

UNIVERSITE DU QUEBEC

MEMOIRE PRESENTE A  
UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAITRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR

NATHALIE BOUCHER

**Stimulation du transport d'électrons par le stress thermique  
dans les fractions membranaires de photosystème I**

SEPTEMBRE 1991

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## RÉSUMÉ

Au niveau des membranes thylacoïdiennes, le photosystème I subit une augmentation importante de son activité suite à une élévation de température de 25 à 50 °C. Ivanov et ses collaborateurs en 1986 ont supposé que la dissociation du complexe pigment-protéine périphérique du photosystème II et sa migration vers l'antenne du photosystème I seraient responsables de cette stimulation. Toutefois, Thomas et ses collaborateurs (1986) ont proposé que cette activation serait plutôt due à un changement conformationnel au niveau du complexe du cytochrome  $b_6/f$ . L'originalité de ce projet de recherche réside dans l'étude de cette stimulation d'activité au niveau des fragments membranaires enrichis en photosystème I afin d'élucider la nature du mécanisme impliqué. Cette activation thermique du transport d'électrons n'est observée que lorsque les donneurs artificiels d'électrons utilisés ont pour site le complexe cytochromique  $b_6/f$ . L'effet n'est pas remarqué lorsque les fragments membranaires sont partiellement immobilisés dans une matrice de glutaraldéhyde. Nous déduisons donc qu'un changement conformationnel au niveau du complexe cytochromique, induit par l'augmentation de la température, est responsable de la stimulation de

l'activité qui s'expliquerait par une affinité accrue pour les donneurs d'électrons. L'absence de stimulation thermique lorsque le donneur N,N,N',N'-tétraméthyl phénylènediamine, dont le site d'oxydation est la plastocynine, confirme cette hypothèse et appuie donc l'idée de Thomas et coll. (1986). L'activité maximale a été mesurée après une incubation de 5 min à 50 °C et constituait environ le double de l'activité observée à 25 °C lorsque le donneur utilisé était la duroquinone et le triple lorsque le dichlorophénol-indophénol agissait comme donneur d'électrons. L'absence de sels dans le milieu d'incubation à 50 °C amène une stimulation de la consommation d'oxygène du triple de l'activité observée à 25 °C. Cependant, la présence de cations tels que  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$  et  $K^+$  dans le milieu d'incubation à 50 °C permet d'augmenter d'un facteur de 4 le transport d'électrons au niveau du photosystème I. Une concentration de 10 mM est toutefois nécessaire pour l'espèce divalente et de 20 mM pour les espèces monovalentes afin d'obtenir une telle activation. Ces ions stabiliseraient les charges au niveau de la membrane photosynthétique ce qui faciliterait le changement conformationnel au niveau du cytochrome  $b_6/f$ . Cet effet stimulateur des sels est réversible puisqu'il est perdu après une incubation de plus de 5 min; après quoi, la valeur de la consommation d'oxygène retrouvée est équivalente à celle observée lorsque la préparation est incubée sans sels. Les

propriétés photoélectrogéniques des fragments membranaires enrichis en photosystème I ont été étudiés dans une cellule électrochimique. Le phénomène de stimulation thermique de l'activité du photosystème a été mesuré dans les conditions optimales et a produit une augmentation sensible des photocourants mesurés.

## REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Robert Carpentier, pour son soutien et son aide tout au long de ces années.

A ma belle et grande famille du labo, je voudrais exprimer toute ma gratitude pour son entraide, sa cordialité, son dynamisme et sa joie de vivre. A vous tous, vous avez su créer un climat serein, propice au rire... et au travail...

## TABLE DES MATIERES

	Page
RESUME . . . . .	i
REMERCIEMENTS. . . . .	iv
TABLE DES MATIERES . . . . .	v
LISTE DES ABREVIATIONS . . . . .	viii
LISTE DES TABLEAUX . . . . .	x
LISTE DES FIGURES. . . . .	xi
CHAPITRES	
1. INTRODUCTION . . . . .	1
1.1 OBJECTIFS GENERAUX . . . . .	1
1.2 ASPECTS GENERAUX DE LA PHOTOSYNTHESE . . . . .	3
1.2.1 La chaîne de transport d'électrons . . . . .	4
1.2.2 L'appareil photosynthétique. . . . .	8
1.2.3 Le photosystème I. . . . .	11
1.2.3.1 Les polypeptides codés par le chloroplaste . . . . .	12
1.2.3.2 Les sous-unités codées par le noyau cellulaire . . . . .	15
1.2.3.3 Les accepteurs d'électrons du photosystème I . . . . .	17
1.2.4 Le complexe du cytochrome b <sub>6</sub> /f . . . . .	19
1.3 DOMMAGES CAUSES A L'APPAREIL PHOTOSYNTHETIQUE PAR LA TEMPERATURE . . . . .	20

1.3.1	Sensibilité de l'appareil photosynthétique et de ses polypeptides . . . . .	20
1.3.2	Effets des températures élevées sur les lipides. . . . .	22
1.3.3	Changements conformationnels des chloroplastes suite au stress thermique . . . . .	24
1.3.4	Effets de la chaleur sur l'activité des deux photosystèmes. . . . .	28
1.3.5	Effet du pH et des ions. . . . .	31
1.4	ACCLIMATATION DE L'APPAREIL PHOTOSYNTHETIQUE AUX TEMPERATURES ELEVEES . . . . .	33
1.4.1	Viscosité et fluidité. . . . .	34
1.4.2	Effet des ions sur l'adaptation du chloroplaste. . . . .	35
1.4.3	Accumulation de lipides spécifiques. . . . .	36
1.4.4	Protéines du choc thermique. . . . .	38
2.	MATERIEL et METHODES. . . . .	43
2.1	Préparation des membranes enrichies en photosystème I. . . . .	43
2.2	Mesures de la consommation d'oxygène par polarographie. . . . .	44
2.3	Incubation des échantillons. . . . .	46
2.4	Réduction de la duroquinone. . . . .	47
2.5	Mesures de la consommation d'oxygène par photoélectrochimie . . . . .	47
2.6	Immobilisation des membranes de photosystème I . . . . .	50
3.	RESULTATS ET DISCUSSION . . . . .	51



3.1 ORIGINE DE LA STIMULATION THERMIQUE DANS LES FRACTIONS MEMBRANAIRES DE PHOTOSYSTEME I . . . . .	51
3.1.1 Confirmation du changement conformationnel responsable de l'activation thermique par l'immobilisation des membranes de photosystème I . . . . .	55
3.1.2 Localisation du changement conformationnel au niveau du cytochrome $b_6/f$ par l'utilisation de différents donneurs d'électrons. . . . .	58
3.1.3 Vérification de la température permettant la stimulation optimale . . . . .	68
3.2 EFFET DES SELS SUR L'ACTIVATION THERMIQUE. . . . .	71
3.2.1 Effet du $MgCl_2$ sur l'activation thermique des membranes de photosystème I. . . . .	74
3.2.2 Effet de la température sur la stimulation thermique. . . . .	78
3.2.3 Effet du temps d'incubation. . . . .	81
3.3 STIMULATION DU TRANSPORT D'ELECTRONS MESUREE PAR ELECTROCHIMIE. . . . .	84
3.3.1 Effet du potentiel sur le photocourant . . . . .	87
3.3.2 Effet de l'intensité lumineuse . . . . .	89
3.3.3 Effet de la concentration de la duroquinone. . . . .	91
3.3.4 Effet de la concentration du méthyl viologène. . . . .	93
3.3.5 Effet de la concentration de chlorophylle. . . . .	93
3.3.6 Effet du pH. . . . .	96
3.3.7 Effet de la température. . . . .	98
3.3.8 Discussion . . . . .	98
4.CONCLUSION . . . . .	101
BIBLIOGRAPHIE. . . . .	104

## LISTE DES ABREVIATIONS

A <sub>0</sub>	:	chlorophylle a, accepteur primaire du photosystème I
A <sub>1</sub>	:	vitamine K <sub>1</sub> , accepteur secondaire du photosystème I
ATP	:	adénosine triphosphate
CPI	:	complexes protéiques au niveau du photosystème I
DAD	:	diamino durène (N,N,N',N' Tétraméthyl-1,4-benzènediamine)
DCIP	:	dichlorophénol indophénol (2,6- Dichloro-4-[(4-hydroxyphényl)imino]-2,5-cyclohexadiène de sodium)
DEDTC	:	acide diéthylldithio carbamique
DGDG	:	digalactosyl diacylglycérol
DQ	:	duroquinone (2,3,5,6- Tétraméthyl-2,5-cyclohexadiène-1,4 dione)
EF	:	face exoplasmique
F <sub>x</sub> , F <sub>A</sub> , F <sub>B</sub>	:	centres fer - soufre
kDa	:	kilodalton
K <sub>m</sub>	:	constante d'affinité
MGDG	:	monogalactosyl diacylglycérol
MV	:	méthyl viologène
NADP <sup>+</sup>	:	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
PF	:	face protoplasmique

PMS	:	phénazine méthosulfate (5- Méthyl phénazium methyl sulfate)
PMSF	:	phénylméthyl sulfonyl fluoride
PSI	:	photosystème I
PSII	:	photosystème II
Q <sub>A</sub>	:	plastoquinone A, accepteur primaire du photosystème II
Q <sub>B</sub>	:	plastoquinone B
SOD	:	superoxyde dismutase
TMPD	:	Tétraméthyl -D- phénylènediamine (N,N,N',N'-Tétraméthyl-1,4- benzènediamine)
V <sub>max</sub>	:	vitesse maximale
Z	:	thyrosine, donneur primaire du photosystème II

## LISTE DES TABLEAUX

	Page
TABLEAU 1 : Site d'oxydation et facteur de stimulation des donneurs utilisés . . . . .	66
TABLEAU 2 : Effet de différents sels sur l'activité du PSI à 25 et 50 °C . . . . .	74

## LISTE DES FIGURES

	Page
FIGURE 1 : Schéma du transport d'électrons . . . . .	5
FIGURE 2 : Membrane thylacoïdienne . . . . .	9
FIGURE 3 : Schéma du complexe du PSI . . . . .	13
FIGURE 4 : Schéma de la cellule photoélectrochimique. .	48
FIGURE 5 : Consommation d'oxygène obtenue en présence de DCIPH <sub>2</sub> dans les fractions membranaires de PSI incubées à 25 ou 50 °C . . . . .	52
FIGURE 6 : Double réciproque des données de la <b>figure 5</b> . . . . .	54
FIGURE 7 : Effet de la température sur les membranes de PSI natives et immobilisées, mesuré en présence de DCIPH <sub>2</sub> . . . . .	56
FIGURE 8 : Consommation d'oxygène obtenue en présence de TMPDH <sub>2</sub> dans les fractions membranaires incubées de PSI à 25 et 50 °C. . . . .	59
FIGURE 9 : Consommation d'oxygène obtenue en présence de DAD dans les fractions membranes de PSI incubées à 25 et 50 °C . . . . .	61
FIGURE 10: Consommation d'oxygène obtenue en présence de DEDTC dans les fractions membranaires de PSI incubées à 25 et 50 °C . . . . .	63
FIGURE 11: Consommation d'oxygène obtenue en présence de PMS dans les fractions membranaires de PSI incubées à 25 et 50 °C. . . . .	64

FIGURE 12:	Consommation d'oxygène obtenue en présence de DQ dans les fractions membranaires de PSI incubées à 25 et 50 °C . . . . .	65
FIGURE 13:	Effet de la température sur les membranes de PSI mesurées en présence de DQ . . . . .	70
FIGURE 14:	Consommation d'oxygène obtenue dans les fractions membranaires de PSI en présence de SOD et de DQ . . . . .	72
FIGURE 15:	Effet de la concentration de $MgCl_2$ sur l'activité des fractions membranaires de PSI incubées à 25 et 50 °C mesuré en présence de DCIPH <sub>2</sub> . . . . .	75
FIGURE 16:	Effet du $MgCl_2$ sur l'activité des fractions membranaires de PSI incubées à 25 et 50 °C mesuré en présence de TMPDH <sub>2</sub> . . . . .	77
FIGURE 17:	Effet du $MgCl_2$ sur l'activité des fractions membranaires de PSI incubées à 25 et 50 °C mesuré en présence de DQ. . . . .	79
FIGURE 18:	Effet de la température sur l'activité des membranes de PSI incubées en absence ou en présence de 10 mM de $MgCl_2$ . . . . .	80
FIGURE 19:	Effet de la période d'incubation à 50 °C sur l'activité des membranes de PSI incubées en absence ou en présence de 10 mM $MgCl_2$ . . . . .	82
FIGURE 20:	Effet du potentiel imposé sur le photocourant généré par les membranes de PSI en présence de DQ . . . . .	88
FIGURE 21:	Effet de l'intensité lumineuse sur le photocourant généré par les membranes de PSI en présence de DQ. . . . .	90
FIGURE 22:	Effet de la concentration de DQ sur le photocourant généré par les membranes de PSI . . . . .	92
FIGURE 23 :	Effet de la concentration de MV sur le photocourant généré par les membranes de PSI en présence de DQ . . . . .	94
FIGURE 24 :	Effet de la concentration de chlorophylle du PSI sur le photocourant généré en présence de DQ . . . . .	95

FIGURE 25 :	Effet du pH sur le photocourant généré par les membranes de PSI en présence de DQ . . .	97
FIGURE 26 :	Effet de la température sur le photocourant généré par les membranes de PSI en présence de DQ . . . . .	99

## CHAPITRE 1

### INTRODUCTION

#### 1.1 Objectifs généraux

Les plantes sont grandement affectées par les changements environnementaux survenant dans leur habitat. Par exemple, un stress thermique peut causer des dommages irréversibles affaiblissant l'intégrité fonctionnelle de ces plantes. C'est ainsi que l'appareil photosynthétique subit une baisse de son activité suite à des températures supérieures à 30 °C. Cependant, la diminution du dégagement d'oxygène par le PSII survient à la même température qu'une augmentation apparente de la consommation d'oxygène par le PSI.

Diverses hypothèses ont été émises pour expliquer ce phénomène. Des études ont déjà montré que, sous l'effet des températures élevées (Sundy et al., 1986, Gounaris et al., 1983, 1984) et des hautes intensités lumineuses (Havaux et Lannoye, 1987), le complexe pigment-protéine du PSII se dissocie du centre réactionnel de ce dernier. Les hautes intensités lumineuses entraînent également la phosphorylation du complexe antennique du PSII. Une fois phosphorylé, ce complexe migre vers les lamelles stromales, où est situé le



PSI, et s'associe au complexe pigment-protéine du PSI. Les hautes intensités lumineuses s'accompagnent généralement d'une élévation de la température. Ainsi, on observe, à partir de 35 °C (Gounaris et al., 1984), la dissociation du complexe antennique du PSII et sa migration vers le PSI. Ivanov et ses collaborateurs (1986) ont donc supposé que cette réorganisation membranaire était responsable de l'augmentation de l'activité du PSI aux températures élevées.

En utilisant divers composés pour inhiber les différents sites de fixation au niveau du transport d'électrons du PSI, Thomas et ses collaborateurs (1986), ont pu déterminer que la stimulation thermique de l'activité du PSI était localisée au niveau du complexe du cytochrome  $b_6/f$ . Ils ont donc proposé qu'un changement conformationnel survenait au niveau de ce complexe cytochromique sous l'effet des températures élevées.

Les hypothèses précédentes ont, cependant, été proposées à partir de résultats provenant de thylacoïdes entiers. L'originalité de ce projet de recherche consiste à vérifier laquelle des deux hypothèses peut expliquer l'activation thermique au niveau de fractions membranaires enrichies en PSI. L'isolement des membranes de PSI permet d'éliminer le

complexe antennique du PSII. Il devient donc possible de déterminer l'hypothèse valable.

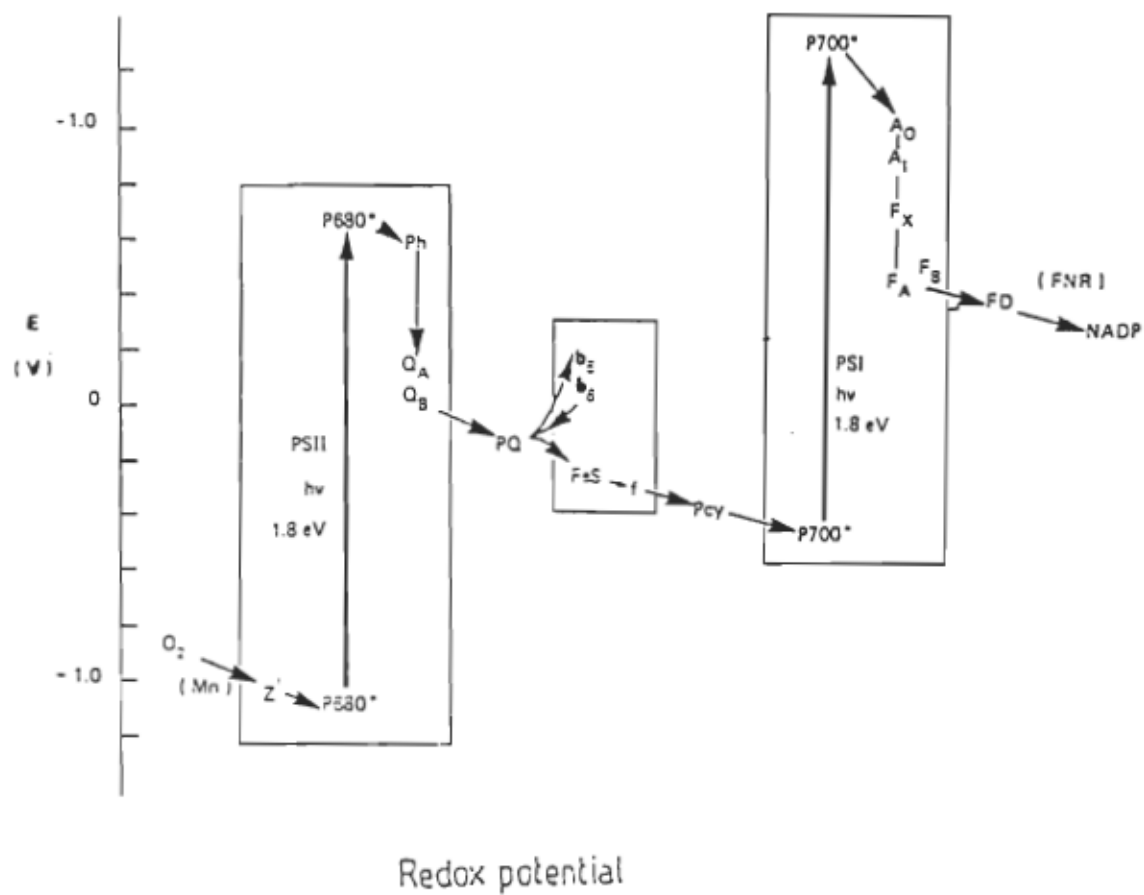
Les objectifs de ce projet sont de déterminer si une stimulation thermique est observable au niveau des membranes de PSI isolées et de mener une étude plus approfondie du mécanisme d'activation en vérifiant l'importance des sels et de différents donneurs d'électrons. Comme une nouvelle cellule photoélectrochimique a été développée au cours des dernières années au laboratoire, il devient aussi pertinent de vérifier si cette activation permet d'augmenter le photocourant généré par les membranes de PSI et enfin d'étudier les caractéristiques photoélectrogéniques de ce photosystème.

## **1.2 Aspects généraux de la photosynthèse**

La température affecte le fonctionnement et la structure de l'appareil photosynthétique. Il est donc important d'expliquer la chaîne de transport d'électrons et de détailler l'arrangement du chloroplaste. Nous étudierons également la structure et la fonction du PSI et du complexe du cytochrome  $b_6/f$  puisqu'il sera grandement question de ces deux complexes dans ce travail.

