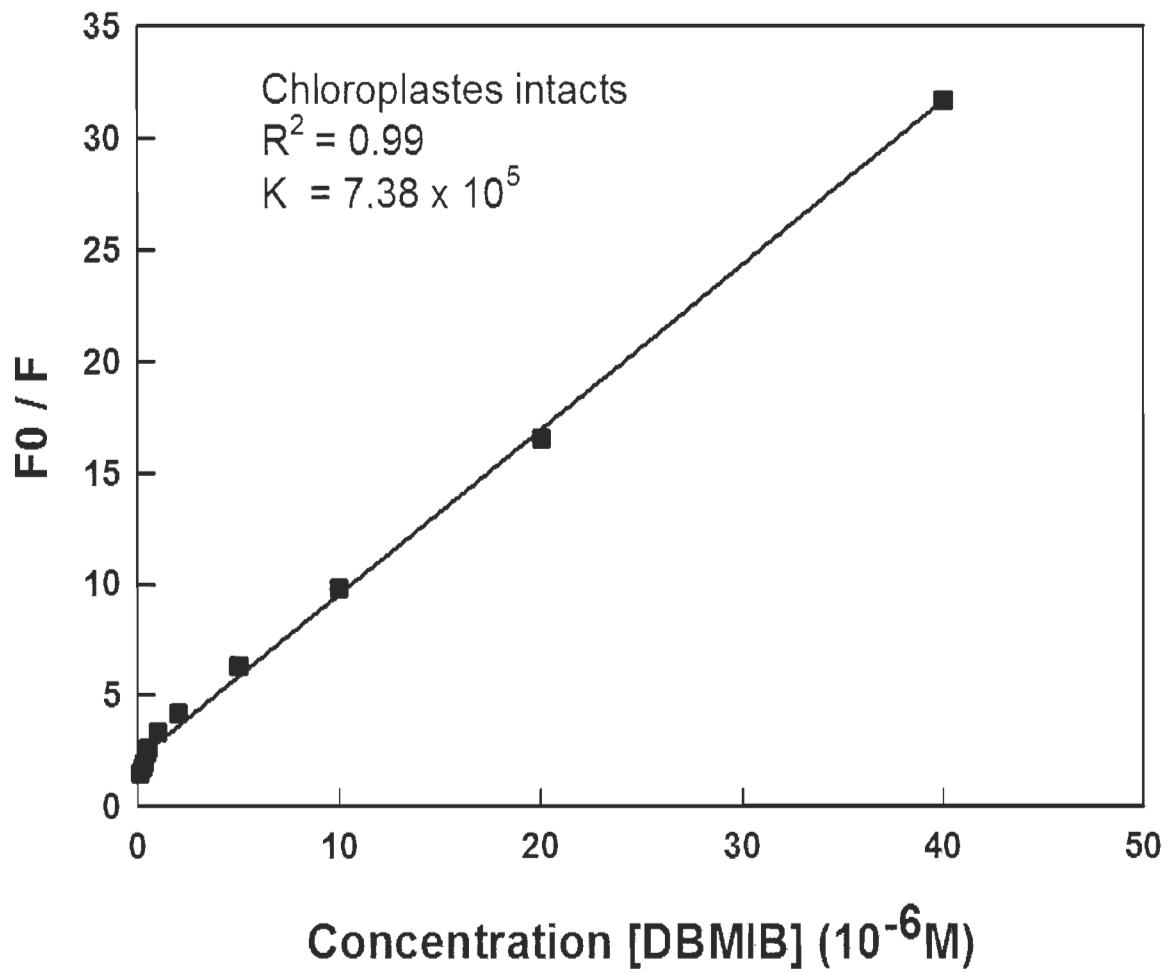


Figure 5.10 : Variation du rapport d'intensité de fluorescence en fonction de la concentration en DBMIB dans des chloroplastes intacts par fluorescence.

CHAPITRE VI

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

6.1 Conclusion

L'objectif général de ce mémoire portait sur l'étude de la thermoluminescence comme principal outil d'investigation des mécanismes de transfert d'électrons dans des chloroplastes intacts. Puisque la thermoluminescence donne des indications sur le fonctionnement de l'appareil photosynthétique, cette méthode peut être utilisée comme indicateur de l'état physiologique de l'organisme végétal. Notre travail contribue à l'avancement des connaissances en abordant: les mécanismes du transport cyclique d'électrons photosynthétiques à travers la bande AG de thermoluminescence et les effets du DBMIB sur les aspects fonctionnels du PSII dans des chloroplastes intacts et des thylakoïdes.

Tout d'abord, nos résultats ont permis l'interprétation des mécanismes du transport des électrons photosynthétiques grâce à l'analyse du changement des composantes du photosystème II et du rendement de la cinétique rapide de la fluorescence chlorophyllienne. Sur la base de l'analyse de la cinétique rapide de fluorescence, caractérisée par les transitions O-J-I-P, nous avons conclu que le facteur sigmoïdal de la phase IP (S_{I-P}) dépend linéairement du degré d'intégrité des chloroplastes. En effet, l'apparition de l'étape I dans les chloroplastes intacts et les feuilles est régie par la cinétique de réduction / oxydation du pool du PQ. La présence d'une étape distincte I est associée à la nature sigmoïdale de la phase IP (Joly et Carpentier, 2007; Joly et al. 2010). En revanche, dans les membranes isolées des thylakoïdes, la phase IP ne contient pas de sigmoidicité. La phase IP est principalement liée à la photoréduction du pool de plastoquinone par le PSII. Ce processus de réduction suit une cinétique de premier ordre dans les thylakoïdes isolés. Il en résulte une augmentation exponentielle ou non-

sigmoïdale de la phase IP avec $S_{I-P} = 1$, à la différence des chloroplastes intacts et des feuilles qui sont régies par une cinétique d'ordre supérieur avec un $S_{I-P} \gg 1$.