### 1.2.1 La chaîne de transport d'électrons

La chaîne du transport d'électrons est illustrée sur la **figure 1**. Les pigments photosynthétiques associés aux complexes antenniques des photosystèmes captent l'énergie lumineuse. Suite à l'absorption de photons, il y a séparation de charge entre le centre réactionnel du PSII et la phéophytine. L'oxydation de P680 permet de soutirer un électron au donneur primaire du PSII, Z, qui semblerait être une tyrosine (Debus et al., 1988). L'électron de Z provient du complexe de dégagement d'oxygène qui est composé de quatre atomes de manganèse. Ce complexe, soumis à un cycle à quatre étapes, provoque la photolyse de deux molécules d'eau en quatre protons et quatre électrons et libère l'oxygène. Lorsque la phéophytine est réduite, l'électron est transféré à  $Q_A$  qui est le premier accepteur stable du PSII. La plastoquinone, sise au site de  $Q_B$ , acceptera deux électrons de  $Q_A$  et recevra deux protons provenant de l'extérieur. Cette plastoquinone réduite diffusera alors dans le milieu pour migrer vers le complexe cytochromique  $b_6/f$ . A cette étape, deux protons seront libérés dans le lumen assurant ainsi le gradient de protons nécessaire à l'ATPase. Ensuite, la plastocyanine, une protéine extrinsèque, acceptera cet électron et diffusera jusqu'au site d'oxydation du PSI.



**FIGURE 1 :** Schéma du transport d'électrons  
(Gregory 1989)

Au niveau de la réaction de Hill, le PSI catalyse un transport d'électrons entre deux protéines mobiles, la plastocyanine et la ferrédoxine. La plastocyanine fait la navette entre le complexe du cytochrome  $b_6f$  et le centre réactionnel du PSI. L'absorption de la lumière par le PSI induit l'excitation électronique des pigments. Cette énergie est transférée à des chlorophylles situées dans le centre réactionnel qui, dans un état excité, devient capable de transmettre rapidement un électron au donneur primaire  $A_0$ . Ceci est la première de plusieurs étapes de transport d'électrons, lesquelles correspondent à une diminution progressive de l'énergie chimique du système et à la stabilisation de la séparation des charges :



Tel que démontré ci-haut,  $A_1$  accepte les électrons provenant de  $A_0$  et les donne au centre fer-soufre  $F_x$  qui les distribue aux centres  $F_A$  et  $F_B$ . Deux modèles ont été proposés pour le transport de  $F_x$  à  $F_A$  et  $F_B$  : un modèle linéaire où  $F_x$  donne d'abord à  $F_B$  qui transmet l'électron à  $F_A$  et un modèle à deux branches (Y) où  $F_x$  peut donner équitablement à  $F_A$  ainsi qu'à  $F_B$  (Lagoutte et Mathis, 1989). Dans ce dernier cas, si  $F_A$  est préréduit alors  $F_x$  peut donner à  $F_B$  ou inversement si  $F_B$  est préréduit. Cependant, si tous les

centres fer-soufre sont préréduits, alors aucun transport d'électrons n'est observé (Evans et Bredenkamp, 1990).

Le transport d'électrons entre le centre réactionnel du PSI et le  $\text{NADP}^+$  s'effectue par l'intermédiaire de deux protéines : une protéine fer-soufre, la ferrédoxine (Fd) et une protéine contenant de la flavine, la ferrédoxine:NADP oxydoréductase (FNR). La séquence de ce transport d'électrons inclut :

- 1) Le transport d'électrons des centres  $F_A$  et  $F_B$  à la Fd.
- 2) Le transport d'électrons de la Fd réduite au FNR.
- 3) Le transport d'électrons de la FNR au  $\text{NADP}^+$ .

La FNR est localisée dans les régions non-empilées et aux bordures des grana des thylacoïdes et semble être liée au complexe du PSI. Puisqu'il existe deux sites de liaison de la ferrédoxine sur la membrane thylacoïdienne, deux modes d'interactions ont été suggérés (Golbeck, 1987) : i) La ferrédoxine sert comme transporteur d'électrons faisant la navette entre le centre  $[F_A/F_B]$  au site où la FNR est liée à la membrane et ii) La ferrédoxine accepte les électrons provenant du PSI en étant immobilisée par liaison à la FNR. Cependant, une expérience récente indique que l'interaction de la ferrédoxine avec le PSI est indépendante de son site de liaison à la FNR, ce qui lui confère un rôle de transporteur

d'électrons mobile entre les centres fer-soufre et la FNR (Golbeck, 1987).

### 1.2.2 L'appareil photosynthétique

Le chloroplaste est constitué de deux membranes topologiquement et fonctionnellement distinctes qui sont séparées l'une de l'autre par un espace de 10 à 20 nm. Ces membranes forment l'enveloppe chloroplastique. La membrane interne prolifère quelquefois pour former des replis dans le compartiment aqueux du chloroplaste, le stroma. Le stroma renferme la membrane photosynthétique dont l'organisation particulière favorise l'activité optimale des photosystèmes : les thylacoïdes qui prennent la forme d'un réseau constitué de membranes agrégées, appelées les grana, attachées à des membranes non empilées, les lamelles. La membrane thylacoïdienne est présentée sur la figure 2. Les surfaces externes et internes des thylacoïdes sont clairement distinctes. La surface externe est immergée dans le stroma alors que la surface interne renferme un compartiment aqueux, l'espace intrathylacoïdien, qui est continu entre les régions empilées et non empilées (Foyer, 1984).

Les thylacoïdes renferment cinq complexes membranaires soient les complexes antenniques du PSII, les centres

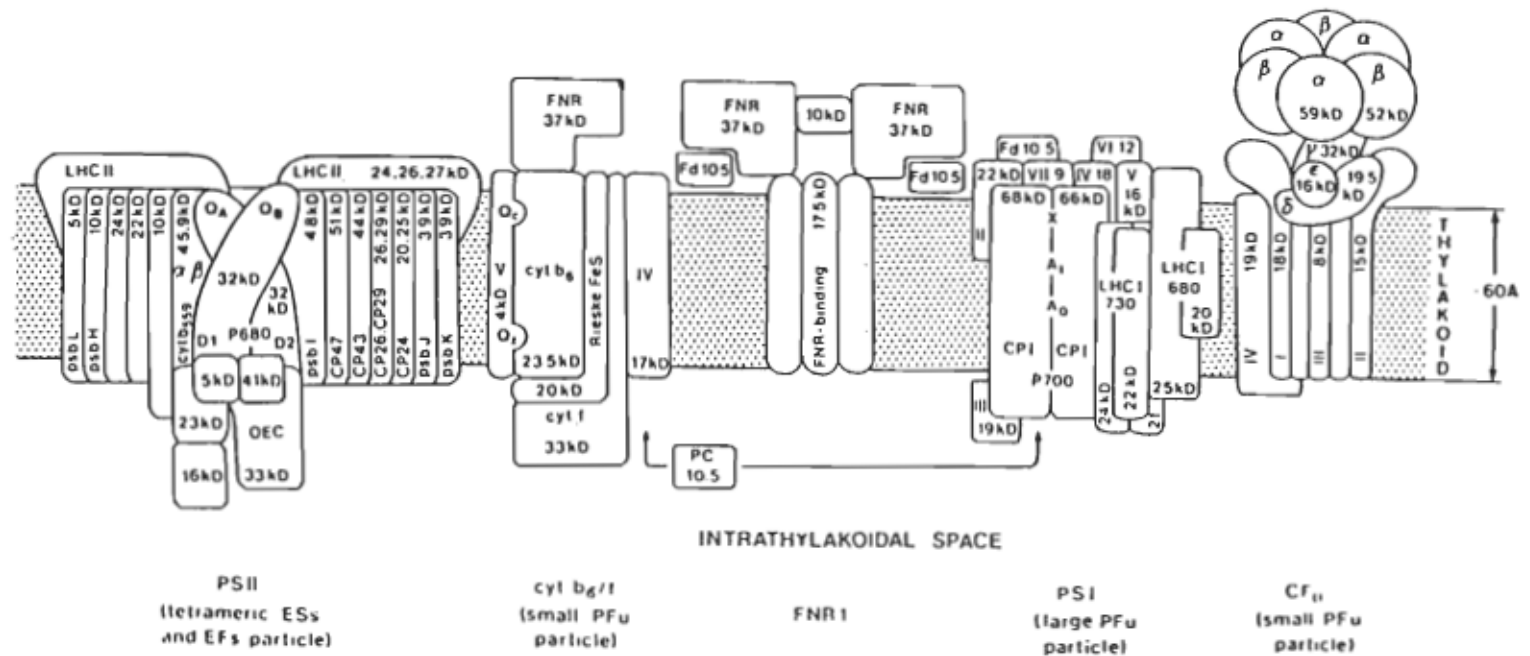


FIGURE 2 : Membrane thylacôidienne  
(Simpson et von Wettstein 1989)



réactionnels du PSI et PSII, le complexe du cytochrome  $b_6/f$  et le complexe de l'ATP synthétase (Murphy 1986). On retrouve le PSI au niveau des lamelles alors que le PSII est situé dans les grana (Foyer, 1984).

La composition lipidique, protéique et pigmentaire des thylacoïdes est très différente de celle retrouvée au niveau de la membrane interne de l'enveloppe chloroplastique (Foyer, 1984). La membrane du chloroplaste est très riche en galactolipides et en phospholipides. Les membranes thylacoïdiennes contiennent cinq classes de lipides : monogalactosyldiacylglycérol , digalactosyldiacylglycérol, sulphoquinovosyldiacylglycérol phosphatidylglycérol et phosphatidylcholine (Murphy, 1986).

La chlorophylle constitue 20-30 % du total lipidique de la membrane thylacoïdienne. Toutes les chlorophylles des membranes des plantes sont associées à des polypeptides spécifiques pour former des complexes pigments-protéines (Murphy, 1986).

Les autres pigments des thylacoïdes sont les caroténoïdes, les lutéines et les xanthophylles. Ces pigments ont un rôle de photoprotection et un rôle d'accessoire aux complexes d'antennes (Murphy, 1986).

### 1.2.3 Le photosystème I

Chez les plantes supérieures, la composition polypeptidique du PSI peut s'établir à une dizaine de protéines. Ces différents polypeptides peuvent être divisés en trois catégories principales (Lagoutte et Mathis, 1989) :

1) La première implique directement le noyau du centre réactionnel. Il est composé de deux classes de protéines. L'une est constituée par l'apoprotéine du P700 et l'autre par un petit polypeptide de 9 kDa riche en cystéines et qui lie les centres  $F_A$  et  $F_B$ .

2) La seconde catégorie est constituée par trois ou quatre protéines périphériques dont le poids moléculaire varie de 9 à 22 kDa et qui sont probablement impliquées dans les interactions avec la ferrédoxine et la plastocyanine.

3) La troisième classe inclut les polypeptides de 22 à 29 kDa associés au complexe collecteur de lumière du PSI. Cette antenne du PSI lie environ 100 chlorophylles a et b dans un rapport de 3.5 (Golbeck, 1987).

Le complexe natif du PSI est connu sous le nom de PSI-200 puisqu'il contient environ 200 chlorophylles dans son noyau et dans son antenne périphérique. Il est constitué par le P700, les accepteurs  $A_0$ ,  $A_1$ ,  $F_x$ ,  $F_A$ ,  $F_B$  ainsi que par le complexe antennique (Bruce et al., 1989, Golbeck, 1987).

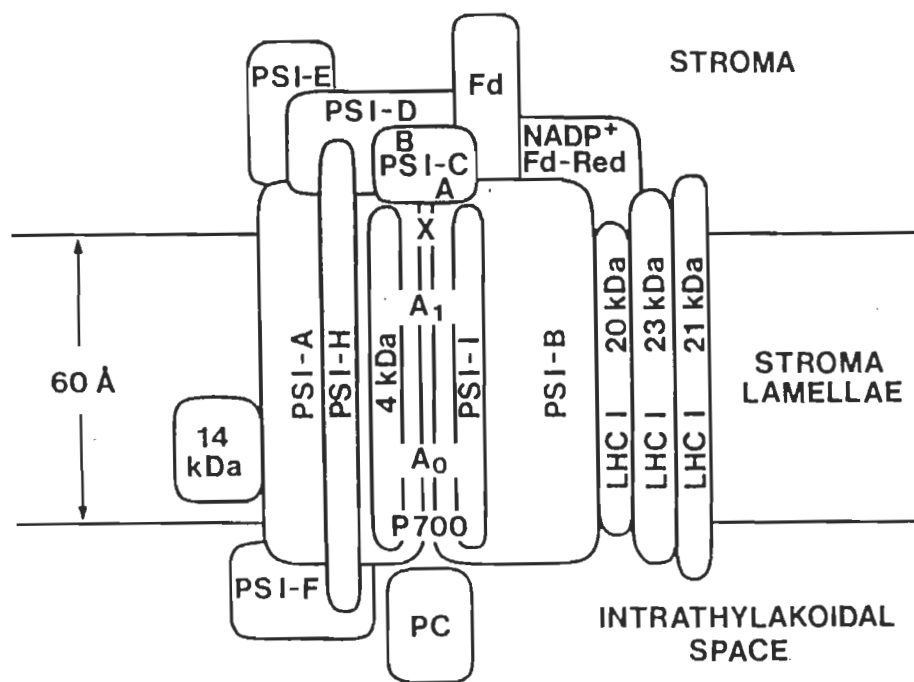
Le PSI-100 contient environ 120 chlorophylles par P700 et est composé d'environ sept polypeptides dont le P700, A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, F<sub>x</sub>, F<sub>A</sub>, F<sub>B</sub> mais ne contient pas de complexe antennique (Bruce et al., 1989, Golbeck, 1987).

Le complexe du PSI est constitué d'une dizaine de sous-unités polypeptidiques dont cinq sont codées par le chloroplaste et six par le noyau cellulaire. La figure 3 présente les différents polypeptides du PSI (Scheller et Moller, 1990).

#### **1.2.3.1 Les polypeptides codés par le chloroplaste**

La sous-unité I est formée de deux protéines homologues désignées PSI-A et PSI-B codées par les gènes *psa A* et *psa B*. Ces deux polypeptides de 82 kDa forment un hétérodimère qui contient le centre réactionnel photochimique du PSI, les accepteurs primaires et intermédiaires A<sub>0</sub> et A<sub>1</sub> ainsi que le centre fer-soufre F<sub>x</sub> (Scheller et Moller, 1989, 1990). La nature chimique du centre réactionnel le classe comme un dimère de chlorophylle a (Golbeck, 1987).

Les polypeptides de la sous-unité I se sont hautement conservés au cours de l'évolution. Ce haut degré de



**FIGURE 3 :** Schéma du complexe du PSI  
(Scheller et Moller 1990)

conservation reflète l'importance du rôle de cette sous-unité dans la photochimie du PSI (Reilly et Nelson, 1988).

Cette sous-unité contient, entre autres, des résidus de cystéines, localisés dans la région hautement conservée. Ces cystéines agiraient comme ligands pour le centre  $F_X$  (Scheller et al., 1989). La distribution de ces acides aminés ferait en sorte que le centre  $F_X$  serait partagé entre les polypeptides PSI-A et PSI-B (Lagoutte et Mathis, 1989).

Les centres  $F_A$  et  $F_B$  sont localisés sur un polypeptide de 9 kDa codé par le gène chloroplastique *psa C* (Scheller et Moller, 1990). Cette protéine contient huit atomes de fer et une quantité identique d'atomes de soufre. Les centres  $F_A$  et  $F_B$  sont définis comme des centres  $[4Fe-4S]$  (Wynn et Malkin, 1988). Cette protéine contient une séquence d'acides aminés hautement conservée qui inclut quatre cystéines dupliquées, organisées dans une configuration typique: deux cystéines sont toujours localisées entre les résidus 10-20 et 47-57 (Lagoutte et Mathis, 1989). Ces cystéines lieraient les centres  $F_A$  et  $F_B$ . On peut penser qu'un centre Fe-S est complexé avec les trois premières cystéines du N-terminal et la dernière du C-terminal dans une région hydrophobe, étant donné que la structure tertiaire du polypeptide PSI-C est presque identique à celle retrouvée chez les bactéries

(Lagoutte et Mathis, 1989). Le second centre Fe-S serait lié avec les autres cystéines dans une région principalement hydrophile. La meilleure accessibilité de  $F_B$  aux agents externes ainsi que sa plus faible photoréduction à basse température comparativement à  $F_A$  supportent l'hypothèse que  $F_B$  est localisé dans la région hydrophobe (Lagoutte et Mathis, 1989).

La sous-unité PSI-I, codée par le gène *psa I*, est très hydrophobe et fermement liée au CPI. Cette sous-unité participerait à la liaison du PSI,  $A_0$ ,  $A_1$  (Scheller et Moller, 1990).

#### 1.2.3.2 Les sous-unités codées par le noyau cellulaire

Le gène *psa-D* code pour la sous-unité PSI-D qui interagit avec la ferrédoxine. Cette dernière est une protéine extrinsèque périphérique, localisée du côté du stroma de la membrane thylacoïdienne (Scheller et Moller, 1990). La sous-unité PSI-D possède des domaines hautement positifs. Sa fonction devrait donc être de neutraliser les charges négatives de la ferrédoxine afin que celle-ci puisse interagir avec le PSI malgré les charges négatives de la surface membranaire des thylacoïdes (Bruce et al., 1989).

Cette sous-unité a un poids moléculaire de 22 kDa. Ce sont les groupements carboxyls de la ferrédoxine qui seraient liés aux groupements amino-lysines de PSI-D (Zilber et Malkin, 1988).

La plastocyanine interagit avec une sous-unité de 19 kDa codée par le gène *psa F* (Scheller et Moller, 1990, Bruce et al., 1989). Tout comme pour la ferrédoxine, la présence de régions positives sur cette sous-unité lui confère un rôle de stabilisation des charges négatives entre la plastocyanine et le complexe du PSI (Golbeck, 1987).

La plastocyanine et la ferrédoxine sont localisées respectivement dans le lumen et le stroma. Leur site d'interaction avec le PSI est donc situé sur les côtés opposés de la membrane (Bruce et al., 1989).

Les deux sous-unités de 19 et 22 kDa ne sont pas essentielles puisque la plastocyanine peut interagir directement avec le centre réactionnel du PSI alors que la ferrédoxine peut se lier à la sous-unité PSI-C qui lie les centres  $F_A$  et  $F_B$ . Leur rôle est donc de faciliter le transport d'électrons aux deux sites respectifs. Elles doivent également orienter la ferrédoxine et la plastocyanine

afin de permettre un transport d'électrons efficace (Bruce et al., 1978, Scheller et Moller, 1990).

Le rôle des autres polypeptides codés par le noyau n'est pas encore élucidé. Soulignons toutefois que le PSI-E est une protéine périphérique située du côté du stroma, PSI-K semble être très solidement lié au centre réactionnel du PSI (Scheller et Moller, 1990). PSI-H aurait pour fonction de participer à la liaison des polypeptides du complexe antennique du PSI au noyau central du PSI (Scheller et Moller, 1990).

#### 1.2.3.3 Les accepteurs d'électrons su PSI

Les transporteurs primaires et intermédiaires  $A_0$  et  $A_1$  sont liés au centre réactionnel du PSI mais leur site de liaison n'a pas encore été identifié (Scheller et Moller, 1990, Webber et Malkin, 1990).

$A_0$  a les propriétés d'un monomère de chlorophylle a (Scheller et Moller, 1990, Golbeck, 1987). Selon les études de Thurnauer et de ses collaborateurs (1989),  $A_1$  est défini comme une phylloquinone. Le PSI contient deux molécules de vitamines  $k_1$  par centre réactionnel mais seulement une des deux semble requise pour le transport des électrons de  $A_1$  aux



centres fer - soufre (Bruce et al., 1989). Les polypeptides de ces deux accepteurs sont les produits des gènes *psa A* et *psa B* (Scheller et Moller, 1990).

Il existe une controverse dans la littérature au sujet du centre  $F_x$ , qui pourrait être soit un centre  $[2Fe-2S]$  (Lagoutte et Mathis, 1989) ou  $[4Fe-4S]$  (Golbeck, 1987, Webber et Malkin, 1990, Evans et Bredenkamp, 1990). Les quatre atomes de fer de ce centre sont reliés à quatre cystéines situées dans l'hétérodimère PSI-A/PSI-B.

Selon Golbeck (1987), si  $F_x$  est un centre  $[2Fe-2S]$ , il nécessiterait la présence de huit cystéines pour permettre la liaison. Cependant, le centre réactionnel tel que constitué ne procure pas autant de ligands. Afin de palier à ce problème, le centre réactionnel serait représenté comme un tétramère et non plus comme un dimère. La stoechiométrie d'une telle structure tétramérique nécessiterait un bris dans l'organisation conformationnelle puisque seulement deux gènes coderaient pour les quatre polypeptides similaires. Cependant, si  $F_x$  s'avère être un centre  $[4Fe-4S]$ , un total de quatre cystéines seulement est nécessaire. Dans un tel cas, l'arrangement conformationnel d'un dimère peut fournir les ligands requis. Il est donc maintenant convenu que le centre  $F_x$  est un  $[4Fe-4S]$ .

#### 1.2.4 Le complexe du cytochrome $b_6/f$

Le cytochrome  $b_6/f$  est un complexe protéique composé de quatre polypeptides majeurs et plusieurs centres redox: deux cytochromes  $b_{563}$  de 23.4 kDa dont un de haut potentiel redox et un de faible potentiel qui assurent le transport d'électrons entre le stroma et le lumen de la membrane thylacoïdienne, un cytochrome  $f$  de 31.1 kDa, une protéine fer-soufre de Rieske de 18.9 kDa, un polypeptide dont le poids moléculaire se situe entre 15 et 17 kDa et de fonction inconnue mais qui serait lié à la protéine de Rieske (Nugent et Bendale, 1987). Ce complexe serait localisé au hasard dans la membrane thylacoïdienne, autant dans les grana que dans les lamelles (Allred et Staehelin, 1986). Ce complexe cytochromique sert de transporteur d'électrons entre le PSII et le PSI par l'intermédiaire de la plastoquinone et de la plastocyanine et agirait comme une pompe à protons. De plus, il est impliqué dans le transport cyclique d'électrons (Joliot et Joliot, 1986).

### **1.3 Dommages causés à l'appareil photosynthétique par la température**

L'abaissement de l'activité photosynthétique observé suite à un stress thermique est causé par des changements moléculaires affectant l'intégrité fonctionnelle du chloroplaste. Dans cette section, il sera donc question des mécanismes et des réorganisations impliqués au niveau de l'appareil photosynthétique lors d'une exposition à de hautes températures (35-50 °C).

#### **1.3.1 Sensibilité de l'appareil photosynthétique et de ses polypeptides**

L'appareil photosynthétique subit des dommages importants sous l'effet des températures élevées. Cette sensibilité de la photosynthèse au choc thermique diffère selon le génotype des plantes (Chaisompongpan et al., 1990). Les expériences que ces chercheurs ont effectuées démontrent également que peu importe le génotype, un stress à 42 °C réduit considérablement le dégagement d'oxygène mais n'est pas suffisant pour provoquer des dommages irréversibles à la membrane plasmique. Ces dommages irréversibles peuvent se traduire par la perte de 50% des ions. Ainsi, ces résultats indiquent clairement que la baisse de l'activité photosynthétique survient avant la détérioration de la membrane plasmique.

Soumise à un stress thermique, l'enveloppe membranaire du chloroplaste montre une lésion apparaissant entre 53 et 57 °C (selon les espèces, l'état des feuilles et la vitesse de l'intensité calorifique) qui serait due à la perte soudaine de l'eau du chloroplaste (McCain et al., 1989).

Une longue exposition à la chaleur n'altère pas visiblement la composition de la membrane, mais diminue fortement la synthèse de plusieurs de ses composés ayant des fonctions spécifiques au niveau de l'appareil photosynthétique dont l'apoprotéine du centre réactionnel du PSII, les sous-unités protéolipidiques  $\alpha$  et  $\beta$  de l'ATPase synthétase, le cytochrome f et b<sub>559</sub> ainsi qu'un composé de 47 kDa du PSII (Süss et Yordanov, 1986). Krisman et ses collaborateurs (1988) ont étudié deux variétés de blé : Sturdy et Mustang. Ils ont remarqué que la première présentait une réduction dans la synthèse de la petite sous-unité de Rubisco à 34 °C comparativement à la seconde. Telle que rapportée par Vierling (1985), la sensibilité de cette protéine au choc thermique peut être un facteur important de dommage aux plantes puisqu'elle diminue la synthèse des protéines chloroplastiques provenant du cytoplasme.

La phosphorylation est également affectée par les températures élevées. Six polypeptides de 43, 33, 32, 26,

25.5 et 9 kDa sont phosphorylés de façon prédominante comparativement aux autres protéines des thylacoïdes. De ces protéines, celles de 25.5 et 26 kDa représentent les sous-unités du complexe protéique de chlorophylle a/b du PSII alors que les autres sont les constituants du centre réactionnel du PSII (Süs et Yordanov, 1986). Les conséquences de la phosphorylation du complexe collecteur de lumière du PSII sont explicitées à la section 1.3.3.

### **1.3.2 Effets des températures élevées sur les lipides**

La composition lipidique des membranes thylacoïdiennes ne change pas sous l'effet des hautes températures mais la proportion des acides gras varie. Le niveau d'acides gras totaux libres dans les thylacoïdes peut augmenter de 2 à 3 fois lorsque les membranes sont incubées aux hautes températures (Santarius, 1980). Les plus sensibles sont les acides insaturés comme les acides linoléique et hexadécatriénoïque, les plus abondamment retrouvés dans les membranes photosynthétiques. La présence de petites quantités d'acides gras due à l'hydrolyse, tel l'acide linoléique, conduit à l'augmentation de la sensibilité thermique des membranes. Ainsi, la formation d'acides gras libres par l'action des lipases endogènes pourrait augmenter les forces d'interaction polaire entre les membranes et diminuer la

thermostabilité des structures membranaires et donc contribuer partiellement à endommager l'intégrité fonctionnelle des membranes durant un choc thermique (Santarius, 1980).

Gounaris et ses collaborateurs (1983) ont observé, suite à une incubation aux températures supérieures à 45 °C, une séparation de phase des lipides ne formant pas de bicouches.

Les hautes températures augmentent la fluidité et la diffusion latérale des lipides dans les membranes. (Yordanov et al., 1986). Les lipides pourraient alors influencer l'activité photochimique par les produits de leur hydrolyse ou par les changements de leur fluidité, la dénaturation survenant à une fluidité critique (Raison et al., 1982). Ces modifications dans la fluidité lipidique pourraient influencer la dissociation du PSII et de son complexe pigment-protéine (section 1.3.3). Un autre exemple de l'importance de la structure membranaire se remarque au niveau de l'inactivation thermique de la phosphorylation non cyclique qui résulte probablement de l'inactivation du transport d'électrons conduit par le PSII.

Les protéines de surface jouent également un rôle significatif pour maintenir l'organisation membranaire des

thylacoïdes (Singh et Singhal, 1989). Les interactions lipides-protéines sont altérées puisque la fluidité membranaire est affectée par la perte des protéines de surface induite par la chaleur. Comme les pigments sont localisés dans la région hydrophobe centrale des protéines et sont aussi en contact avec les domaines non polaires des lipides, les interactions entre ces chromophores et les lipides en sont d'autant plus influencées (Singh et Singhal, 1989).

### **1.3.3 Changements conformationnels des chloroplastes suite au stress thermique**

Des réarrangements conformationnels troublant l'intégrité membranaire sont observés suite à une exposition aux températures élevées (Gounaris et al., 1983, 1984).

Les chloroplastes vont montrer une réorganisation à 35 °C. Cette réorganisation s'avérera d'autant plus importante que la température est plus élevée. Ainsi, on remarque des changements survenant à deux niveaux de température avec les techniques de cryothérapie. Les premiers sont retrouvés dans l'intervalle de 35-45 °C et impliquent une perte de l'empilement des grana causant ainsi la formation de nouveaux sites ou la modification des sites

d'attachement des thylacoïdes. Les températures au-dessus de 45 °C entraînent une vésiculation générale des membranes thylacoïdiennes.

On peut apporter ici une description plus détaillée de ces réorganisations conformationnelles. Les membranes incubées dans l'intervalle de température de 35-45 °C montrent une tendance à se déempiler et ont une apparence concentrique. Les fractures effectuées à travers ces membranes révèlent les faces exoplasmiques (EF) et protoplasmiques (PF). La face PF se distingue de la face EF par la présence de particules de plus grande densité. Malgré que l'empilement des membranes soit largement aboli avec l'incubation à 45 °C (vésiculation des membranes), des sites d'attachement persistent encore. Ces sites, dispersés dans tout le chloroplaste, sont de moindre dimension (250-300 nm de diamètre) que les sites d'attachement originaux associés avec les régions empilées (300-400 nm) n'ayant pas subi de stress.

La grandeur et la distribution des particules des faces EF et PF des chloroplastes ayant subi un traitement à 35-45 °C sont très différentes de celles des faces correspondantes dans les chloroplastes non traités. On observe une absence complète des particules intramembranaires



à l'intérieur des sites d'attachement des faces EF empilées des échantillons traités, alors qu'on retrouve chez les contrôles un grand nombre de ces particules à l'extérieur des sites dans les faces EF empilées. Au niveau des faces EF des régions lamellaires de ces mêmes échantillons traités, on remarque un grand nombre de particules, contrairement aux contrôles. De plus, le diamètre des particules des faces EF des thylacoïdes traités à la chaleur est de 9 nm. Les particules plus larges (11 nm) qui sont originellement présentes dans les faces EF des contrôles sont apparemment exclues des sites d'attachement des chloroplastes traités et expulsées vers les régions non attachées de la membrane. Au même moment, elles semblent subir une réduction de leur dimension.

La perte progressive des particules de la face EF indique que les composés de cette face, soient le complexe antennique de chlorophylle a/b et le complexe central du PSII se dissocient aux hautes températures (Armond et al., 1980, Schreiber et Armond 1978).

D'autres études (Sundby et Anderson, 1985) supposent que cette réorganisation implique un détachement du PSII avec son complexe protéique, suivi d'une migration de ce PSII vers les lamelles. Il est à noter ici que le PSII possédant ses

complexes collecteurs de lumière est nommé  $PSII_{\alpha}$ , qu'il est fonctionnel et qu'il se situe dans les grana. Sans ses antennes, le PSII devient inactif et est alors appelé  $PSII_{\beta}$ . On retrouve ce dernier dans les régions non empilées. Ainsi, sous le stress thermique, le rapport PSII/PSI dans les lamelles augmente à 45 °C comparativement à 5 °C (Sundby et al., 1985). Le complexe mobile périphérique du PSII possède le même contenu d'antenne que le  $PSII_{\beta}$  localisé dans les régions non empilées (Sundby et al., 1985). Cette migration est cependant réversible lorsque l'échantillon est refroidi.

La dissociation du PSII et de son antenne pourrait être reliée aux altérations des interactions hydrophiles et hydrophobes (Berry et al., 1980). En assumant que les forces liant le PSII avec son complexe pigment-protéine sont hydrophobes, alors l'augmentation de la température diminue la force de ces interactions. A mesure que la température s'élève, ces forces d'interaction diminuent et les complexes se séparent. L'augmentation de la fluidité membranaire, telle que soulignée à la section 1.3.2, est donc impliquée dans cette dissociation.

La distribution de l'énergie d'excitation entre le PSI et le PSII est également changée sous l'effet de la chaleur (Haveaux et Lannoye 1987, Kyle et al., 1983). Une kinase

protéique régularise la distribution de la lumière entre les deux photosystèmes. Cette kinase reste active aux températures élevées. La chaleur induirait alors le développement de l'état II. (Dans l'état II, le PSII est surexcité par rapport au PSI. Le bassin de plastoquinones est alors réduit activant ainsi la kinase qui vient phosphoryler le complexe périphérique du PSII, ce qui augmente ainsi la distance entre les deux. L'énergie est donc redistribuée vers le PSI.) Ce changement dans la distribution de l'énergie pourrait être un mécanisme protecteur pour éviter le photodommage du PSII aux hautes intensités lumineuses qui accompagnent habituellement les températures élevées dans les champs (Haveaux et Lannoye, 1987).

#### **1.3.4 Effets de la chaleur sur l'activité des deux photosystèmes**

Parmi tous les mécanismes impliqués dans la photosynthèse, celui du dégagement d'oxygène est le plus sensible aux hautes températures et entre les deux photosystèmes, c'est le PSII qui est le moins résistant à la chaleur.

On a déjà observé que l'appareil photosynthétique subissait une baisse de son activité suite à une exposition à des températures supérieures à 30 °C. La diminution du

dégagement d'oxygène par le PSII survient à la même température que l'augmentation de la consommation d'oxygène par le PSI (Thomas et al., 1986). Plusieurs phénomènes peuvent expliquer l'inactivation thermique du PSII:

- extraction de cations divalents tels que  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$  de la membrane du PSII, ces cations étant essentiels pour la stabilisation de l'assemblage moléculaire du centre réactionnel du PSII (Inoue et al., 1987).
- libération des protéines de 33, 24 et 18 kDa ainsi que la perte du Mn endogène des membranes du PSII. L'inactivation complète de l'activité du PSII survient à 50% de perte de  $\text{Mn}^{++}$  (Nash et al., 1985).
- dissociation du complexe d'antenne du centre réactionnel (section 1.3.3).

Le PSI ne se comporte pas de la même façon que le PSII: on observe un sommet de son activité à 50 °C (Thomas et al., 1986). Certaines hypothèses ont été émises pour expliquer ce phénomène.

- 1) La réorganisation de la membrane thylacoïdienne aux températures élevées expose un site accepteur d'électrons localisé dans le complexe du cytochrome  $b_6/f$  de la chaîne de transport d'électrons. L'exposition de ce site semble être liée aux changements au niveau des interactions lipide-protéine qui surviennent dans la

membrane en réponse au stress thermique (Thomas et al., 1986).

2) La dissociation du complexe d'antenne du PSII se produisant aux hautes températures pourrait amener une redistribution des complexes protéiques selon le modèle de Kyle et Arntzen (1983) qui proposent que ce complexe se rapprocherait du PSI, ce qui augmenterait son activité et sa résistance à la chaleur, favorisant ainsi le développement de l'état II. Ivanov et Velitchkova (1990) ont observé une augmentation du signal P700\* en résonance paramagnétique. De plus, ils ont étudié la fluorescence des thylacoïdes soumis à des températures élevées (Velitchkova et al., 1989). Le niveau de  $F_{735}/F_{685}$  augmente de 60% à 50 °C comparativement à celui obtenu à 20 °C. Ils expliquent leurs résultats par la réorganisation structurale des membranes thylacoïdiennes et des complexes pigments-protéines du PSI et PSII conduisant à l'inactivation du PSII et à la redistribution de l'énergie d'excitation en faveur du PSI.

3) Gounaris et ses collaborateurs (1984) ont expliqué la différence au niveau de l'activité des deux photosystèmes, survenant à la même température, par la séparation de phase des lipides ne formant pas de bicouche.

Vigh et ses collaborateurs (1989) ont remarqué que le seuil de température à laquelle le PSI montrait une augmentation de son activité était influencé par l'hydrogénation des acides gras. Une saturation de plus de 35 % des doubles liaisons cis des acides gras des membranes élimine la stimulation de l'activité du PSI. Des études ont montré que l'acclimatation des plantes aux hautes températures résulte en une saturation des acides gras polaires des thylacoïdes (Bjorman et Berry, 1980). L'augmentation de la saturation des lipides apporte la réduction du niveau de fluidité membranaire ce qui permettrait ainsi d'augmenter le seuil de température causant les dommages irréversibles aux membranes.

#### 1.3.5 Effet du pH et des ions

Une autre cause de la déstabilisation de la membrane pourrait être sa charge négative. La charge nette négative est dérivée des groupements carboxyls associés avec les acides glutamique et aspartique (Barber, 1982). La charge positive qui existe au pH neutre et domine au pH inférieur à 4.3 vient probablement des groupes guanidine et arginine. La majorité de la charge électrique nette sera associée avec les lamelles du stroma. La charge membranaire joue un rôle important dans le maintien de la structure native des

protéines dans la phase hydrophile. Ainsi un changement de pH et la présence d'ions influenceront la thermostabilité membranaire.

La présence de faibles concentrations d'ions métalliques diminue la mobilité des composés des thylacoïdes et pourrait augmenter la stabilité à la chaleur de l'appareil photosynthétique (Yordanov et al., 1986).

L'augmentation de la température est accompagnée par une diminution de l'activité photosynthétique aux pH 4 et 8 et par une activité maximale au pH 5.5 (Venediktov et Krivoshejeva, 1984). Cette tolérance des chloroplastes au pH 5.5 pourrait s'expliquer par le fait que ce pH se rapproche sensiblement de celui retrouvé in vivo. Les thylacoïdes perdent complètement leur activité à 40 °C en absence de  $\text{Cl}^-$  alors que la présence de NaCl ou de  $\text{CaCl}_2$  maintient l'activité aux températures élevées à pH 7.8. (Venediktov et Krivoshejeva, 1984).

Les modifications au niveau du pH et de la concentration des sels affectent les charges électrostatiques de la membrane et peuvent influencer la conformation des protéines et par conséquent changer leur activité fonctionnelle et leur température de dénaturation (Critchley et Copra, 1988).

Les températures élevées induisent donc des changements importants à l'organelle chloroplastique. Les transitions de phase lipidiques augmentant la fluidité membranaire et les modifications conformationnelles causant la destruction de la membrane thylacoïdienne troublent la perméabilité hautement sélective et conduisent à la perte de l'intégrité fonctionnelle de l'appareil photosynthétique.

#### **1.4 Acclimatation de l'appareil photosynthétique aux températures élevées**

La protection thermique est définie comme étant la capacité des organismes à tolérer les hautes températures normalement létales après une exposition initiale à une température sublétale, induisant la synthèse de protéines de choc thermique (Krisman et al., 1988).

L'impact des hautes températures sur la photosynthèse dépend du génotype des plantes, de leurs conditions de croissance, du régime thermique de leur habitat et de leur état physiologique. Des plantes exposées ou croissant à des températures modérément élevées ont un appareil photosynthétique dont la stabilité thermique est plus grande que des plantes ayant poussé à de basses températures (Chaisompongpan et al., 1990). La capacité des plantes à s'adapter à des températures modérément élevées (limitant les



dommages du stress thermique) et l'habileté de recouvrement à ce stress sont des facteurs importants dans la détermination de la performance des plantes dans un environnement de températures élevées (Chaisonpongpan, 1990). De même, les vieilles plantes seront moins aptes à s'adapter à des climats plus chauds.

L'acclimatation des plantes à la chaleur est associée à la réorganisation membranaire des thylacoïdes conduisant à améliorer leur thermostabilité. Dans la partie qui suit, les transformations que subit le chloroplaste lorsqu'il devient acclimaté aux hautes températures seront abordées.