Par ailleurs, il a été possible d'effectuer des expériences sur le rendement d'intégrité des chloroplastes, cela s'est traduit par une augmentation de 10 % du rendement (de 70 à 80 %). Le fait de travailler avec des chloroplastes intacts nous a permis une approche *in vitro* la plus proche d'une étude *in vivo*, car les chloroplastes intacts préservent leur contenu en NADP(H) et ferrédoxine nécessaire au transport cyclique d'électrons et à la génération de la bande AG.

D'autre part, nos mesures de thermoluminescence nous ont montrés et confirmé pour la première fois la présence de la bande AG dans des chloroplastes intacts. Chose qui était théoriquement attendue, mais jamais confirmée par aucune étude expérimentale. La bande AG dans des chloroplastes intacts présente les mêmes caractéristiques que celles chez les feuilles, origine de la recombinaison des charges S_2Q_B et S_3Q_B (Ducruet et al. 2005) avec une température maximale de 42 °C (entre 40 et 50 °C) (Ducruet et al. 2003), stimulation par une lumière rouge lointaine, période d'oscillation de quatre et par son inhibition avec l'antimicyne A (Ducruet et al. 2005; Vass et al. 1981). Ceci nous permet de conclure que la voie la plus prédominante du transport cyclique d'électrons dans les épinards est la voie ferrédoxine quinone oxydoréductase (FQR).

De plus, nous avons utilisé la méthode de PAM pour évaluer l'effet du méthyle viologène (MV) et du DCMU sur l'activité photosynthétique dans des chloroplastes intacts. Les résultats obtenus ont permis la détermination de la sensibilité des paramètres photosynthétiques au changement d'absorbance à 820 nm lorsque les chloroplastes ont été exposés au MV et au DCMU. L'effet de ces derniers sur la photosynthèse indique qu'ils ont induit une inhibition de la réduction de la ferrédoxine (Fd) et du flux linéaire d'électron entre le PSII et le PSI au niveau du site Q_B respectivement. Grâce à la cinétique modulée, nous avons trouvé que l'effet de DCMU et MV provoque une diminution du niveau maximal de la photooxydation du PSI au fur et à mesure que le degré d'intégrité des chloroplastes augmente. Afin de mieux comprendre l'importance du

NADP⁺ et ferrédoxine-quinone oxydoréductase (FQR) dans les voies de transport cyclique d'électrons par la cinétique de re-réduction du P700 oxydé (P700⁺) après la fermeture de la lumière rouge lointaine, la décroissance a été décomposée en trois exponentielles : la phase rapide a été attribuée à la réduction du P700⁺ par les électrons du PSII accumulés dans le pool du PQ (Havaux et al. 2005; Ducruet et al. 2011); les phases moyenne et lente ont été affectées à la réduction du P700⁺ par les voies de transport cyclique des électrons, FQR et NAD (P) déshydrogénase H (NDH) respectivement (Klughammer et Schreiber, 1998; Joliot et Joliot, 2006). Après traitement avec DCMU et MV, seule une phase lente mono-exponentielle du P700⁺ a été observée. Les phases rapide et moyenne ont été supprimées par le DCMU et MV, respectivement. Cela explique pourquoi une augmentation de la photooxydation du P700 a été observée en présence de DCMU et MV.

Dans cette étude, nous avons aussi estimé la proportion des centres réactionnels du PSII participant au transport d'électrons par le quenching photochimique de la fluorescence (q_p). Lorsque les membranes photosynthétiques des chloroplastes intacts et des thylakoïdes ont été exposées au dibromothymoquinone DBMIB, la recombinaison des charges dans le PSII a été différente d'une bande de thermoluminescence à une autre. En absence de DBMIB, la recombinaison des charges donne un maximum d'intensité pour les trois bandes (Q, B et AG). Cependant, quand les membranes photosynthétiques ont été exposées à 10 µM de DBMIB, l'activité photochimique du PSII a diminué considérablement pour la bande B suivie de la bande AG puis de la bande Q. L'effet inhibiteur du DBMIB sur le site Qo et cyt b6f ainsi que le quenching de fluorescence au niveau du PSI et PSII est déjà connu. Dans notre travail, on a confirmé que le DBMIB quench la fluorescence au niveau des sites Q_A et Q_B. De ce fait, l'utilisation du DBMIB comme inhibiteur d'électron au niveau du site Q0 même à des faibles concentrations peut être mal interprétée.

6.2 Perspectives

L'utilisation des chloroplastes intacts représente un aspect innovateur dans l'étude de transfert d'électrons. Dans cette perspective, une étude plus poussée dans la caractérisation des mécanismes de transfert cyclique d'électrons par l'utilisation des chloroplastes intacts isolés d'épinard ainsi que ceux du mutant d'*Arabidopsis thaliana* (*pgr5*) déficient en activité cyclique Fd-dépendante, ainsi que l'influence de stress lumineux et thermique sur ces derniers, pourra conduire à des résultats originaux et innovateurs permettant ainsi de comprendre les mécanismes de transfert cyclique d'électrons dans l'appareil photosynthétique.