#### **1.4.1 Viscosité et fluidité**

Il est possible in vitro de stabiliser les membranes photosynthétiques et de leur conférer une résistance aux températures sublétales en changeant la viscosité du milieu. Quelques solutés tels que les sucres, certains acides aminés comme l'aspartate à pH 6 et la glutamate à pH 7, le diméthyl sulfoxide et l'éthylène glycol sont capables de stabiliser la membrane aux températures élevées (Al-Khatib et Wiest, 1990).

Cette augmentation de la viscosité est également retrouvée in vivo durant l'acclimatation. Des expériences ont

démontré qu'un transfert des plantes de 20 à 45 °C modifiait rapidement leur viscosité alors que la fluidité lipidique diminuait pour ce même transfert (Raison et Berry, 1979). D'autres expériences ont indiqué qu'il n'y a pas de transition de phase affectant l'ordre moléculaire des lipides lorsque survient l'adaptation (Miss et Meena, 1986). On peut alors expliquer ce phénomène par un changement au niveau des forces hydrophiles et hydrophobes dans les membranes.

#### **1.4.2 Effet des ions sur l'adaptation du chloroplaste**

La présence des ions est indispensable pour la thermostabilité de l'appareil photosynthétique. Par exemple, le  $\text{Cl}^-$  semble être grandement impliqué dans la protection à l'inactivation thermique du PSII. Sa présence augmente de 5 °C la température de demi-inactivation du PSII, celle-ci passant de 42 °C à 47 °C (Critchely et Copra, 1988).

De plus, il semble que la pression osmotique peut contribuer à rendre les plantes tolérantes à des températures très chaudes. Ainsi, les plantes désertiques sont de six à neuf degrés plus résistantes à la fin de la saison de croissance estivale qu'à son début, grâce à l'augmentation de la concentration de petites molécules (Seemann et al., 1986).

### 1.4.3 Accumulation de lipides spécifiques

L'adaptation des plantes est caractérisée par une accumulation de digalactosyl diacylglycérol (DGDG), spécialement le 18:1/ 16:0 qui représente alors jusqu'à 16% de la masse moléculaire des DGDG (Yordanov et al., 1986). Le rapport de monogalactosyl diacylglycérol (MGDG) sur DGDG diminue de 1.3 dans les plantes contrôles à 0.9 dans les plantes adaptées à la chaleur (Süss et Yordanov, 1986).

Ces chercheurs ont suggéré que la synthèse de DGDG prenait place dans la membrane externe du chloroplaste au site de formation des DGDG à partir des MGDG par la UDG-galactose (MGDG galactoyltransférase). La biosynthèse des galactolipides semble être contrôlée par des facteurs de régulation qui sont faiblement attachés à la membrane externe. Ainsi, les changements induits par la chaleur à ces facteurs, et/ou les transitions de phases lipidiques dans l'environnement externe, pourraient causer l'activation enzymatique. Cependant, l'accumulation de composés pourrait avoir le même effet, particulièrement si on considère que la synthèse accélérée des DGDG représente l'adaptation lente des plantes aux hautes températures. Ainsi, les protéines cytoplasmiques du choc thermique qui s'accumulent à ces températures pourraient fonctionner comme enzymes effecteurs à la surface du cytoplasme de la membrane externe du

chloroplaste où se trouve liée la MGDG galactosyltransférase (Süss et Yordanov, 1986).

Il ne fait plus aucun doute que l'intérieur du chloroplaste acquiert un contrôle métabolique sous un stress thermique puisque la formation de DGDG ne peut être accomplie sans l'activation concomitante de la synthèse de MGDG. Probablement que l'effet protecteur des DGDG est associé à leur capacité à former des bicouches contrairement aux MGDG. De plus, il semblerait que la diminution du rapport MGDG/DGDG et les espèces DGDG contenant des acides gras saturés conduiraient à la diminution de la fluidité des membranes thylacoïdiennes aux températures supraoptimales (Yordanov et al., 1986).

Cependant, chez les plantes désertiques telle que Jojoba, 5 min d'exposition à la chaleur résultent dans l'augmentation des MGDG alors qu'à 25 °C ce sont les DGDG les espèces qui dominent. Ce changement correspond à l'augmentation de la fluidité membranaire et à des réarrangements moléculaires dans les membranes thylacoïdiennes des Jojoba. Suivant le choc thermique, l'augmentation du lipide MGDG 18:3/18:3, un lipide étroitement impliqué dans l'activité photosynthétique, pourrait être le stimulus apportant l'efficacité des

photosystèmes des chloroplastes chez les plantes désertiques. (Guillot-Salomon et al., 1989).

#### 1.4.4 Protéines du choc thermique

Yordanov et Süss (1986) ont étudié les changements dans la composition polypeptidique du stroma du chloroplaste des plantes servant de contrôles et des plantes adaptées à la chaleur. La fraction soluble des protéines chloroplastiques des plantes adaptées contenait, en plus des polypeptides retrouvés normalement, des composés accumulés sous l'effet de la chaleur. En effet, dix-neuf protéines de choc thermique (HSP) ont été signalées dont douze de haut poids moléculaire : 105, 96, 86, 80, 74, 72, 71, 67, 44, 42, 36 et 35 kDa, et sept de faible poids moléculaire : 27, 22, 21, 19, 18, 14 et 13 kDa.

Cependant, des expériences utilisant des méthodes de purification différentes n'ont pas détecté autant de protéines du choc thermique localisées dans l'organelle chloroplastique. Dans le procédé de purification au Percoll, trois protéines de haut poids moléculaire et six de faible poids moléculaire ont été retrouvées alors qu'à l'aide d'une purification selon un gradient de densité au sucrose, on ne

détecte que sept protéines du choc thermique (Restivo et al., 1986).

Les protéines du choc thermique sont synthétisées dans le cytoplasme de la cellule et transportées dans le chloroplaste par les ribosomes liés aux membranes. Vierling et ses collaborateurs (1986) ont étudié la synthèse de ces protéines. En présence d'un inhibiteur de la synthèse protéique du chloroplaste, le chloramphénicol, la production des protéines du choc thermique était in affectée. Cependant, lorsqu'on utilisait le cycloheximide pour inhiber la synthèse protéique des ribosomes cytoplasmiques, la plupart des protéines, incluant les protéines du choc thermique n'étaient pas synthétisées. Ces données montrent que la plupart des protéines du choc thermique sont synthétisées dans le cytoplasme et qu'une partie de celles-ci est transportée dans le chloroplaste et intégrée aux membranes thylacoïdiennes.

Ces protéines synthétisées en réponse à un stress thermique confèrent probablement la résistance contre la chaleur à l'appareil photosynthétique. Les niveaux de protéines de choc thermique dans les chloroplastes restent inchangés durant les premières douze heures suivant le stress (Vierling et al., 1989). Cette longue période de stabilité post-traumatique suggère que les protéines du choc thermique

des chloroplastes sont nécessaires non seulement durant le stress mais aussi pour le processus de recouvrement. La synthèse de ces protéines augmente avec la température pour atteindre un maximum à 39-40 °C et diminue lorsque la température redescend à 25 °C (Kobza et Edwards, 1987).

Les classes de protéines de choc thermique de haut poids moléculaire, i.e. HSP90, HSP60, HSP70 et les homologues HSP70 sont situées dans la membrane externe et le stroma du chloroplaste. Elles sont présentes sous des conditions normales de croissance (Marshall et al., 1990). Le niveau d'homologues HSP70 chloroplastiques ne semble pas changé après un stress thermique et aucun nouveau homologue HSP 70 n'est détecté après le traitement thermique (Marshall et al., 1990). Contrairement aux protéines de choc thermique de haut poids moléculaire, les protéines de choc thermique de faible poids moléculaire (21 à 24 kDa) ne sont pas présentes durant une période ne comprenant pas de stress thermique mais sont rapidement accumulées sous l'effet d'un stress à la chaleur (Vierling et al., 1986). La vitesse de synthèse de protéines du choc thermique dans les plantes et les autres eucaryotes est directement proportionnelle à la température du stress appliqué (Chen et al., 1990).

Krisman et ses collaborateurs (1988) ont étudié la synthèse des protéines du choc thermique de deux variétés différentes de blé, soit Mustang et Sturdy. Ces deux espèces ont acquis une thermotolérance différente. L'étude de ces chercheurs portait sur la différence génotypique qui pourrait influencer l'habileté à tolérer les hautes températures. Ils ont retrouvé chez Mustang plus de protéines du choc thermique de faible poids moléculaire (16, 17 et 26 kDa) que chez Sturdy. Cette dernière espèce s'est avérée la plus sensible au stress thermique. L'analyse des gels à deux dimensions démontre que non seulement les changements quantitatifs mais aussi qualitatifs influencent les niveaux de tolérance thermique entre les Mustang et Sturdy. Ils suggèrent donc que les différences génotypiques peuvent corrélérer avec les variations dans la synthèse des protéines du choc thermique de faible poids moléculaire et dans l'acquisition de la tolérance thermique.

On peut alors comparer la réponse photosynthétique des plantes adaptées et des plantes non acclimatées. Les plantes thermotolérantes présentent des feuilles primaires plus petites que les contrôles et ont également un contenu en chlorophylle a et b plus faible. Leur activité photosynthétique est également affaiblie comparativement aux contrôles. Par contre, aucune d'entre elles ne meurent à



50 °C alors que chez les plantes non adaptées, plus de 80% d'entre elles subissent des dommages irréversibles à cette même température (Süss et Yordanov, 1981).

On peut alors se demander si la présence de protéines du choc thermique est la seule caractéristique responsable de cette adaptation et si elle gouverne les transformations survenant au niveau du chloroplaste lors de son acclimatation. Il n'existe encore aucune explication quant au mode de fonctionnement de ce mécanisme de protection. Cependant, des études futures tenteront d'élucider ce phénomène. Il faut ajouter également que la synthèse des protéines du stress thermique ne représente qu'un mécanisme de protection à court terme. Les plantes désertiques ont développé des moyens de défense spécifiques tant au niveau des constituants de leur appareil photosynthétique que de leur fonction.

## CHAPITRE 2

### MATERIEL ET METHODES

#### 2.1 Préparation des membranes enrichies en photosystème I

L'isolement des membranes de PSI se fait selon une modification de la méthode décrite par Peters (1983). A partir de 100 g de feuilles d'épinard, une homogénéisation est produite dans un tampon tricine-KOH 50 mM pH 7.8, sorbitol 400 mM, KCl 10 mM, NaCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM et PMSF 1 mM à l'aide d'un homogénéisateur commercial (Fisher Scientific CO limitée, Mtl, Canada). Cette homogénéisation est suivie d'une filtration à travers plusieurs couches de coton fromage. Un culot est obtenu après une centrifugation de 5 min à 3000 X g. Ce culot est incubé quelques minutes dans 30 mL de tampon tricine-KOH 20 mM pH 7.8, MgCl<sub>2</sub> 10 mM. Par la suite, 30 mL de tampon tricine-KOH 20 mM pH 7.8, sorbitol 500 mM, KCl 20 mM, NaCl 20 mM sont ajoutés au milieu qui est alors centrifugé 5 min à 3000 X g. Les thylacoïdes ainsi obtenus sont suspendus dans un tampon tricine-KOH 20 mM pH 7.8, sorbitol 250 mM, KCl 10 mM, NaCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM pour obtenir une concentration en chlorophylle de 2 mg/mL. Afin de briser ces thylacoïdes, 0.2 % de

digitonine est ajoutée au milieu qui est alors incubé 30 min à 4 °C à l'obscurité sous agitation continue, suivi d'une centrifugation à 36 000 X g pendant 30 min. Le surnageant recueilli est centrifugé à 100 000 X g pendant une heure. Le culot final est alors resuspendu dans un tampon tricine-KOH 20 mM pH 7.8, KCl 10 mM, NaCl 10 mM et MgCl<sub>2</sub> 5 mM. La concentration en chlorophylle est déterminée selon la méthode de Arnon (1949).

## **2.2 Mesures de la consommation d'oxygène par polarographie**

L'appareil est composé d'un moniteur YSI modèle 53 (Fisher Scientific CO limitée, Mtl, Canada) relié à une électrode de type Clark, d'un bain thermostaté Cole Parmer 1268-14 (Cole Parmer Instrument CO, Chicago, Illinois, USA) contrôlant la température à 22 °C, un engistreur Linear modèle 555 (Baxter, division Canlab, Pointe-Claire, Canada), une cellule contenant 3 mL de solution et enfin, une lampe quartz-halogen (lumière blanche saturante, 250 mW/cm<sup>2</sup>). L'électrode est formée d'une anode d'argent et d'une cathode de platine jointes par un pont d'électrolytes (KCl) et à son extrémité, est située une membrane perméable à l'oxygène.

Sous illumination, le PSI induit le transport d'électrons. En appliquant un potentiel suffisant entre

l'anode et la cathode, il y a formation de peroxyde d'hydrogène provenant de l'oxygène réduit à la surface du platine de l'électrode. La perte des électrons au niveau du platine au profit de l'oxygène contribue à dissiper la différence de potentiel entre l'anode et la cathode. Le courant électrique, dirigé vers l'enregistreur, est donc directement proportionnel à la consommation d'oxygène survenant à la cathode. Si le milieu est bien mélangé, ce courant est une mesure de l'activité photosynthétique du PSI.

Deux séries d'expériences ont été effectuées par cette méthode. L'une consistait à vérifier l'effet des sels sur l'activité du PSI. Pour ce faire, le PSI était resuspendu dans un tampon tricine-KOH 20 mM pH 7.8. Les différentes concentrations de sels étaient ajoutées lors des incubations à différentes températures. Ces mêmes tampons servaient aux mesures de la consommation d'oxygène dans la cellule. L'autre avait pour but de déterminer l'effet de plusieurs donneurs sur l'activité du PSI. Dans ce cas-ci, le tampon utilisé était celui de la resuspension finale lors de l'extraction du PSI.

Cette méthode requiert l'utilisation d'un couple donneur-accepteur afin de mesurer l'activité photosynthétique. Les donneurs d'électrons utilisés sont le

DCIP, le DAD, le PMS réduits par l'ascorbate, la DQ réduite selon la méthode mentionnée ci-dessous et le DEDTC. L'accepteur d'électrons est le MV (0.5 mM), et le sodium azide (0.8 mM) est utilisé pour inhiber la catalase présente dans le milieu. Tous ces produits chimiques proviennent de chez Sigma Chemical Co. St-Louis, MI, USA. La concentration de chlorophylle utilisée pour ces mesures est de 11 µg/mL.

### 2.3 Incubation des échantillons

Tous les échantillons utilisés en polarographie ont été incubés au préalable à 25 °C, à 50 °C (stress thermique) ou à différentes températures lorsque l'expérience consistait à faire varier la température. Les incubations se faisaient dans un bain thermostaté Haake AB1 à l'obscurité pendant 5 min dans le tampon de resuspension ou celui contenant les différents sels pour un volume total de 75 µL. Ce volume de 75 µL est ajouté à 3 mL du même tampon dans la cellule. Au niveau de la cellule, les mesures se prennent à 22 °C, puisque des expériences ont prouvé que l'activité observée après une incubation à 50 °C ne varie pas, même après un transfert d'une heure à 25 °C .

## 2.4 Réduction de la duroquinone

A une solution de DQ (25 mM) dissoute dans un mélange 1:1 d'éthylène glycol:éthanol sont ajoutés 2 mg de borohydrure de sodium. Après 5 min de réaction à 4 °C, on ajoute 5 µL d'acide chloridrique concentré afin de stabiliser l'hydroquinone formée et de décomposer le borohydrure de sodium restant.

## 2.5 Mesures de la consommation d'oxygène par photoélectrochimie

La cellule photoélectrochimique a été construite en apportant des modifications au modèle proposé par Allen et Crane (1976). Cette cellule contient trois électrodes : une électrode de travail de platine (0.025 mm d'épaisseur) (Fig. 4 f) est placée entre le joint de caoutchouc (Fig. 4 c) et la base thermostatée (Fig. 4 g), une contre-électrode de platine (0.05 mm d'épaisseur) (Fig. 4 d) est installée sur le joint de caoutchouc de façon à ce qu'un seul de ses coins dépasse à l'intérieur de la chambre (Fig. 4 e) et enfin une électrode de référence au calomel située dans le canal (Fig. 4 b) de la cellule. La chambre fait 1 cm de diamètre et 0.1 cm d'épaisseur et peut contenir un volume total de 80 µL. Le canal permet l'ajout de la solution de PSI et le maintien du contact entre la solution photosynthétique et l'électrode

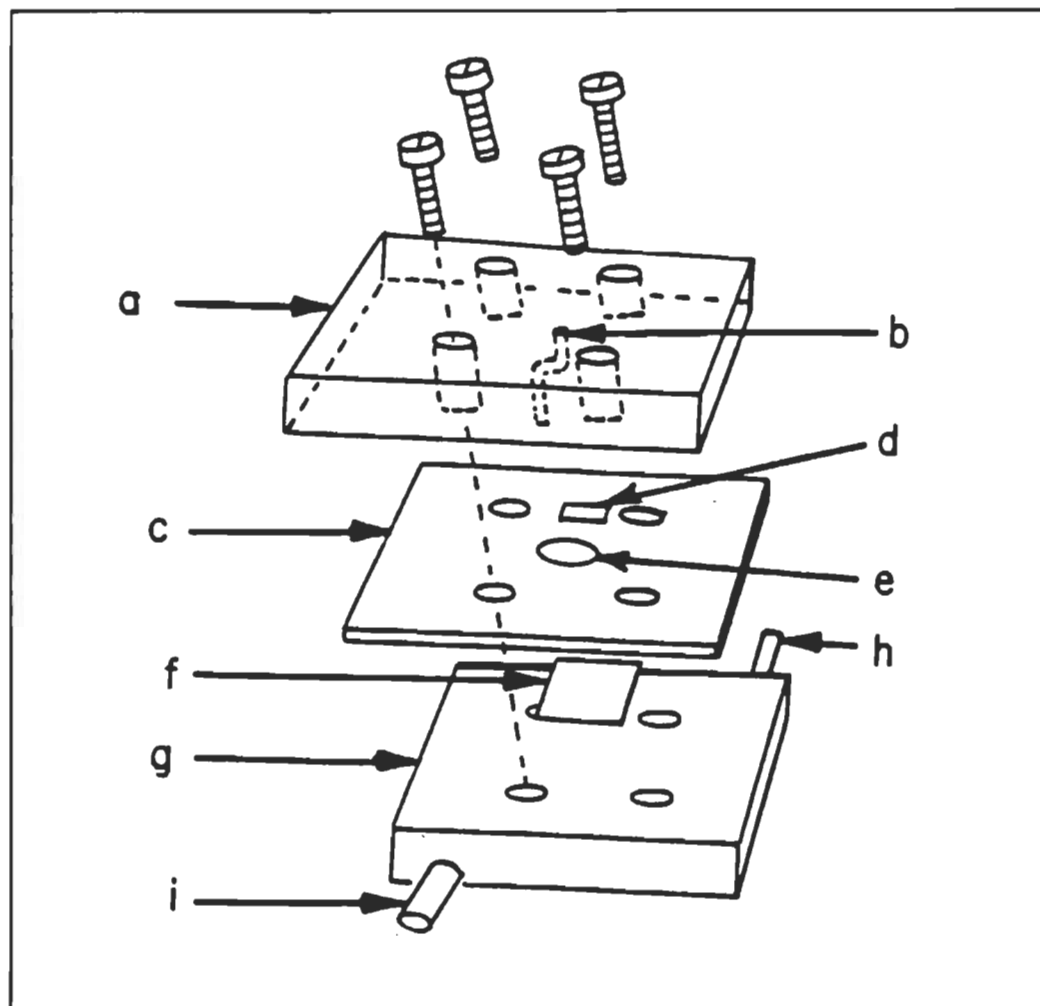


FIGURE 4 : Schéma de la cellule photoélectrochimique  
(Purcell et Carpentier 1990)

- a) couvercle de plexiglasse (6 x 5 x 1 cm)
- b) canal pour l'électrode de référence
- c) join de caoutchouc (6 x 5 x 0.1 cm)
- d) contre-électrode de platine (1 x 0.2 cm)
- e) chambre de la cellule (0.1 cm x 1 cm de diamètre)
- f) électrode de travail de platine (1 x 1 cm)
- g) base thermostatée
- canaux (h = int. et i = ext.) permettant la circulation de l'eau

au calomel. La température demeure constante grâce à la circulation de l'eau dans la base thermostatée reliée à un bain thermostaté Haake A80 à 22 °C. La lumière blanche provient d'une lampe quartz-halogène (350 W) et est dirigée directement sur la cellule par une fibre optique.