BIBLIOGRAPHIE

- Baltscheffsky, H.** (1974) "A new hypothesis for the evolution of biological electron transport, *Origins of Life*. 5: 387-395.
- Barber, J.** (1983) "Properties and organisation of photosynthetic pigments. *Symposia of the Society for Experimental Biology*. 36: 19-52.
- Barber, J., Kuhlbrandt, W.** (1999) "Photosystem II". *Current Opinion in Structural Biology*. 9: 469-475.
- Barber, J.** (2006) "Photosystem II: an enzyme of global significance", *Biochem. Soc. Trans.* 34:619-631.
- Bassi, R., Denaise, P.** (1992) "A supramolecular light-harvesting complex from chloroplast photosystem-II membranes", *European Journal of Biochemistry*. 204: 317-326.
- Bassi, R. D., Sandona., Croce, R.** (1997) "Novel aspect of chlorophyll alb binding proteins". *Physiologia Plantarum*. 100: 769-779.
- Ben-Shem, A., Frolow, F., Nelson, N.** (2003) "The crystal structure of plant Photosystem I", *Nature*. 426: 630-635.
- Bertch, W. F., Azzi, J. R.** (1965) "A relative maximum in the decay of long-term delayed light emission from the photosynthetic apparatus". *Biochim. Biophys. Acta*. 94: 15-26.
- Björn, L. O.** (1971) "Far-red induced, long-live afterglow from photosynthetic cells. Size of afterglow unit and paths of energy accumulation and dissipation". *Photochemistry and Photobiology*. 13: 5-20.
- Blankenship, R. E.** (2002) "Molecular mechanisms of Photosynthesis". Oxford: Blackwell Science Ltd., pp. 328.
- Block, M. A., Maréchal, E., Joyard, J.** (2001) "Role of the plastid envelope in the biogenesis of chloroplast lipids". Chap. 11 In: Aro E.M., Andersson B. Eds., Regulation of photosynthesis. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp 195-218.

- Boisvert**, S., Joly, D., Carpentier, R. (2006) "Quantitative analysis of the experimental O–J–I–P chlorophyll fluorescence induction kinetic apparent activation energy and origin of each kinetic step", *FEBS J.* 273: 4770–4777.
- Bondarava**, N., Beyer, P., Krieger-Liszka, 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.
- Buchanan**, B. B., Grussem, W., Jones, R. L. (2000) "Biochemistry & molecular biology of plants", American Society of Plant Physiologists. Rockville: Maryland.
- Bukhov**, N., Govindachary, S., Egorovaa, E. A., Carpentier, R. (2003) "Interaction of exogenous quinones with membranes of higher plant chloroplasts: modulation of quinone capacities as photochemical and non-photochemical quenchers of energy in Photosystem II during light–dark transitions". *Biochimica et Biophysica Acta.* 1604: 115–123.
- Bukhov**, N., Govindachary, S., Rajagopal, S., Joly, D., Carpentier, R. (2004) "Enhanced rates of P₇₀₀⁺ dark-reduction in leaves of *Cucumis sativus* L. photoinhibited at chilling temperature". *Planta.* 218: 852-861.
- Chapman**, D. J., Vass, I., Barber, J. (1991) "Secondary electron transfer reactions of the isolated Photosystem II reaction centre after reconstitution with plastoquinone-9 and diacylglycerolipids", *Biochim Biophys Acta.* 1057: 391-398.
- Dau**, H., Zahariava, I. (2009) "Principles, efficiency and blueprint character of solar energy conversion in photosynthetic water oxidation", *Acc. Chem. Res.* 42: 1861-1870.
- De Groot**, B. G., Van Gorkom, H. J. (1981) "External electric field effects on prompt and delayed fluorescence in chloroplasts", *Biochim. Biophys. Acta.* 635: 445–456.
- Dekker**, J. P., Plijter, J. J., Ouwehand, L., Van Gorkom, H. J. (1984) "Kinetics of manganese redox transitions in the oxygen-evolving apparatus of photosynthesis", *Biochim. Biophys. Acta.* 767: 176-179.
- Dekker**, J. P., Van Grondelle, R. (2000) "Primary charge separation in photosystem II", *Photosynth. Res.* 63:195-208.

Demmig-Adams, B., Adams, W. (1996) "The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis". Trends in Plant Science.1: 21-26.

Demeter, S., Rozsa, Z., Vass, I., Hideg, É. (1985) "Thermoluminescence study of charge recombination in Photosystem II at low temperatures. II. Oscillatory properties of the Zv and A thermoluminescence bands in chloroplasts dark-adapted for various time periods", Biochim Biophys Acta. 809: 379-387.

Demeter, S., Vass, I. (1984)"Charge accumulation and recombination in Photosystem II studied by thermoluminescence. I. Participation of the primary acceptor Q and secondary acceptor B in the generation of thermoluminescence of chloroplasts", BBA - Bioenergetics. 764: 24-32.

Demeter, S., Goussias, C., Bern, St. G., Kovics, L., Petrouleas, V. (1993) "Participation of the g=1.9 and g=1.82 EPR forms of the semiquinone-iron complex, Q~Fe²⁺ of Photosystem II in the generation of the Q and C thermoluminescence bands, respectively", FEBS Lett. 336: 352-356.

Desai, T. S., Rane, S. S., Tatake, G. V. G., Sane, P. V. (1983) "Identification of far-red-induced relative increase in the decay of delayed light emission from photosynthetic membranes with thermoluminescence peak V appearing at 321 K", Biochim. Biophys. Acta. 724: 485-489.

DeVault, D., Govindjee., Arnold, W. A. (1983) "Energetics of photosynthetic glow peaks, Proc", Natl. Acad. Sci. USA. 80: 983-987.

DeVault, D., Govindjee. (1990) "Photosynthetic glow peaks and their relationship with the free energy changes", Photosyn. Res. 24: 175-181.

Dhingra, A., Portis, A. R., Daniell, H. (2004) "Enhanced translation of a chloroplast-expressed RbcS gene restores small subunit levels and photosynthesis in nuclear RbcS antisense plants", Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101: 6315-6320.

Diner, B. A., Babcock, G. T. (1996) "Structure, Dynamics, and Energy Conversion Efficiency in Photosystem II, in: D.R. Ort, C.F. Yocum (Eds.), Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions", Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 213-247.

Douce, R., Joyard, J. (1977) Le chloroplaste, la recherché, Vol.8, juin 1977.

- Douce, R., Joyard, J.** (2000) "Le monde végétal : du génome à la plante", Rapport de l'académie des sciences sur la science et la technologie n° 10 « Tec et Doc », Lavoisier, Paris pp 220.
- Draber, W., Trebst, A., Harth, E.** (1970) "On a new inhibitor of photosynthetic electron-transport in isolated chloroplasts, Zeitschrift fur Naturforschung". Teil B: Chemie, Biochemie, Biophysik, Biologie. **25**: 1157-1159.
- 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., Roman, M., Ortega, J. M., Janda, T.** (2005a) "Role of the oxidized secondary acceptor Q_B of photosystem II in the delayed afterglow chlorophyll", Photosynth. Res. **84**: 161-166.
- Ducruet, J. M., Roman, M., Havaux, M., Janda, T., Gallais, A.** (2005b) "Cyclic electron flow around PSI monitored by afterglow luminescence in leaves of maize inbred lines (*Zea mayz* L.): correlation with chilling tolerance", Planta **221**: 567-579.
- Ducruet, J. M., Serrano, A., Roncel, M., Ortega, J. M.** (2011) "Peculiar properties of chlorophyll thermoluminescence emission of autotrophically or mixotrophically grown *Chlamydomonas reinhardtii*", J. Photochem. Photobiol. B. **104**: 301-307.
- Duysens, L. N. M., Sweers, H. E.** (1963) "Mechanism of the two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence". In Studies on microalgae and photosynthetic bacteria. Editors, L. N. M. Duysens et H. E. Sweers, p. 353-372. Japanese Society of Plant Physiologists. Tokyo: University of Tokyo Press.
- Faller, P., Debus, R. J., Brettel, K., Sugiura, M., Rutherford, A. W., Boussac, A.** (2001) "Rapid formation of the stable tyrosyl radical in photosystem II". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **98** : 14368-14373.
- Farineau, J. J., Morot-Gaudry, F.** (2006) "La photosynthèse. Processus physiques, moléculaires et physiologiques", INRA, Paris, 2006.
- Ferreira, K. N., Iverson, T. M., Maghlaoui, K., Barber, J., Iwata, S.** (2004) "Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center", Science. **303**: 1831-1838.

- Gauthier**, A., Carpentier, R. (2009) "Disorganization of the Mn₄Ca complex of photosystem II by ruthenium red: a thermoluminescence study", Luminescence, 24(2): 108-14.
- Gauthier**, A., Govindachary, S., Harnois, J., Carpentier, R. (2006) "Interaction of N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine with photosystem II as revealed by thermoluminescence: reduction of the higher oxidation states of the Mn cluster and displacement of plastoquinone from the QB niche". Biochim. Biophys. Acta. **1757**: 1547-1556.
- Gauthier**, A., Joly, D., Boisvert, S., Carpentier, R. (2010) "Period-four modulation of photosystem II primary quinone acceptor (Q_A) reduction/oxidation kinetics in thylakoid membranes". Photochem. Photobiol. **86**: 1064-1070.
- Govindachary**, S., Bigras, C., Harnois, J., Joly, D., Carpentier, R. (2007) "Changes in the mode of electron flow to photosystem I following chilling-induced photoinhibition in a C₃ plant, *Cucumis sativus L*". Photosynth. Res. **94**: 333-345.
- Govindjee**, R. (1995) Effects of substitution of tyrosine 57 with asparagine and phenylalanine on the properties of bacteriorhodopsin. Biochemistry. **34**: 4828-4838.
- Green**, B. R., Durnford, D. G. (1996) "The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis". Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. **47**: 685-714.
- 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.
- Havaux**, M. (1996) "Short-term responses of Photosystem I to heat stress. Induction of a PS II-independent electron transport through PS I fed by stromal components", Photosynthesis Research. **47**: 85-97.
- Havaux**, M., D. Rumeau and J. M. Ducruet (2005) "Probing the FQR and NDH activities in cyclic electron transport around photosystem I by the afterglow luminescence". Biochim. Biophys. Acta. **1709**: 203-213.

- Heller, R., Esnault, R., Lance, C.** (1998) "Physiologie végétale. 1 Nutrition". Paris: Dunod, pp. 323.
- Hodge, M., Moya, I.** (1987) "Modification of room-temperature picosecond chlorophyll fluorescence kinetics in Photosystem-II-enriched particles by photochemistry", BBA- Bioenergetics. 882: 42-47.
- Horton, P., Ruban, A. V., Walters, R. G.** (1996) "Regulation of light harvesting in green plants". Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 47: 655-684.
- Hideg, E., M. Kobayashi and H. Inaba** (1991) "The far red induced slow component of delayed light from chloroplasts is emitted from photosystem II". Photosynth. Res. 29: 107-112.
- Huber, S. C., Edwards, G. E.** (1975) "Effect of DBMIB, DCMU and antimycin A on cyclic and noncyclic electron flow in C₄ mesophyll chloroplasts", FEBS Letters. 58: 211-214.
- Ikeda, Y., Ohki, S., Koizumi, K., Tanaka, A., Watanabe, H., Kohno, H., Van Rensen, J.J., Boger, P., Wakabayashi, K.** (2003) "Binding site of novel 2-benzylamino-4-methyl-6trifluoromethyl-1,3,5-triazine herbicides in the DI protein of photosystem II". Photosynth. Res. 77: 35-43.
- Ida, G., Anemaet., Bekker, M., Klaas, J., Hellingwerf.** (2010) "Algal Photosynthesis as the Primary Driver for a Sustainable Development in Energy, Feed, and Food Production". Mar Biotechnol. 12: 619–629.
- Inoue, Y., Yamashita, T., Kobayashi, Y., Shibata, K.** (1977) Thermoluminescence changes during inactivation and reactivation of the oxygen-evolving system in isolated chloroplasts, FEBS Letters. 82: 303-306.
- Inoue, Y., Ivhikawa, T., Shibata, K.** (1976) Development of thermoluminescence bands during greening of wheat leaves under continuous and intermittent illumination, Photochemistry and Photobiology. 23: 125-130.
- Inoue, Y.** (1996) "Photosynthesis thermoluminescence as a simple probe of Photosystem II electron transport. In Biophysical Techniques in Photosynthesis", J. Amesz and A.J. Hoff, editors. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands.