Un potentiel de 0.75 V vs SCE est appliqué à l'électrode de travail (par un potentiostat Princeton Applied Research modèle 362), tel que lu par l'électrode de référence. Sous illumination, le PSI réduit les molécules d'oxygène par l'intermédiaire du MV pour former les ions superoxydes. Ces derniers réagissent spontanément pour produire le peroxyde d'hydrogène qui réduit l'électrode de travail, produisant ainsi le photocourant (Carpentier et al., 1989).

La concentration de chlorophylle utilisée en électrochimie est de 250 µg/mL, le donneur d'électrons employé est la DQ (0.5 mM) réduite selon la procédure décrite ci-haut et l'accepteur est le MV à 0.5 mM. Le temps d'équilibration est d'environ 5 min. Le tampon utilisé est Tricine-KOH 20 mM pH 7.8, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 1mM, KCl 1 mM.



## 2.6 Immobilisation des membranes de photosystème I

L'immobilisation se fait dans une matrice de glutaraldéhyde-albumine selon une procédure décrite par Thomasset et ses collaborateurs (1982). Le PSI frais (0.6 mL de PSI à 3.3 mg/mL) est mélangé à un tampon tricine-KOH 20 mM pH 7.8, NaCl 10 mM, KCl 10 mM et MgCl 5 mM; 1.25 mL d'albumine de sérum bovin à 20 % et 1 mL de glutaraldéhyde à 1.5 % pour une concentration finale de glutaraldéhyde de 0.33 %. Le milieu est mélangé et distribué en aliquots de 75  $\mu$ L qui sont congelés pendant 2 h à -20 °C. Après cette congélation, ils sont transférés à 4 °C et sont maintenus à cette température jusqu'à leur utilisation. Avant chaque mesure, les échantillons sont broyés dans un mortier.

## CHAPITRE 3

### RESULTATS ET DISCUSSION

#### 3.1 Origine de la stimulation thermique dans les fractions membranaires de photosystème I

Le premier objectif visé par ce projet de recherche était de vérifier si les fractions membranaires de PSI subissaient une augmentation de leur activité sous l'effet d'un stress thermique *in vitro*. Pour ce faire, les membranes de PSI isolées ont d'abord été incubées 5 min à l'obscurité à température de la pièce (25 °C) et à température élevée (50 °C). Puis l'activité du photosystème a été mesurée par la consommation d'oxygène en présence de DCIPH<sub>2</sub>, comme donneur d'électrons, et de MV, comme accepteur d'électrons. La **figure 5** révèle les résultats obtenus à 25 et 50 °C pour différentes concentrations de DCIPH<sub>2</sub>. Les résultats démontrent qu'à 50 °C, on obtient une stimulation de l'activité du PSI d'environ trois fois en comparant à l'activité obtenue à 25 °C. Selon les préparations de PSI utilisées, on remarque que cette activation thermique du transport d'électrons du PSI peut atteindre jusqu'à quatre fois l'activité obtenue à 25 °C.

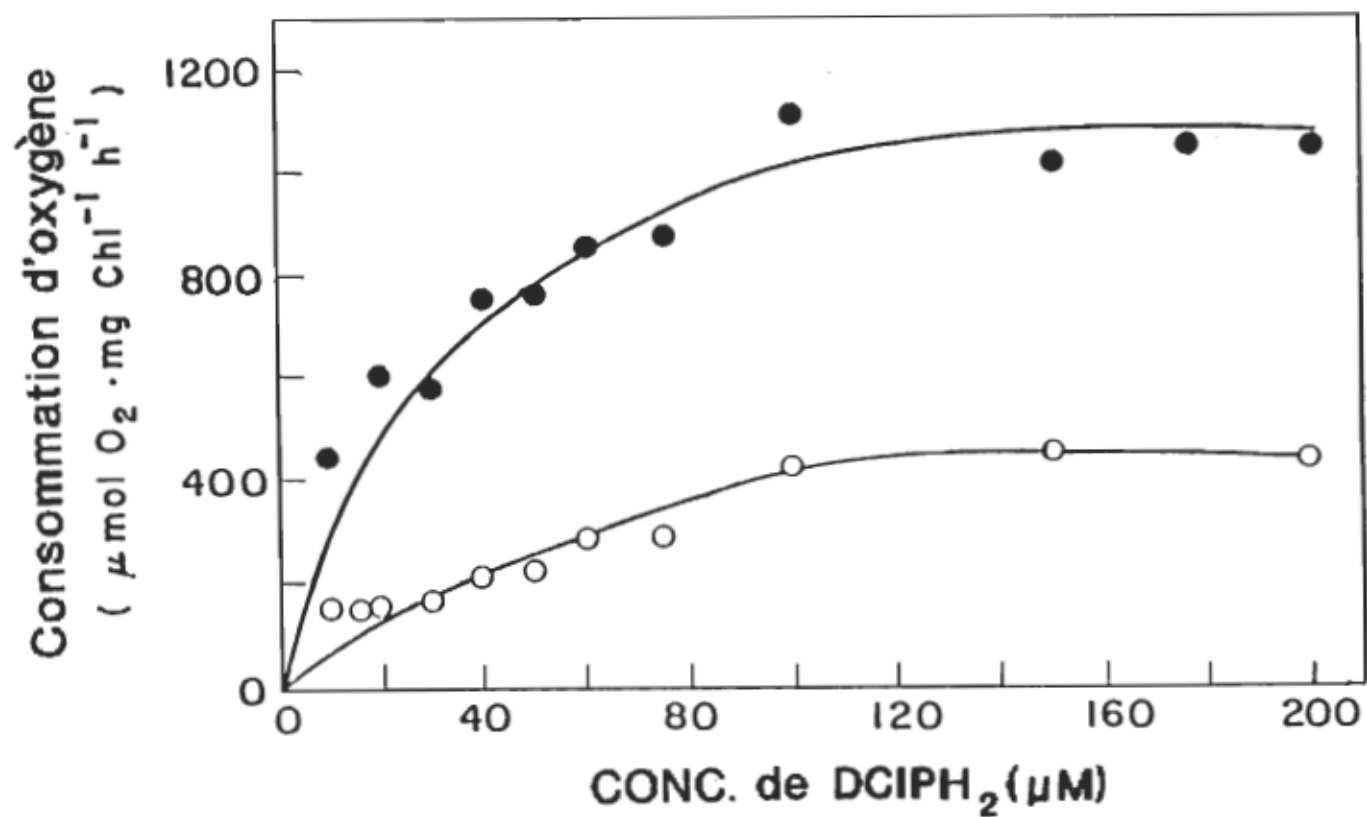


FIGURE 5 : Consommation d'oxygène obtenue en présence de DCIPH<sub>2</sub> dans les fractions membranaires de PSI incubées à 25 ou 50 °C

—○— 25 °C

—●— 50 °C

On peut également observer que la concentration de DCIPH<sub>2</sub> requise pour saturer le système est plus faible à 50 °C qu'à 25 °C (Fig.5). De plus, l'activité optimale est obtenue aux concentrations de DCIPH<sub>2</sub> supérieures à 100 µM pour les deux températures.

Le graphique de la double réciproque (Fig. 6) des valeurs obtenues à partir de la figure 5 montre que le K<sub>m</sub> est différent à 25 et 50 °C. Comme on peut le constater, les échantillons traités à la chaleur démontrent un K<sub>m</sub> inférieur et un V<sub>max</sub> supérieur à ceux retrouvés dans les contrôles (25 °C). On peut expliquer ces données soit par l'augmentation du nombre de sites d'oxydation du DCIPH<sub>2</sub> ou par l'augmentation de l'accessibilité du DCIPH<sub>2</sub> aux sites déjà existants.

Le fait d'observer une activation thermique au niveau des membranes de PSI isolées permet d'éliminer l'hypothèse d'Ivanov et de ses collaborateurs (1986). En effet, ces derniers spéculaient que l'origine de la stimulation thermique du transport d'électrons du PSI proviendrait de la dissociation du complexe pigment-protéine du PSII et de sa migration vers l'antenne du PSI. Cette hypothèse n'est ici plus valable puisque le complexe antennique du PSII n'est pas présent dans les fractions membranaires de PSI. Ainsi, la

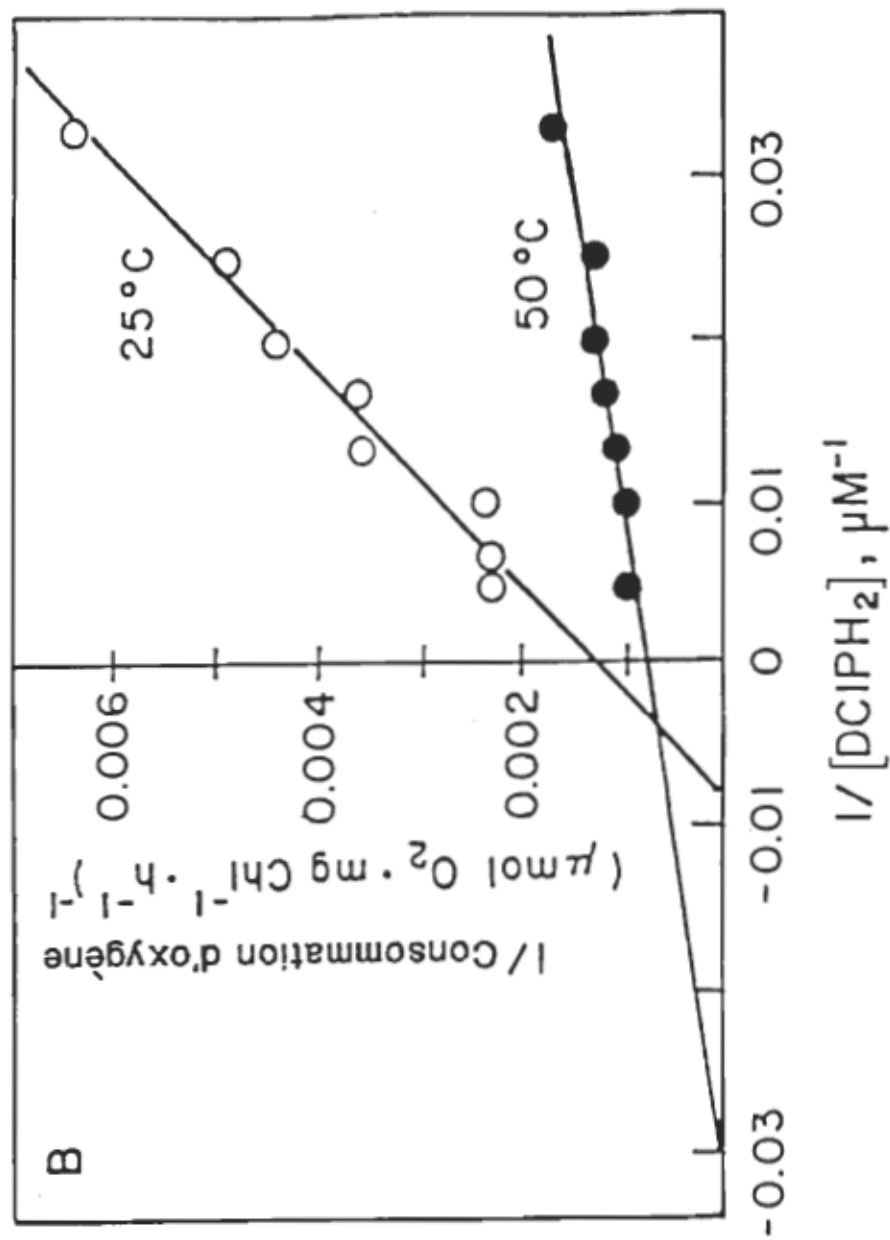


FIGURE 6 : Double réciproque des données de la figure 5

stimulation de l'activité du PSI, sous un stress thermique, pourrait être expliquée par un changement conformationnel au niveau du cytochrome  $b_6/f$ , tel que le préconisent Thomas et de ses collaborateurs (1986). Cependant, il est possible que la méthode d'extraction utilisée entraîne la contamination des fractions membranaires de PSI par des membranes de PSII qui n'auraient pas été enlevées lors du traitement à la digitonine.

Afin de déterminer si l'hypothèse de Thomas et ses collaborateurs (1986) est valable, la stimulation par le stress thermique de l'activité du PSI a d'abord été vérifiée au niveau des membranes de PSI immobilisées. De plus, à partir de membranes natives de PSI, différents donneurs d'électrons ont été utilisés afin de localiser le changement conformationnel.

### **3.1.1 Confirmation du changement conformationnel responsable de l'activation thermique par l'immobilisation des membranes de photosystème I**

Lorsque des fractions membranaires natives de PSI sont incubées 5 min à différentes températures et que le transport d'électrons est mesuré en présence de DCIPH<sub>2</sub>, on observe une stimulation de l'activité. Cette activation est optimale à 50 °C (Fig. 7).

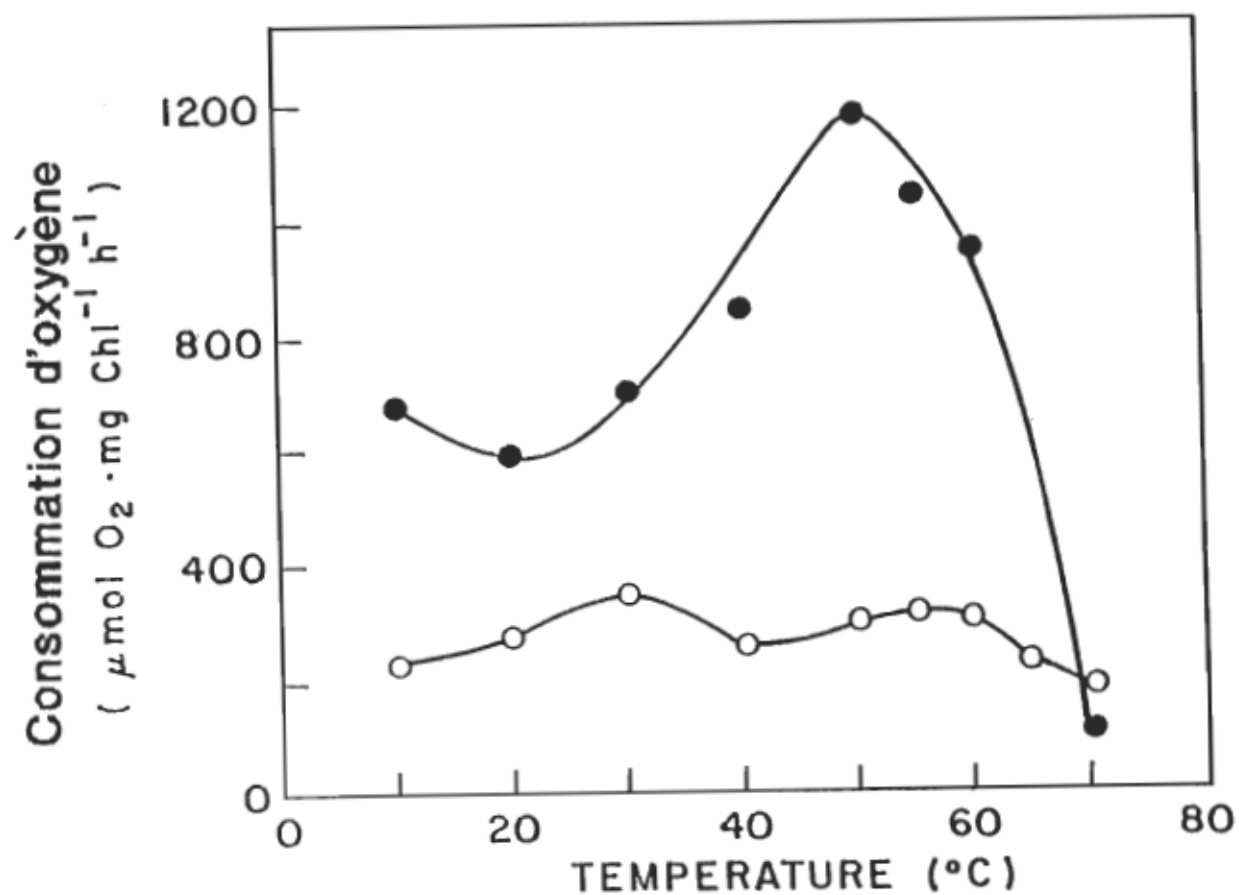


FIGURE 7 : Effet de la température sur l'activité des membranes de PSI natives et immobilisées, mesuré en présence de DCIPH<sub>2</sub>

—●— PSI natif      —○— PSI immobilisé

DCIPH<sub>2</sub> (100  $\mu\text{M}$ )

Cependant, lorsque des membranes de PSI sont immobilisées dans une matrice de glutaraldéhyde et d'albumine bovine, aucune stimulation n'est observée. L'immobilisation du matériel photosynthétique dans une telle matrice augmente la microviscosité du milieu. En effet, les molécules de glutaraldéhyde peuvent lier de façon covalente les polypeptides du PSI. L'augmentation de la microviscosité est également responsable de la perte de l'activité dans les préparations immobilisées. De plus, facteur important ici, elle restreint certains mouvements protéiques ce qui peut empêcher les changements conformationnels de survenir.

L'immobilisation ne crée pas de nouveaux sites d'oxydation pour le DCIPH<sub>2</sub> mais elle limite l'accès aux donneurs et accepteurs d'électrons aux sites respectifs de ces donneurs et accepteurs d'électrons (Bonenfant et Carpentier, 1989). Cependant, le DCIPH<sub>2</sub> et le MV ont été utilisés aux concentrations saturantes dans les membranes natives et immobilisées et donc ne limitent pas les mesures de consommation d'oxygène. Ainsi, l'absence de stimulation thermique observée dans les membranes immobilisées, causée principalement par l'augmentation de la microviscosité dans ces membranes, serait plutôt tributaire à l'inhibition des



modifications conformationnelles nécessaires à l'activation du transport d'électrons au niveau du PSI.

### 3.1.2 Localisation du changement conformationnel au niveau du cytochrome $b_6/f$ par l'utilisation de différents donneurs d'électrons

Au niveau de la littérature, la stimulation thermique du transport d'électrons du PSI n'avait été observée qu'en présence de DCIPH<sub>2</sub> comme donneur d'électrons et seulement dans les thylacoïdes entiers. Seul le TMPDH<sub>2</sub> fut utilisé comme autre donneur et aucune activation thermique n'avait été observée (Thomas et al., 1986). Comme le DCIPH<sub>2</sub> et le TMPDH<sub>2</sub> n'ont pas le même site d'oxydation au niveau du transport d'électrons, il devient intéressant de vérifier si une activation peut être obtenue avec différents donneurs n'ayant pas des sites d'oxydation identiques. L'utilisation de plusieurs donneurs d'électrons peut permettre de localiser le changement conformationnel responsable de la stimulation de l'activité du PSI sous un stress thermique.