- Inoue**, Y. (1996) "Photosynthetic thermoluminescence as simple probe of photosystem II electron transport" Biophysical Techniques in photosynthesis. PP 93-107. Kluwer Academic Publ., Dordrecht – Boston – London.
- Inoue**, Y., Yamashita, T., Kobayashi, Y., Shibata, K. (1977) "Thermoluminescence changes during inactivation and reactivation of the oxygen-evolving system in isolated chloroplasts", FEBS. 82: 303-306.
- Ishikita**, H. Hasagawa, K., Nogushi, T. (2011) "How does the QB site influence propagate to the QA site in photosystem II?" Biochemistry. 50: 5436-5442.
- Jahns**, P., Depka, B., Trebst, A. (2000) "Xanthophyll cycle mutants from Chlamydomonas reinhardtii indicate a role for zeaxanthin in the DI protein turnover". Plant Physiology and Biochemistry. 38: 371-376.
- Jensen**, P. E., Bassi, R., Boekema, E., Dekker, P., Jansson, S., Leister, D., Robinson, C., Scheller, H. V. (2007). "Structure, function and regulation of plant photosystem 1". Biochim. Biophys. Acta. 1767: 335-352.
- Johnson**, G. N., Boussac, A., Rutherford, A. W. (1994) "The origin of the 40-50 °C thermoluminescence bands in Photosystem II", Biochim Biophys Acta. 1184: 85-92.
- Joliot**, P., Barbieri, G., Chabaud, R. (1969) "Un nouveau modèle des centres photochimiques du Système II", Photochem. Photobiol., 10, 309-329.
- Joliot**, P., Joliot, A. (2006) "Cyclic electron flow in C3 plants", Biochim. Biophys. Acta. 1757: 362-368.
- Joly**, D., Carpentier, R. (2011) "Rapid isolation of intact chloroplasts from spinach leaves", In: Carpentier R (ed) Photosynthesis Research Protocols. Springer, New York. 321-325.
- Joly**, D., Bigras, C., Harnois, J., Govindachary, S., Carpentier, R. (2005) "Kinetic analyses of the OJIP chlorophyll fluorescence rise in thylakoid membranes", Photosynth. Res. 84: 107–112.
- Joly**, D., Carpentier, R. (2007a) "The oxidation/reduction kinetics of the plastoquinone pool controls the appearance of the I-peak in the O-J-I-P chlorophyll fluorescence rise: Effects of various electron acceptors". J. Photochem. Photobiol. B. 88: 43-50.

- Joly**, D., Carpentier, R. (2009) "Sigmoidal reduction kinetics of the photosystem II acceptor side en intact photosynthetic during fluorescence induction", Photochem. Photobiol. Sci. **8**: 167-173.
- Joly**, D., Jemâa, E., Carpentier, R. (2010) "Redox state of the photosynthetic electron transport chain in wild-type and mutant leaves of *Arabidopsis thaliana*: Impact on photosystem II fluorescence", J. Photochem. Photobiol. B. **98**: 180-187.
- Joly**, D. (2007b) "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-A resolution", Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **100**: 98-103.
- Kautsky**, H., Hirsch, A. (1931) "Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation", Die Naturwissenschaften. **19**: 964.
- Kawakami**, K., Y. Umena, N. Kamiya and J.-R. Shen (2011) "Structure of the catalytic, inorganic core of oxygen-evolving photosystem II at 1.9Å resolution". J. Photochem. Photobiol. B. **104**: 9-18.
- Keuper**, H. G. K., Sauer, K. (1989) "Effect of photosystem II reaction center closure on nanosecond fluorescence relaxation", Photosynthesis Research, **20**:85-103.
- Kingston-Smith**, A. H., Foyer, C. H. (2000) "Bundle sheet proteins are more sensitive to oxidative damage than those of the mesophyll in maize leaves exposed to paraquat or low temperatures". J. Exp. Bot. **51**: 123-130.
- Kok**, B., Forbush, B., McGloin, M. (1970) "cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution. I. A linear four-step mechanism", Photochem. Photobiol. **11**: 457-475.
- Koike**, H., Siderer, Y., Ono, T. A., Inoue, Y. (1986) "Assignment of thermoluminescence A band to S3Q A charge recombination: sequential stabilization of \$3 and QA by a two-step illumination at different temperatures", Biochim Biophys Acta. **850**: 80-89.