Le premier donneur utilisé est le TMPDH<sub>2</sub>. Le site d'oxydation de ce donneur se situe au niveau de la plastocyanine (Golbeck et al., 1986). La **figure 8** présente les résultats obtenus lorsque les membranes de PSI sont incubées 5 min à 25 et 50 °C et que les mesures sont prises

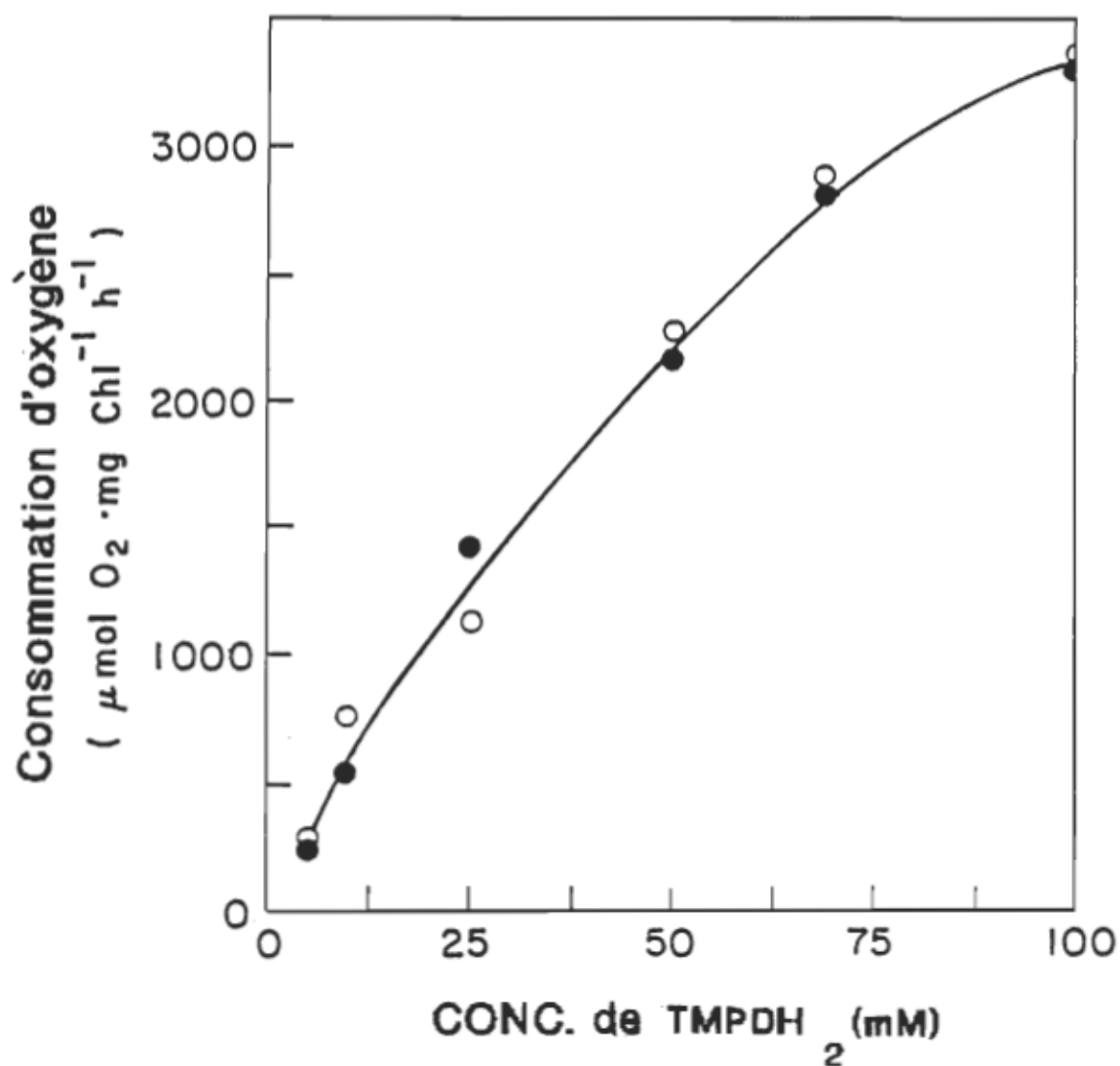


FIGURE 8 : Consommation d'oxygène obtenue en présence de TMPDH<sub>2</sub> dans les fractions membranaires de PSI incubées à 25 et 50 °C

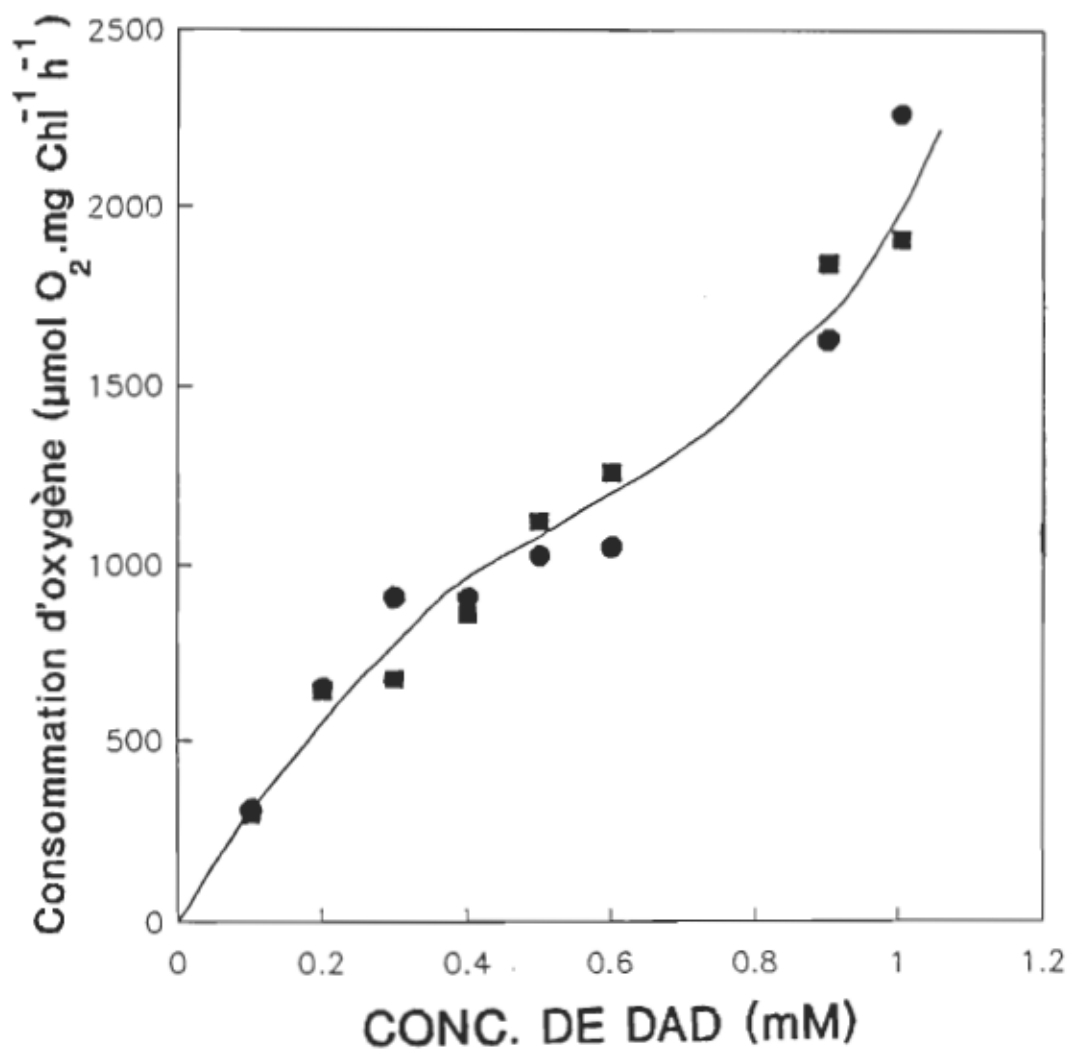
—○— 25 °C

—●— 50 °C

en présence de différentes concentrations de  $\text{TMPDH}_2$ . Tout comme les données obtenues avec les thylacoïdes entiers, la consommation d'oxygène mesurée en présence de  $\text{TMPDH}_2$  ne démontre pas de stimulation thermique. En effet, l'activité du PSI ne varie qu'en fonction de la concentration de ce donneur.

La **figure 9** indique les résultats obtenus lorsque le DAD agit comme donneur d'électrons. La localisation du site d'oxydation de ce donneur n'est pas encore bien définie. Effectivement, Golbeck et ses collaborateurs (1986) le situent autant au niveau de la plastocyanine qu'au niveau du complexe cytochromique  $b_6/f$ .

Les résultats que nous avons obtenus en présence de ce donneur se comparent à ceux observés en utilisant le  $\text{TMPDH}_2$  (Fig. 8). En effet, lorsque le DAD est utilisé comme donneur d'électrons, l'activité des fractions membranaires, incubées 5 min à 25 et 50 °C, n'est modifiée qu'en fonction de la concentration de ce donneur et ne présente pas de stimulation thermique. Ainsi, les donneurs d'électrons dont le site d'oxydation se situe au niveau de la plastocyanine ne permettent pas d'observer l'augmentation de l'activité du PSI sous l'effet d'un stress thermique. Le changement



**FIGURE 9 :** Consommation d'oxygène obtenue en présence de DAD dans les fractions membranaires de PSI incubées à 25 et 50 °C

—●— 25 °C

—■— 50 °C

conformationnel n'est donc pas situé au niveau de cette protéine cuivrique.

Le DEDTC, le PMS ainsi que la DQ sont reconnus comme étant des donneurs d'électrons au niveau du complexe du cytochrome  $b_6/f$  (Haehnel, 1984). La **figure 10** illustre les résultats obtenus lorsque le PSI est incubé 5 min à 25 et 50 °C et que les mesures de l'activité photosynthétique sont prises en présence de DEDTC. Les concentrations de ce donneur ont été exprimées en log molaire parce qu'elles variaient de 0.1 à 100 mM. On observe une activation thermique du transport d'électrons des membranes de PSI. En utilisant les valeurs obtenues pour une concentration de 100 mM de DEDTC à 25 et 50 °C, on obtient un facteur de stimulation de 1.7.

Les données obtenues en présence de PMS sont démontrées sur la **figure 11**. Une activation thermique de la consommation d'oxygène des membranes de PSI est détectée lorsque ce donneur d'électrons est employé. Un facteur de 1.1 peut être déterminé à partir des valeurs obtenues pour une concentration de 2 mM à 25 et 50 °C.

Une stimulation thermique de l'activité du PSI est également observée en présence de DQ lorsque ce photosystème est incubé 5 min à 50 °C (Fig. 12). Un facteur de

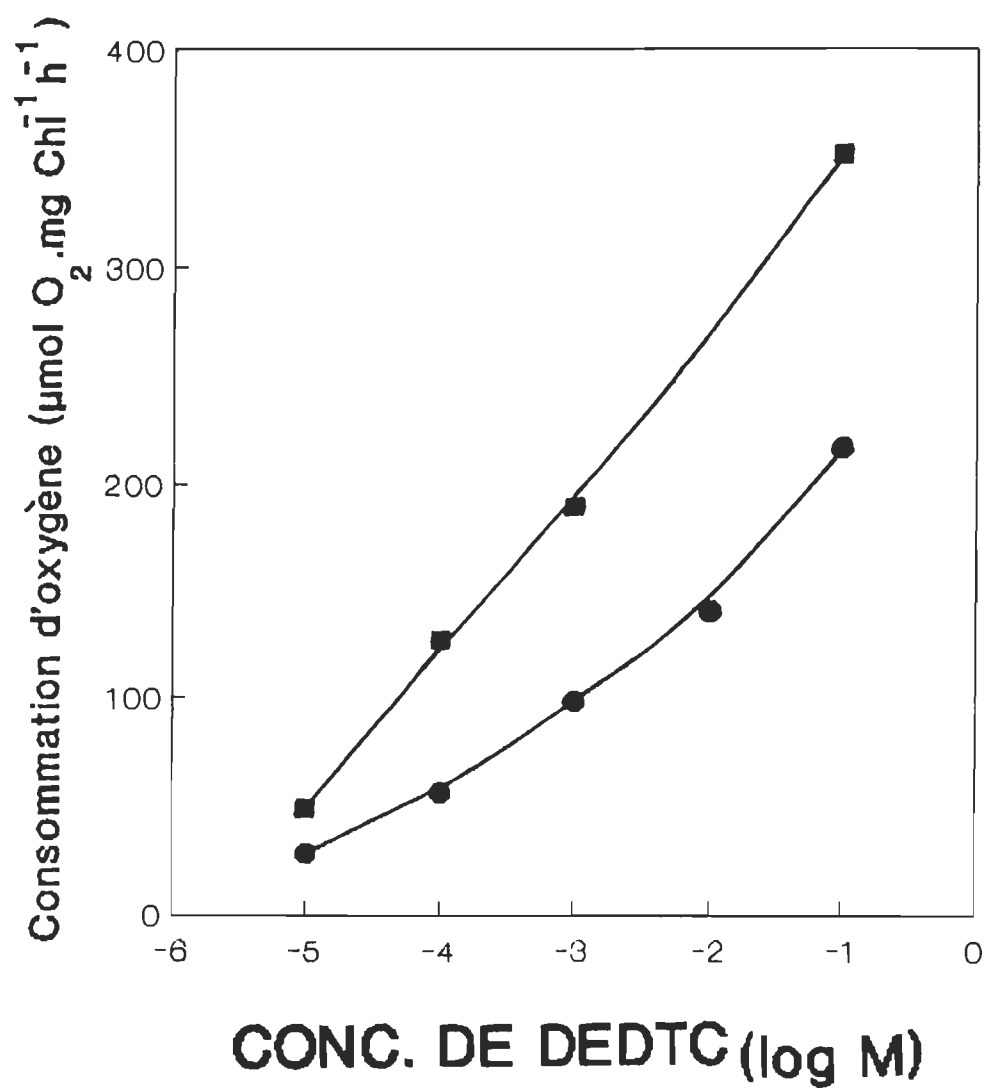


FIGURE 10 : Consommation d'oxygène obtenue en présence de DEDTC dans les fractions membranaires de PSI incubées à 25 et 50 °C

—●— 25 °C

—■— 50 °C

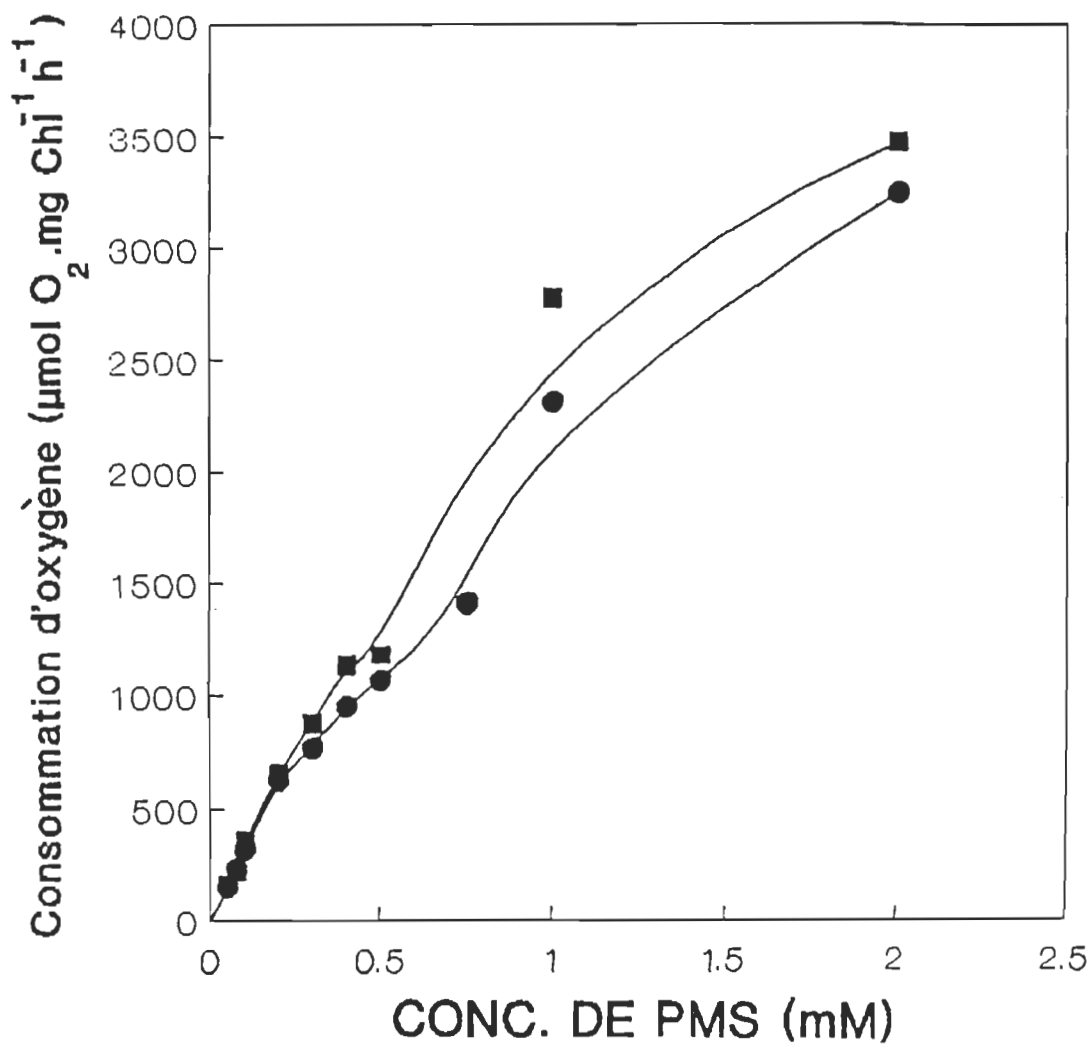


FIGURE 11 : Consommation d'oxygène obtenue en présence de PMS dans les fractions membranaires de PSI incubées à 25 et 50 °C

—●— 25 °C

—■— 50 °C

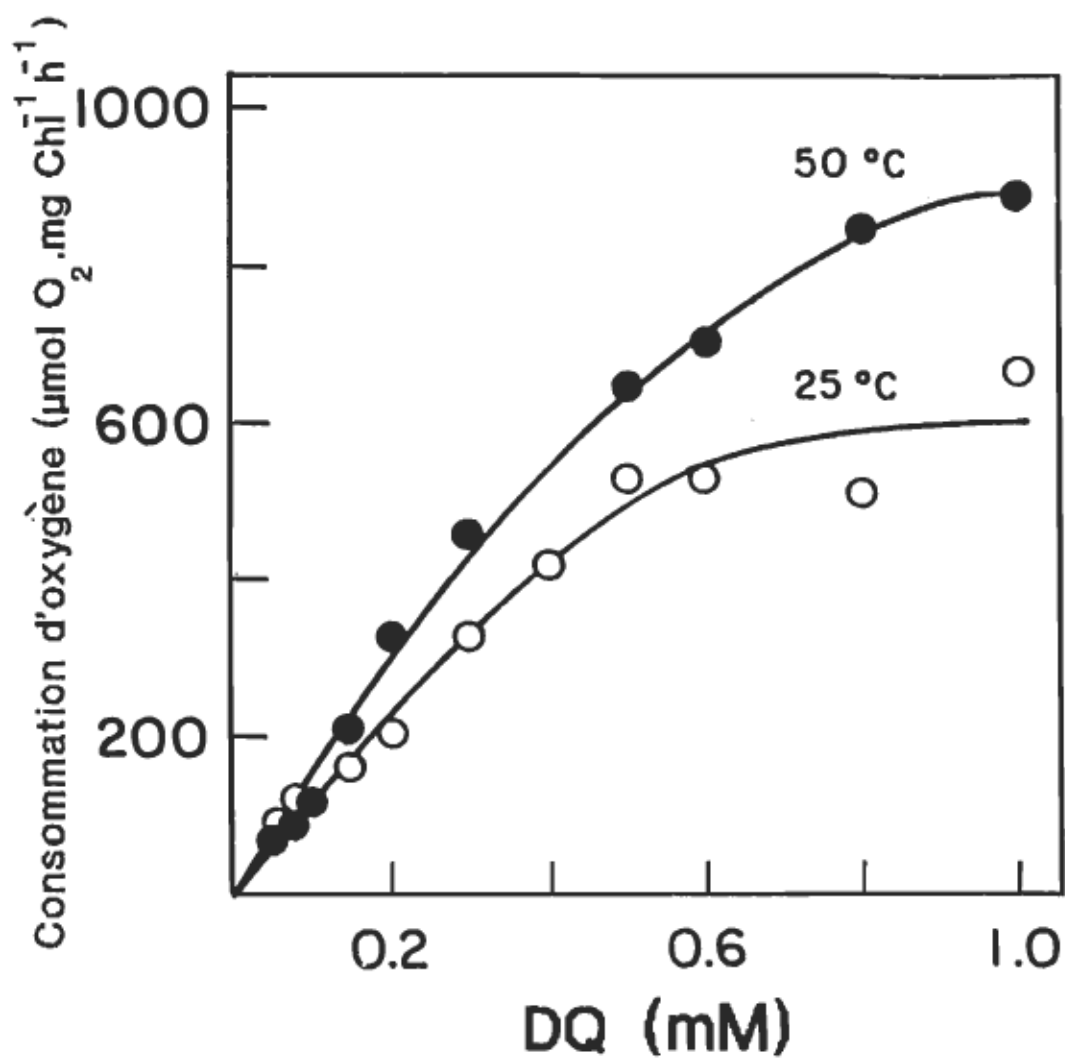


FIGURE 12 : Consommation d'oxygène obtenue en présence de DQ dans les fractions membranaires de PSI incubées à 25 et 50 °C



stimulation de 1.65 est calculé à partir des valeurs obtenues pour une concentration de DQ de 1 mM à 25 et 50 °C.