- Klughammer**, C. and U. Schreiber (1998) "Measuring P700 absorbance changes in the near infrared spectral region with a dual wavelength pulse modulation system. In: Garab G (ed) Photosynthesis: Mechanisms and Effects". Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. V: 4357–4360.
- Kramer**, D. M., Roffey, R. A., Govindjee., Sayre, R. T. (1994) "The AT thermoluminescence band from Chlamydomonas reinhardtii and the effects of mutagenesis of histidine residues on the donor side of the Photosystem II D1 polypeptide", *Biochim Biophys Acta*. 1185: 228-237.
- Krause**, G. H., Weis, E. (1991) "Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology". 42: 313-349.
- Krause**, G., Jahns P. (2003) "Pulse amplitude modulated chlorophyll fluorometry and its application in plant science". In Advances in Photosynthesis and respiration: Lightharvesting antennas in Photosynthesis. Editors, B. V. Green and W. W. Parson. The Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 373-399.
- Krieger**, A., S. Bolte, K. J. Dietz and J. M. Ducruet (1998) "Thermoluminescence studies on the facultative crassulacean-acid-metabolism plant Mesembryanthemum crystallinum L". *Planta*. 205, 587-594.
- Kuhlbrandt**, W. (1994) "Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography". *Nature*. 367: 614-621.
- Lakowicz**, J. R. (1993) "Principles of fluorescence spectroscopy", Plenum Press: New York. Chapter 9.
- Lazar**, D. (1999) "Chlorophyll a fluorescence induction". *Biochim. Biophys. Acta*. 1412: 1-28.
- Lazar**, D. (2006) "The polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light". *Funct. Plant Biol.* 33: 9-30.
- Lawlor**, D. (1993). "Photosynthesis : Molecular, physiological, and environmental processes", Longman Scientific and Technical. Harlow.
- Liu**, Z., Yan, K., 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.

- 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.
- Loschen**, G., Azzi, A. (1974) "Dibromothymoquinone: a new inhibitor of mitochondrial electron transport at the level of ubiquinone". *FEBS Letters*. 41: 115-117.
- 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.
- McKeever**, S. W. S., Mische, M., Summers, Geoffrey, P. (1988) "Track interaction in gamma- and charged-particle-irradiated thermoluminescence dosimeters", *IEEE Transactions on Nuclear Science*. 35: 1248-1254.
- Malkin**, R., Niyogi, K. (2001) "Photosynthesis". In *Biochemistry & molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville: Maryland, 568-628.
- Marcus**, R. A., Sutin, N. (1985). "Electron transfers in chemistry and biology", *Biochimica et Biophysica Acta. Reviews on Bioenergetics*. 811: 265-322.
- Minagawa**, J., Takahashi, Y. (2004) "Structure, function and assembly of Photosystem II and its light-harvesting proteins", *Photosynthesis research* 82: 241-263.
- Miranda**, T., Ducruet, J. M. (1995) "Characterization of the chlorophyll thermoluminescence afterglow in dark-adapted or far-red-illuminated plant leaves", *Plant Physiology and Biochemistry*. 33: 689–699.
- Moronsito**, T., Caffari, S., Dall'Osto, L., Bassi, R. (2003) "Mechanistic aspect of the xanthophyll dynamics in higher plant thylakoids", *Physiologia Plantarum*. 119: 347-354.
- Moya**, I., Hodges, M., Barbet, J. C. (1986) "Modification of room-temperature picosecond chlorophyll fluorescence kinetics in green algae by photosystem II trap closure", *FEBES*. 198: 2.

- Moya, I., Hodges, M., Briantais, J. M., Hervo, G.** (1982) "Evidence that the variable chlorophyll fluorescence in *Chlamydomonas reinhardtii* is not recombination luminescence", *Photosynthesis Research*.10: 319-325.
- Müller, P., Li, X. P., Niyogi, K. K.** (2001) "Non-photochemical quenching. A response to excess light energy". *Plant Physiology*. 125: 1558-1566.
- Nakamoto, H., Sundblad, L. G., Gardeström, P., Sundbom, E.** (1988) "Far-red stimulated long-lived luminescence from barley protoplasts", *Plant Science*. 55: 1-7.
- Neubauer, C., Schreiber, U.** (1987) "The polyphasic rise of chlorophyll fluorescence upon onset of strong continuous illumination: I. Saturation characteristics and partial control by the photosystem II acceptor side". *Zeitschrift für Naturforschung*. 42: 1246-1254.
- Nellaepalli, S., Mekala, N. R., Zsiros, P., Mohanty, P., Subramanyam, R.** (2011) Moderate heat stress induces state transitions in *Arabidopsis thaliana*, *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. 1807: 1177-1184.
- Nelson, N.** (2011). "Photosystems and global effects of oxygenic photosynthesis", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 1807: 856-863.
- Niyogi, K. K., Bjorkman, O., Grossman, A. R.** (1997) "The roles of specific xanthophylls in photoprotection". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 94: 14162-14167.
- Niyogi, K. K.** (2000) "Safety valves for photosynthesis". *Current opinions in Plant Biolog*. 3: 455-460.
- Niyogi, K. K., Li, X. P., Rosenburg, V., Jung, H. S.** (2005) "Is PsbS the site of nonphotochemical quenching in photosynthesis?". *Journal of Experimental Botany*. 56: 375-382.
- Ono, T., Inoue, Y.** (1991) "Biochemical evidence for histidine oxidation in Photosystem II depleted of the Mn-cluster for O₂- evolution", *FEBS Lett*. 278: 183-186.
- Palmqvist, K., Sundblad, L. G., Samuelsson, G., Sundbom.** (1986) A correlation between changes in luminescence decay kinetics and the appearance of a CO₂-accumulating mechanism in *Scenedesmus obliquus*, *Photosynthesis Research*. 10: 113-123.

Papageorgiou, G. (1975) "Chlorophyll fluorescence: an intrinsic probe of photosynthesis". In Bioenergetics of photosynthesis. Editor, Govindjee. New York: Academic Press. 319-372.

Papageorgiou, G., Govindjee. (2004) "Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis", advances in photosynthesis and respiration. Springer, Dordrecht.

Pfundel. E. (1998) "Estimating the contribution of PSI to total leaf chlorophyll fluorescence". Photosynth. Res. 56: 185-195.

Poulson, M., Samson, G., Whitmarsh, I. (1995) "Evidence that cytochrome b559 protects photosystem II against photoinhibition", Biochemistry. 34: 10932-10938.

Porra, R. J., W. A. Thompson and P. E. Kriedemann (1989) "Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophyll 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.