Le **Tableau 1** présente tous les donneurs d'électrons utilisés, leur site d'oxydation ainsi que le facteur de stimulation obtenu.

Donneur	Site d'oxydation	Facteur de stimulation
DCIPH <sub>2</sub>	cytochrome b <sub>6</sub> /f	2.6
TMPDH <sub>2</sub>	plastocyanine	-
DAD	plastocyanine	-
DEDTC	cytochrome b <sub>6</sub> /f	1.7
PMS	cytochrome b <sub>6</sub> /f	1.1
DQ	cytochrome b <sub>6</sub> /f	1.65

**Tableau 1. Site d'oxydation et facteurs de stimulation des donneurs utilisés**

D'après les données observés sur ce tableau, il semble que l'origine de l'augmentation thermique du transport d'électrons des membranes de PSI soit localisée au niveau du complexe du cytochrome b<sub>6</sub>/f. Ainsi, comme le préconisait Thomas et ses collaborateurs (1986), un changement conformationnel survenant au niveau du complexe cytochromique b<sub>6</sub>/f, suite à une exposition de 5 min à 50 °C des membranes de PSI, serait responsable de la stimulation de l'activité de ce photosystème. Si cette activation avait été causée par la dissociation du complexe périphérique du PSII et sa

migration vers l'antenne du PSI, dans le cas d'une éventuelle contamination des membranes de PSI par des membranes de PSII, alors peu importe les donneurs d'électrons utilisés, nous aurions observé une augmentation du transport d'électrons du PSI.

Les différents facteurs observés, selon les donneurs d'électrons utilisés, pourraient être dus au fait que le site d'oxydation de chaque donneur n'est pas situé au même endroit au niveau du cytochrome  $b_6/f$ .

On pourrait situer l'étape limitante du transport d'électrons au niveau du complexe cytochromique  $b_6/f$ , car une saturation du transport d'électrons est obtenue à partir des donneurs d'électrons agissant au niveau de ce complexe et qu'aucune saturation n'est observée avec les donneurs d'électrons au niveau de la plastocyanine. Ainsi, l'augmentation de la température permettrait de stimuler ce transport d'électrons au niveau du cytochrome  $b_6/f$ .

De plus, Gounaris et ses collaborateurs (1983) ont supposé qu'une réorganisation des lipides de la membrane thylacoïdienne pourrait apporter la stimulation thermique du transport d'électrons du PSI. Cette réorganisation lipidique pourrait modifier la liposolubilité des différents donneurs

utilisés influençant ainsi leur efficacité au niveau du transport d'électrons. Aucune expérience n'a été effectuée afin de vérifier cette hypothèse. Toutefois, elle ne contredit pas les résultats que nous avons obtenus.

### 3.1.3 Vérification de la température permettant la stimulation optimale

Etant donné qu'une augmentation de l'activité du PSI est observée en présence de donneurs d'électrons agissant au niveau du cytochrome  $b_6/f$ , nous avons vérifié si la température optimale était effectivement 50 °C, tout comme ce fut le cas lorsque le DCIPH<sub>2</sub> était utilisé (Fig. 7).

Le PMS ne fut pas testé puisque l'activation observée à 50 °C n'était pas suffisante (Fig. 11). Dans le cas du DEDTC, la consommation d'oxygène obtenue à 50 °C avec ce donneur s'est avérée la plus faible (Fig. 10), comparativement aux autres donneurs. De plus, une double réaction survient à l'électrode (Upham et Hatzios, 1986) le rendant moins apte qu'un autre donneur pour fin d'utilisation :



Le DEDTC réagit avec  $O_2^-$  mais on ne peut utiliser la SOD puisque le transport d'électrons du DEDTC au MV est inhibé (Upham et Hatzios, 1986).

Par contre, l'activité des membranes photosynthétiques du PSI mesurée en présence de DQ est activée par un facteur de 1.65 sous l'effet d'un choc thermique (Tab. 1). Ainsi, l'utilisation de ce donneur pour mesurer l'effet de la température s'avérait le meilleur choix. Les résultats obtenus lorsque les fractions membranaires de PSI sont incubées à différentes températures et que l'activité est mesurée en présence de ce donneur sont indiqués à la figure 13. On peut observer, sur cette figure, que la température permettant l'activité optimale se situe à 50 °C, soit la même température que celle retrouvée en utilisant le DCIPH<sub>2</sub>.

La littérature nous a toutefois révélé que la DQ était sensible à l'oxydation causée par le superoxyde formé en bout de chaîne du transport d'électrons en présence de MV, produisant ainsi un surplus de consommation d'oxygène (Isawa et Pan, 1978). Afin de vérifier si la stimulation par le choc thermique en présence de DQ était réellement due au changement conformationnel au niveau du cytochrome  $b_6/f$  ou à cette réaction survenant implicitement au cours de la mesure, il a fallu ajouter au milieu de la SOD. Cette enzyme réagit

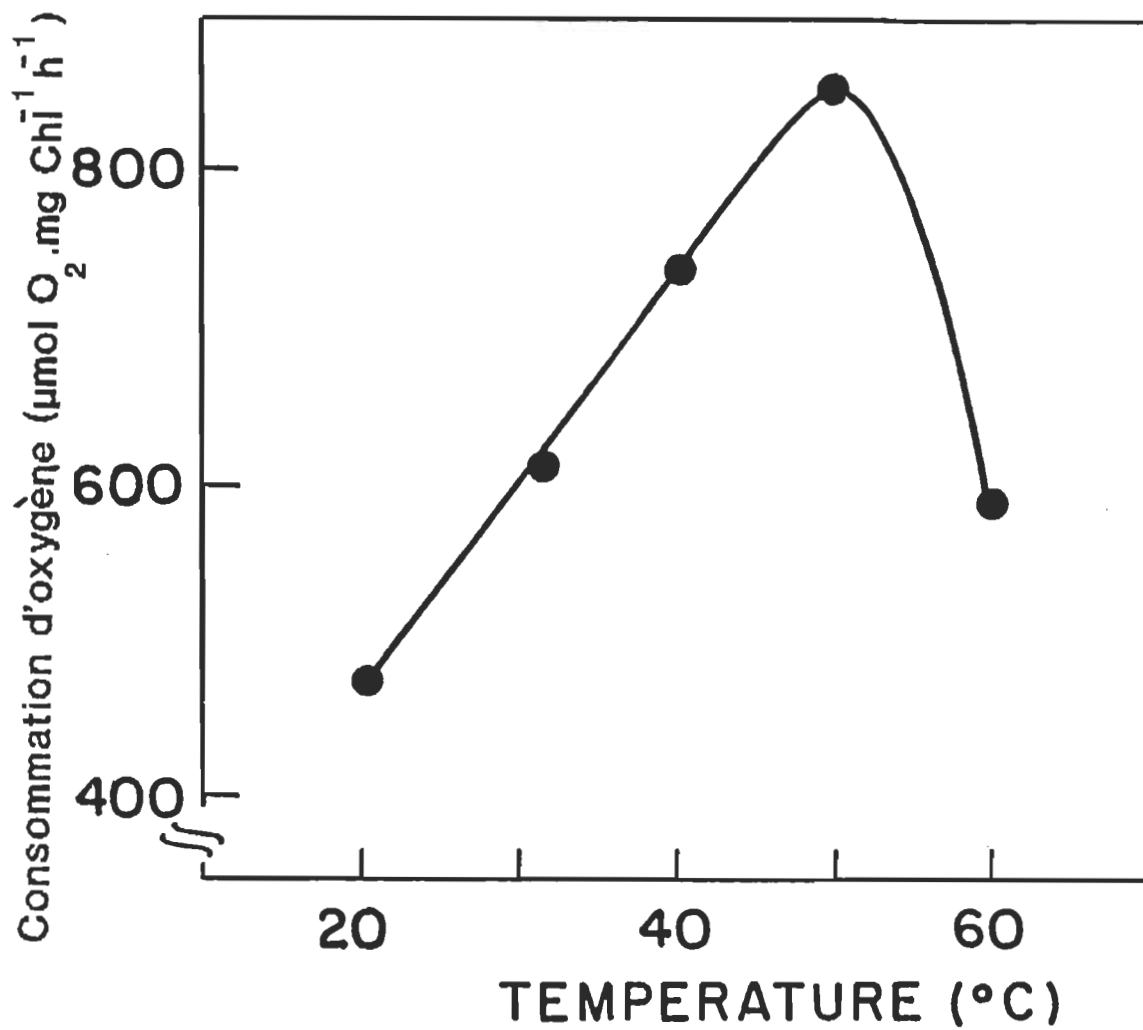


FIGURE 13 : Effet de la température sur l'activité des membranes de PSI mesuré en présence de DQ

DQ (0.5 mM)

avec les superoxydes formés afin de produire le peroxyde d'hydrogène. Cet ajout se faisait au moment de prendre la mesure. La **figure 14** illustre les résultats obtenus pour cette expérience. On peut constater que l'ajout de la SOD inhibe toute activation par le stress thermique, démontrant que la stimulation observée en présence de DQ n'était due qu'à l'oxydation de ce donneur par les superoxydes.

Izawa et Pan (1978) avaient observé que cette oxydation de la DQ par les superoxydes augmentait avec le pH pour atteindre une activité maximale à pH 8.0. Il semblerait, d'après nos résultats, que cette réaction soit également affectée par la température.

### 3.2 Effet des sels sur l'activation thermique

L'augmentation du transport d'électrons au niveau des fractions membranaires de PSI est affectée par la présence de sels lorsque le DCIPH<sub>2</sub> et le MV sont utilisés comme donneur et accepteur d'électrons.

L'effet de différents sels sur le transport d'électrons des fractions membranaires de PSI est illustré au **tableau 2**. On peut remarquer qu'en absence de sel, et pour une incubation de 5 min à 50 °C, on obtient une stimulation

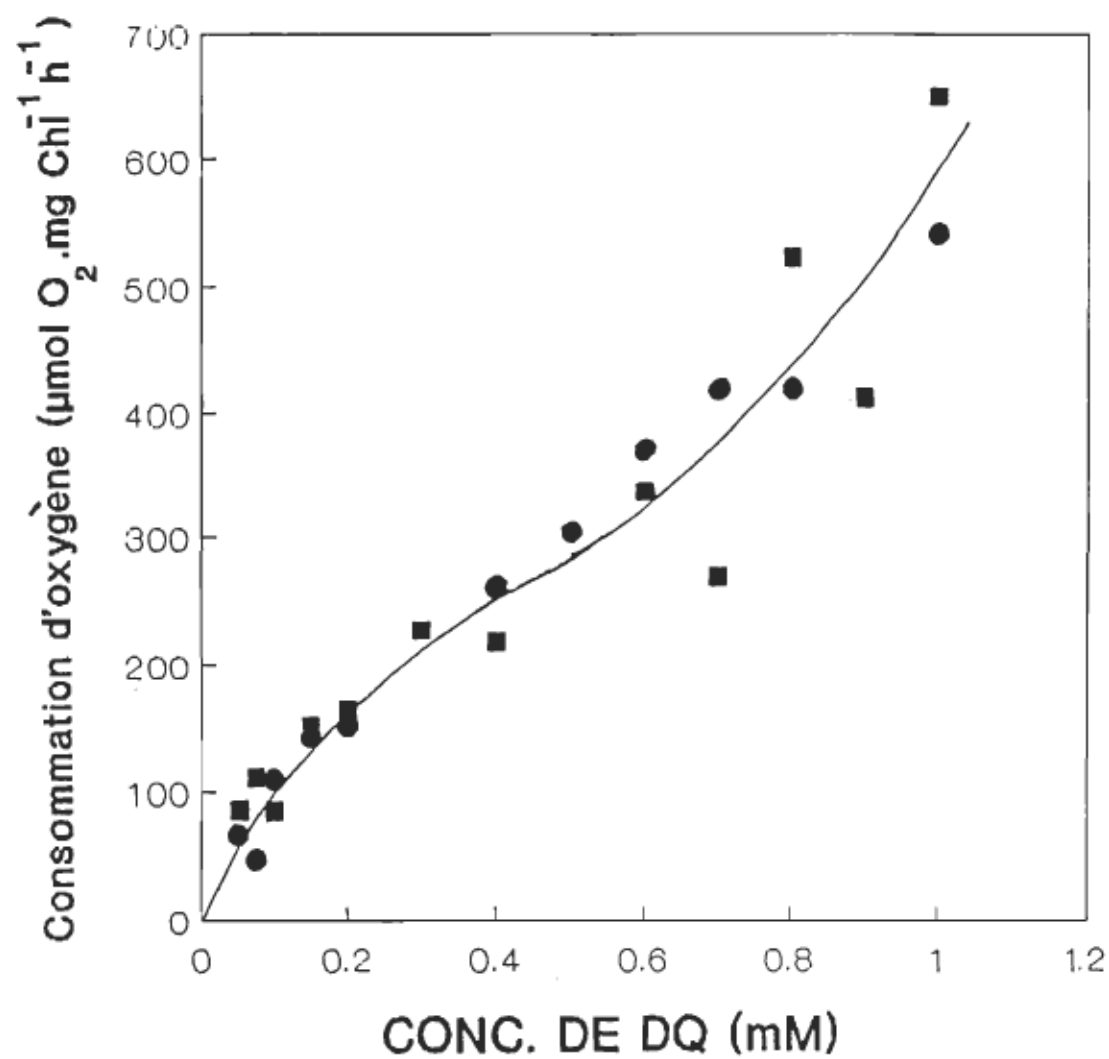


FIGURE 14 : Consommation d'oxygène obtenue dans les fractions membranaires de PSI en présence de SOD et de DQ

—●— 25 °C

—■— 50 °C

SOD (75 U/mL)

DQ (0.5 mM)

thermique de la consommation d'oxygène du PSI. Cependant, cette activation peut être augmentée si on incube les membranes de PSI en présence de certains sels. Les résultats présentés sur ce tableau indiquent qu'au niveau des ions divalents, c'est l'espèce  $Mg^{2+}$  qui est impliqué dans la stimulation par le stress thermique étant donné que le  $Mg(NO_3)_2$  est aussi efficace que le  $MgCl_2$  alors que le  $MnCl_2$  et le  $CaCl_2$  ne permettent pas une aussi grande activation. Le % de stimulation obtenu en présence de ces sels ( $MnCl_2$  et  $CaCl_2$ ) est inférieur à celui obtenu en leur absence (Tab. 2). Les ions monovalents  $K^+$  et  $Na^+$  sont aussi efficaces que le  $Mg^{2+}$  s'ils sont utilisés à des concentrations de 20 mM au lieu de 10 mM comme c'est le cas pour l'espèce divalente.

Sel	Conc. (mM)	Consommation d'oxygène ( $\mu\text{mol O}_2 \text{ mg chl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )		Stimulation (%)
		25 °C	50 °C	
aucun	—	329	802	144
$MgCl_2$	10	464	1531	230
$Mg(NO_3)_2$	10	333	1233	270
$MnCl_2$	10	423	872	106
$CaCl_2$	10	511	1103	115
$NaCl$	20	310	1049	235
$NaNO_3$	20	272	930	241
$KCl$	20	309	1033	236

Tableau 2. Effet de différents sels sur l'activité du PSI à 25 et 50 °C (le % de stimulation est calculé par rapport à 25 °C)



Selon l'hypothèse de Thomas et ses collaborateurs, l'activation thermique retrouvée lorsque le PSI est incubé en absence de sel serait due au changement conformationnel survenant au niveau du cytochrome  $b_6/f$ . L'effet stimulateur de l'activation thermique pourrait être expliqué par la stabilisation des charges de la surface membranaire par les ions, favorisant ainsi les changements conformationnels du complexe du cytochrome  $b_6/f$  impliqués dans la photooxydation du DCIPH<sub>2</sub>.