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., 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.

Raines, C. (2003) "The Calvin cycle revisited", Photosynth. Res., vol. 75, p. 1-10.

Rajagopal, S., Egorova, E. A., Bukhov, N. G., Carpentier, R. (2003) "Quenching of excited states of chlorophyll molecules in submembrane fractions of photosystem I by exogenous quinones". Biochim. Biophys. Acta. 1606: 147-152.

Rappaport, F., Cuni, A., Xiong, L., Sayre, R., Lavergne, J. (2005) "Charge Recombination and Thermoluminescence in Photosystem II", Biophys J BioFAS. 88: 1948-1958.

- Rappaport, F.**, Dinner, B. A. (2008) "Primary photochemistry and energetics leading to the oxidation of the Mn₄Ca cluster and to the evolution of molecular oxygen in photosystem II", *Coord. Chem. Rev.* 252: 259-272.
- Renger, G.** (2001) "Photosynthetic water oxidation to molecular oxygen: apparatus and mechanism", *Biochim. Biophys. Acta* 1503: 210-228.
- Renger, G.** (2007) "Oxidative photosynthetic water splitting: energetics, kinetics and mechanism", *Photosynth Res.* 92: 407-425.
- Renger, G.** (2011) "Light induced oxidative water splitting in photosynthesis: Energetics, kinetics and mechanism", *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 104: 35-43.
- Rich, P. R.**, Madgwick, S. A., Brown, S., Von Jagow G and Brandt, U. (1992) " MOA-stilbene: A new tool for investigation of the reactions of the chloroplast cytochrome bf complex", *Photosynth. Res.* 34 : 465-477.
- Ricoud, A.** (1997) « Photopiles solaires » 1^{ère} éd., Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne Suisse. pp XII.
- Roberts, A. G.**, Bowman, M. K., Kramer, D. M. (2004) "The Inhibitor DBMIB Provides Insight into the Functional Architecture of the Qo Site in the Cytochrome b6f Complex". *Biochemistry*. 43: 7707-7716.
- Roose, J. L.**, Wegener, K. M., Pakrasi, H. B. (2007) "The extrinsic proteins of Photosystem II", *Photosynth. Res.* 92: 369-387.
- Rozsa, Z.**, Demeter, S. (1982) "Effect of inactivation of the oxygen evolving system on the thermoluminescence of isolated chloroplasts", *Photochem. Photobiol.* 36: 705-708.
- Rubin, A. D.**, Venediktov, P. S. (1969) "Storage of the light energy by photosynthesizing organisms at low temperature", *Biofizika*. 14: 107-113.
- Ruban, A. V.**, Horton, P. (1995) "Regulation of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in plants", *Aust. J. Plant Physiol.* 22: 221-230.
- Rutherford, A. W.** Crofts, A. R., Inoue, Y. (1982) "Thermoluminescence as a probe of Photosystem II photochemistry. The origin of the flash-induced glow peaks", *BBA Bioenergetics*. 682: 457-465.

- Sane, P. V.** (2004) Thermoluminescence: a Technique for Probing Photosystem II, in: R. Carpentier (Ed.), Photosynthesis Research Protocols, Humana Press. Totova, New Jersey, USA. 229-248.
- Sane, P.** V., Rutherford AW (1986) Thermoluminescence from photosynthetic membranes. In: Govindjee, Ames J. and Fork DC (eds) Light Emission by Plants and Bacteria, Academic Press, Orlando, FL. 291–329.
- Sauer, K.**, Debreczeny, M. (1996) "Biophysical techniques in Photosynthesis", J. Ames et A. J. Hoff (eds.). 41-61.
- Sauer, K.**, Yachandra, V. K. (2004) "The water-oxidation complex in photosynthesis", Biochim. Biophys. Acta. 1655: 140-148.
- Scheller, H. V.**, Jensen, P. E., Haldrup, A., Lunde, C., Knoetzel, J. (2001) "Role os subunits in eukaryotic photosystem I", Biochim. Biophys. Acta. 1507: 41-60.
- Schuber, W. D.**, Kulkas, O., Saenger, W., Witt, H. T., Fromme, P., Krauû, N. (1998). "A common ancestor for oxygenic and anoxygenic photosynthetic systems: A comparison based on the structural model of photosystem I", Journal of molecular biology. 280: 297-314.
- Schreiber, U.** (2002) Assesment of maximal fluorescence yield : Donor-side dependent quenching and QB-Quenching, Plant Spectrfluorometry: Applications and Basic Research, Kooten, O. V., Snel, J. F. H., éditeurs, Rozenberg, Amesterdam, pp 23-47.
- Schatz, G. H.**, Brock, H., Holzwrth, A. R. (1988) "Kinetic and energetic model for the primary processes in photosystem II", Biophysical Journal., 54: 397-405.
- Sersen, F.**, Kralova K. (2001) "New facts about CdCh action on the photosynthetic apparatus ofspinach chloroplasts and its comparison with HgCh action". Photosynthetica. 39: 575-580.
- Sonoike, K.**, Koike, H., Enami, I., Inoue, Y. (1991) "The emission spectra of thermoluminescence from photosynthetic apparatus", Biochim Biophys Acta. 1058: 121-130.
- Sproviero, E. M.**, J. A. Gascon, J. P. McEvoy, G. W. Brudvig and V. S. Batista (2008) "Quantum mechanics/molecular mechanics study of the catalytic site of water splitting in photosystem II". J. Amer. Chem. Soc. 130: 3428-3442.

- Strasser**, R. J., Govindjee. (1991) "The Fo and O-J-I-P fluorescence rise in higher plants and algae". Dans Regulation of chloroplast biogenesis. Editor, J. H ArgyroudiAkoyunoglou, New York: Plenum Press. 423-426.
- Strasser**, R. J., Govindjee (1992) "On the O-J-I-P fluorescence transients in leaves and D1 mutants of Chlamydomonas reinhardtii", in: N. Murata (Ed.), Research in Photosynthesis, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 23-32.
- Strasser**, R. J., Srivastava, A., Govindjee. (1995) "Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria". Photochemistry and Photobiology. 61: 32-42.
- Strasser**, R. J. (1997) "Donor side capacity of photosystem II probed by chlorophyll a fluorescence transients". Photosynthesis Research. 52: 147-155.
- Strasser**, R. J., Stirbet, A. D. (2001) "Estimation of the energetic connectivity of PSU centers in plants using the fluorescence rise O-J-I-P fitting of experimental data to three different PSU models". Mathematics and Computers in Simulation. 56: 451-461.
- Stroch**, M., Spunda, V., Kurasova, I. (2004) "Non-radiative dissipation of absorbed excitation energy within photosynthetic apparatus of higher plants". Photosynthetica. 42: 323-337.
- 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.
- Summerfield**, T. C., Shand, J. A., Bentley, F. K., Eaton-Rye, J. J. (2005) "PsbQ (Sill638) in Synechocystis sp. PCC 6803 is required for photosystem II activity in specific mutants and in nutrient-limiting conditions", Biochemistry. 44: 805-815.
- Sun**, I. L., Crane, F. L. (1976) "Coordinated, coenzyme Q reversible, 2,5 dibromothymoquinone inhibition of electron transport and ATPase in Escherichia coli". Biochemical and Biophysical Research Communications. 68: 190-196.
- Sunbald**, L.-G., W. P. Schröder and H.-E. Åkerlund (1989) "S-state distribution and redox state of QA, in relation to luminescence decay kinetics". Biochim. Biophys. Acta. 973: 47-52.

- Townsend**, J. S., Kanazawa, A., Kramer, D. M. (1997) "Measurements of S₂QB-recombination by delayed thermoluminescence reveal heterogeneity in photosystem II energetics", *Phytochemistry*, vol 47 No 4, 641-649.
- Trebst**, A. (1970) "Inhibitors in the functional dissection of the photosynthetic electron transport system". *Photosynth. Res.* 92: 217–224.
- Trebst**, A., Reimer, S., Dallacker, F. (1976) "Properties of photoreductions by photosystem II". *Plant Science Letters*. 6: 21-24.
- Trissel**, H.W., Wilhem, C. (1993) "Why do you thylakoid membranes from higher plants form grana stacks?", *Trends Biochem. Sci.* 18: 415-419.
- Umena**, Y., Kawakami, K., Shen, J., Kamiya, N. (2011) "Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9A", *Nature*. 473: 55–60. DOI: doi:10.1038/nature09913.
- Valeur**, B. (2002) "Molecular fluorescence: “Principles and applications”". Wiley-VCH: Weinheim. Chapter 4.
- Van Gorkom**, H. J. (1985) Electron transfer in photosystem II, *Photosynthesis Research*. 6: 97-112.
- Vassiliev**, I. R., Antonkine M. L., Golbeck, J. H. (2001) Iron-sulfur clusters in type Ireaction centers. *Biochim. Biophys. Acta* **1507**, 139-160.
- Vass**, I., Horrath, G., Herczeg, T., Demeters. (1981) "Photosynthetic energy conversion investigated by thermoluminecence. Activation energies and half-lives of TL bands of chloroplasts determined by mathematical resolution of glow curve", *Biochim. Biophys. Acta*. 682: 496-499.
- Vass**, I., Inoue, Y. (1986) pH dependent stabilization of S₂Q_A⁻ and S₂Q_B⁻ charge pairs studied by thermoluminescence, *Photosynthesis Research*. 10: 431-436.
- Vass**, I., Chapman, D. J., Barber, J. (1989) "Thermoluminescence properties of the isolated photosystem two reaction centre", *Photosynth Res* 22:295-301.
- Vass**, I., Tso, J., Dismukes, G. C. (1990) "A new mechanism-based inhibitor of photosynthetic water oxidation: Acetone hydrazone. 2. Kinetic probes", *Biochemistry*. 29: 7767-7773.

- Vass**, I., Cook, K. M., Deak, Z., Mayes, S. R., Barber, J. (1992) "Thermoluminescence and flash-oxygen characterization of the IC2 deletion mutant of Synechocystis sp. PCC 6803 lacking the Photosystem II 33 kDa protein", *Biochim Biophys Acta*. 1102: 195- 201.
- Vass**, I., Govindjee. (1996) "Thermoluminescence from the photosynthetic apparatus" *Photosynth. Res.* **48**: 117-126.
- Vass**, I. (2003) "The history of photosynthetic thermoluminescence", *Photosynthesis Research* **76**: 303–318.
- Vredenberg**, W. J. (2000) "A thre-state model for energy trapping and chlorophyll fluorescence in photosystem II incorporating radical pair recombination". *Biophysical Journal*. 79: 26-38.
- Xianhai**, Zenga, B., Michael, K., Danquahb, Xiao Dong Chena, B., Yinghua Lu. (2011) "Microalgae bioengineering: From CO₂ fixation to biofuel production Renewable and Sustainable", *Energy Reviews*. 15: 3252– 3260.
- Yakushevska**, A. E., Keegstra, W., Boekema, E. J., Dekker, J. P., Andersson, J., Ruban,A. V., Horton, P. (2003) "The structure of Photosystem II in Adabidopsis: localization of the CP26 and CP29 antenna complexes", *Biochemistry*. 42: 608-613.
- Whitmarsh**, J., Govindjee. 2002. «photosystem II». In *Encyclopedia of Life Sciences*. Oxford: Nature Publishing Group, 13p.