### **3.2.1 Effet du MgCl<sub>2</sub> sur l'activation thermique des membranes de photosystème I**

Afin d'approfondir les effets des sels sur le transport d'électrons au niveau du PSI, des échantillons sont préincubés à 25 et 50 °C dans un milieu contenant différentes concentrations de MgCl<sub>2</sub> (Fig. 15). L'activité est mesurée en présence de DCIPH<sub>2</sub>. On peut ainsi observer que la présence de MgCl<sub>2</sub> stimule l'activité photosynthétique du PSI chez les échantillons traités aux deux températures, mais toutefois, pas aux mêmes concentrations. Au niveau des membranes enrichies en PSI incubées à 25 °C, l'activité optimale est obtenue aux concentrations de MgCl<sub>2</sub> inférieures à 1 mM. On peut expliquer cet effet par une modification structurale au niveau du complexe pigment-protéine du PSI (Gross et al., 1979, 1980). Par contre, à 50 °C, la concentration requise

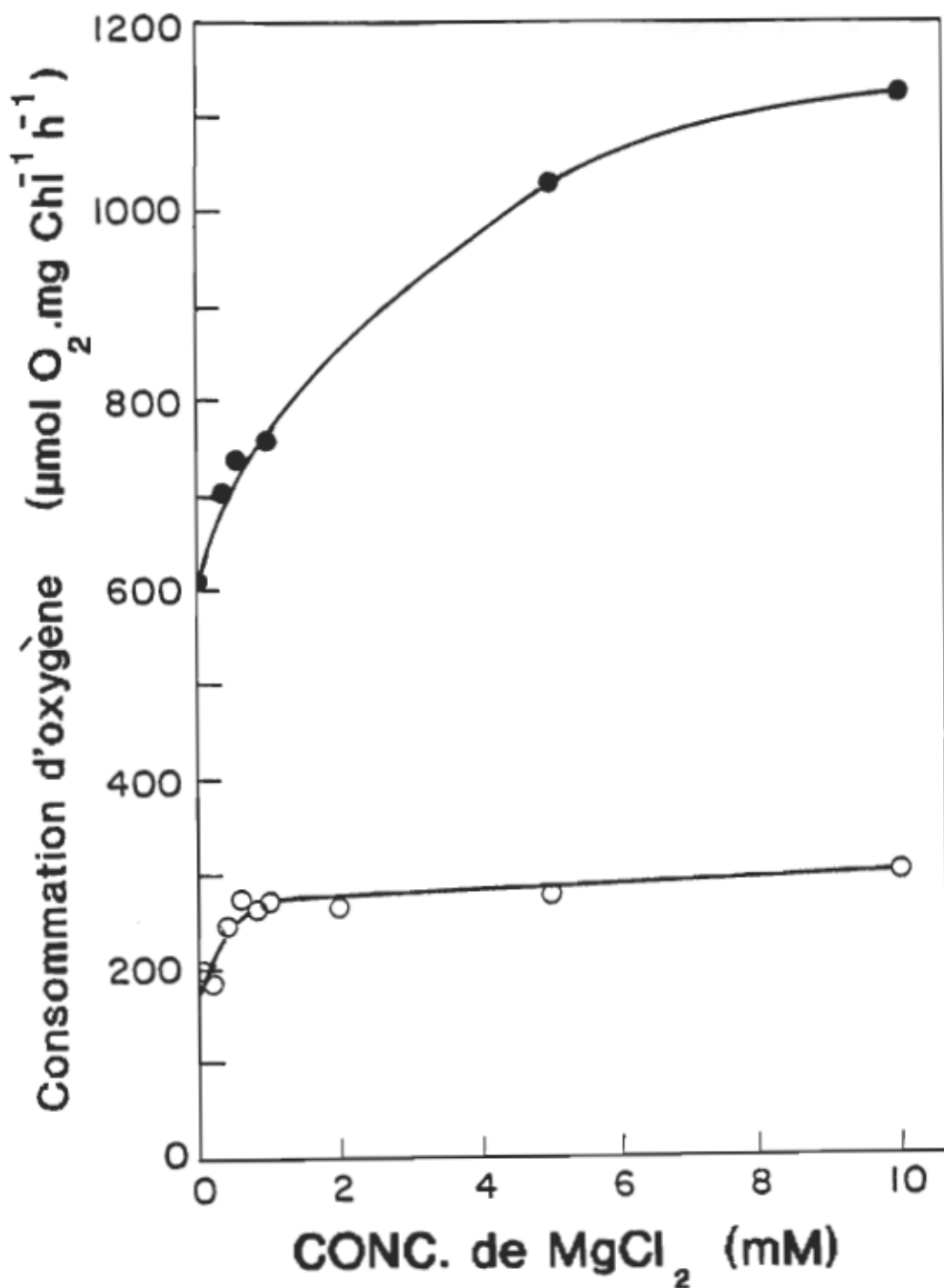


FIGURE 15 : Effet de la concentration de MgCl<sub>2</sub> sur l'activité des fractions membranaires de PSI incubées à 25 et 50 °C mesuré en présence de DCIPH<sub>2</sub>

○ 25 °C

● 50 °C

DCIPH<sub>2</sub> (100 μM)

afin de produire une stimulation optimale est d'environ 10 mM. On peut observer que l'activité du PSI est augmentée par un facteur de trois lors de l'incubation en absence de sel à 50 °C (Fig.15). Cependant, la présence de 10 mM de  $MgCl_2$  dans le milieu d'incubation à 50 °C permet d'activer la consommation d'oxygène du PSI par un facteur de 4. Encore une fois, l'hypothèse de Thomas et ses collaborateurs (1986) nous permet d'expliquer la stimulation thermique de l'activité du PSI par un changement conformationnel survenant au niveau du complexe cytochromique  $b_6/f$ . La présence de  $MgCl_2$  favoriserait ce changement conformationnel.

Les résultats rapportés sur la **figure 16** montrent la consommation d'oxygène du PSI mesurée en présence de  $TMPDH_2$  après une incubation des membranes de PSI à différentes concentrations de  $MgCl_2$  à 25 et 50 °C. Aucune stimulation de l'activité n'est observée à 50 °C lorsque le  $TMPDH_2$  agit comme donneur d'électrons. Cependant, on remarque une stimulation du transport d'électrons aux faibles concentrations de  $MgCl_2$  aux deux températures, comme ce fut le cas en présence de  $DCIPH_2$  à 25 °C. Ainsi, le  $TMPDH_2$  ne permet d'observer que les modifications structurales survenant au niveau de l'antenne du PSI.

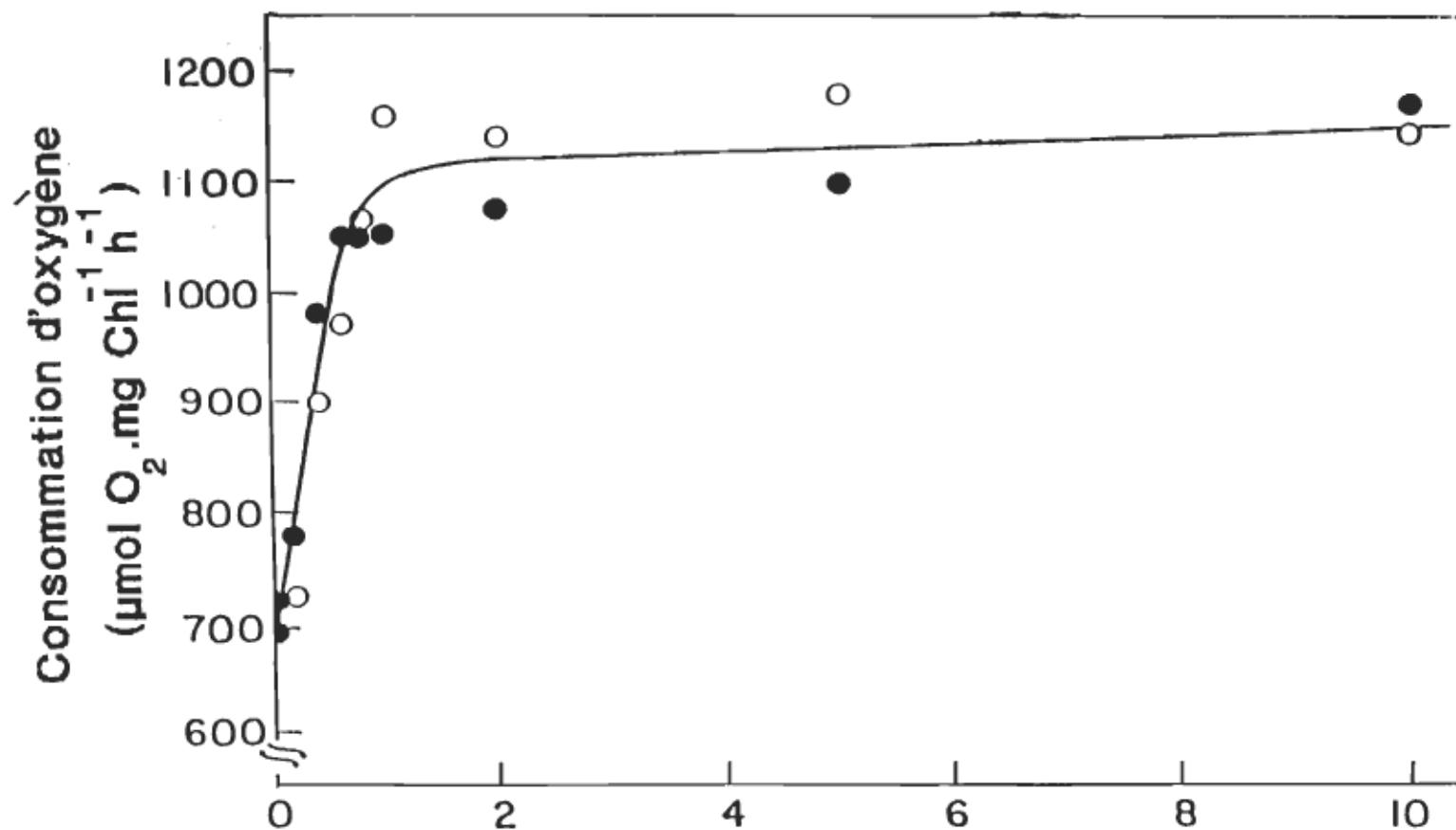


FIGURE 16 : Effet du MgCl<sub>2</sub> sur l'activité des fractions membranaires de PSI incubées à 25 et 50 °C mesuré en présence TMPDH<sub>2</sub>

○ 25 °C

● 50 °C

TMPDH<sub>2</sub> (1mM)

La même expérience a été effectuée avec la DQ (Fig. 17) en présence de SOD afin de vérifier si la stimulation du transport d'électrons par ce donneur était seulement causée par sa réaction avec les superoxydes. En effet, en comparant les résultats obtenus, à différentes concentrations de  $MgCl_2$ , à ceux retrouvés en présence de  $TMPDH_2$  (Fig. 16) ou de  $DCIPH_2$  (Fig. 15), on peut déterminer l'effet de la DQ sur l'activité du PSI. Comme l'activité n'est pas augmentée à 50 °C en présence de SOD lorsque la DQ est utilisée comme donneur d'électrons (Fig. 17), la stimulation du transport d'électrons observée auparavant (Fig. 12) n'était vraiment due qu'à l'oxydation de la DQ par les superoxydes.

### 3.2.2 Effet de la température sur la stimulation thermique

La figure 18 présente l'effet de la variation de la température d'incubation sur les échantillons de PSI incubés 5 min en absence ou en présence de 10 mM de  $MgCl_2$ . Les mesures se prennent par la suite à 22 °C en présence de  $DCIPH_2$  et de MV. On remarque sur cette figure, que la consommation d'oxygène augmente avec la température d'incubation.

La température permettant d'obtenir l'activité photosynthétique maximale des membranes de PSI se situe à

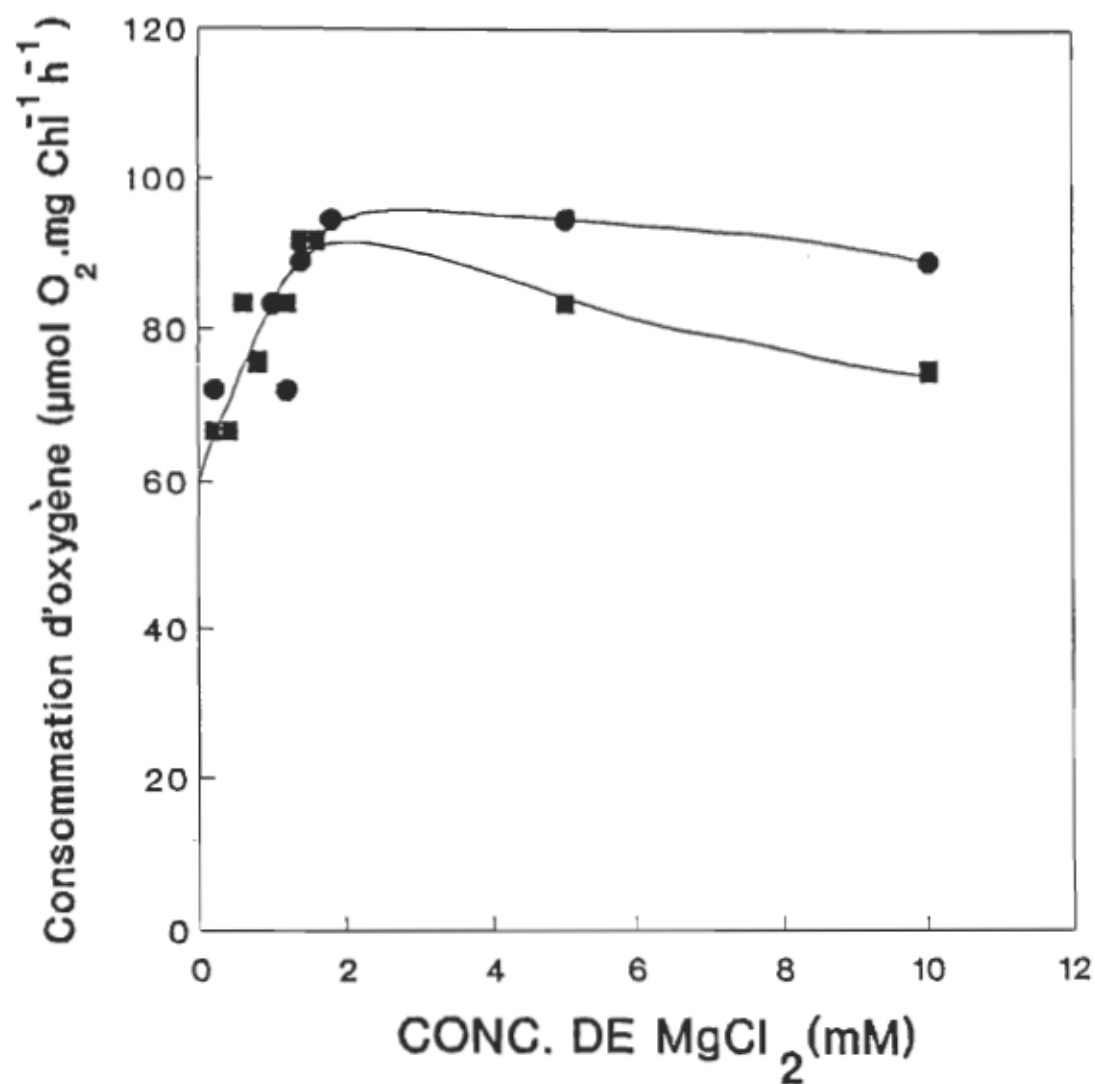


FIGURE 17 : Effet du  $MgCl_2$  sur l'activité des fractions membranaires de PSI incubées à 25 et 50 °C mesuré en présence de DQ

—●— 25 °C

—■— 50 °C

SOD (75 U/mL)

DQ (0.5 mM)

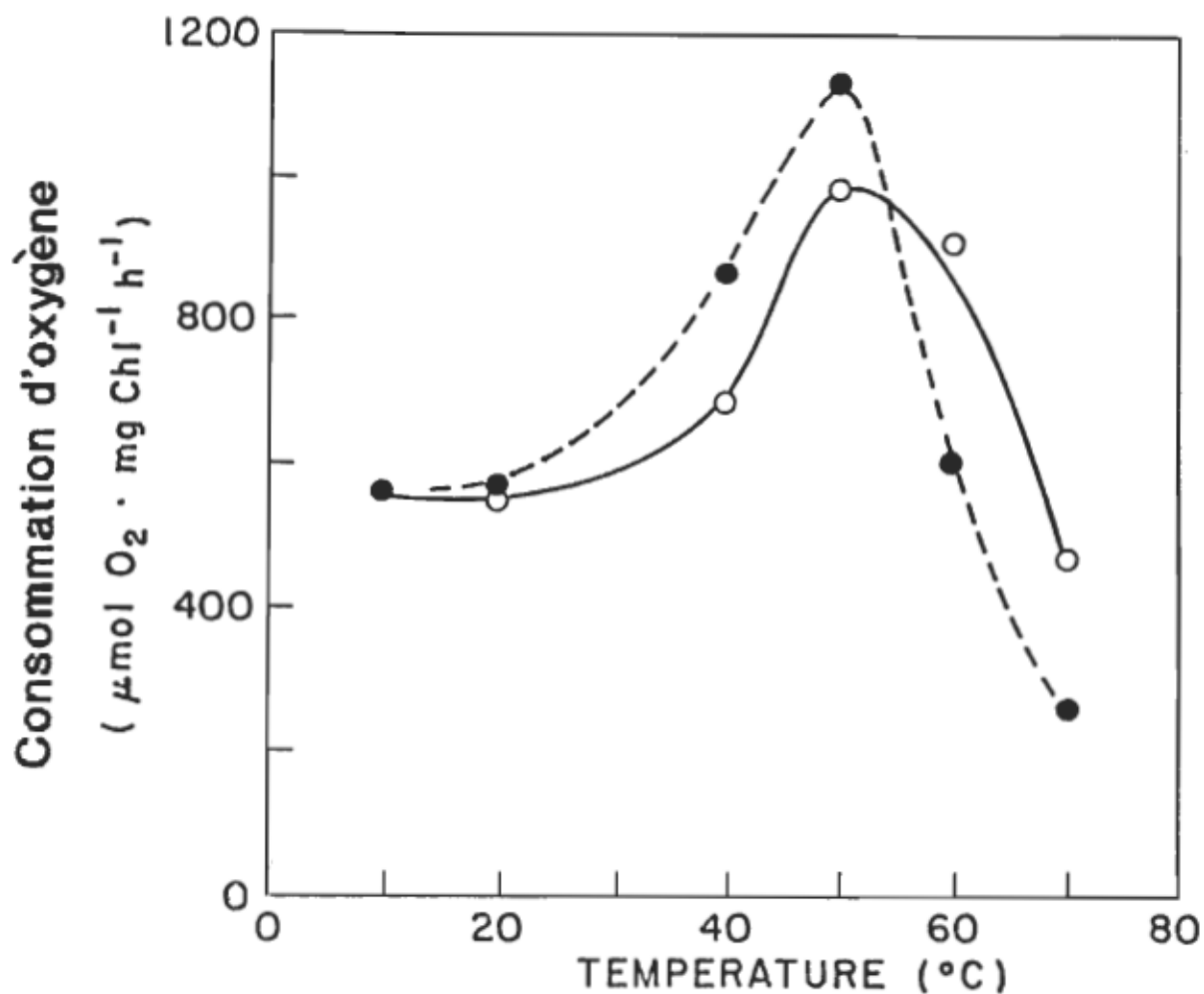


FIGURE 18 : Effet de la température sur l'activité des membranes de PSI incubées en absence ou en présence de 10 mM de  $\text{MgCl}_2$

—●—  $\text{MgCl}_2$  10 mM      —○— sans sel

$\text{DCIPH}_2$  (100  $\mu\text{M}$ )

50 °C en absence ou en présence de 10 mM de  $MgCl_2$  (Fig. 18). Cependant, on observe qu'une incubation de 10 à 50 °C en présence de  $MgCl_2$  provoque une activation beaucoup plus importante qu'une incubation aux mêmes températures en absence de sel. On peut donc dire que le  $MgCl_2$  a un effet positif sur l'activité du PSI. A partir de 50 °C, on observe une baisse de l'activité des membranes de PSI incubées en absence ou en présence de  $MgCl_2$ . Cette diminution de la consommation d'oxygène est toutefois plus drastique au niveau des fractions membranaires incubées en présence de  $MgCl_2$  que celles incubées sans ce sel (Fig. 18).

Il est possible qu'il existe une corrélation entre cette perte de l'activité des membranes enrichies en PSI incubées en présence de 10 mM de  $MgCl_2$  à des températures plus élevées que 50 °C et la prolongation du temps d'incubation à 50 °C en présence du même sel (section 3.2.3).

### **3.2.3 Effet du temps d'incubation**

La figure 19 indique que la durée de l'incubation des membranes de PSI à 50 °C dans un milieu contenant ou ne contenant pas 10 mM de  $MgCl_2$  joue également un rôle dans l'activation du transport d'électrons. On peut observer qu'il est nécessaire d'incuber pendant 5 min les échantillons



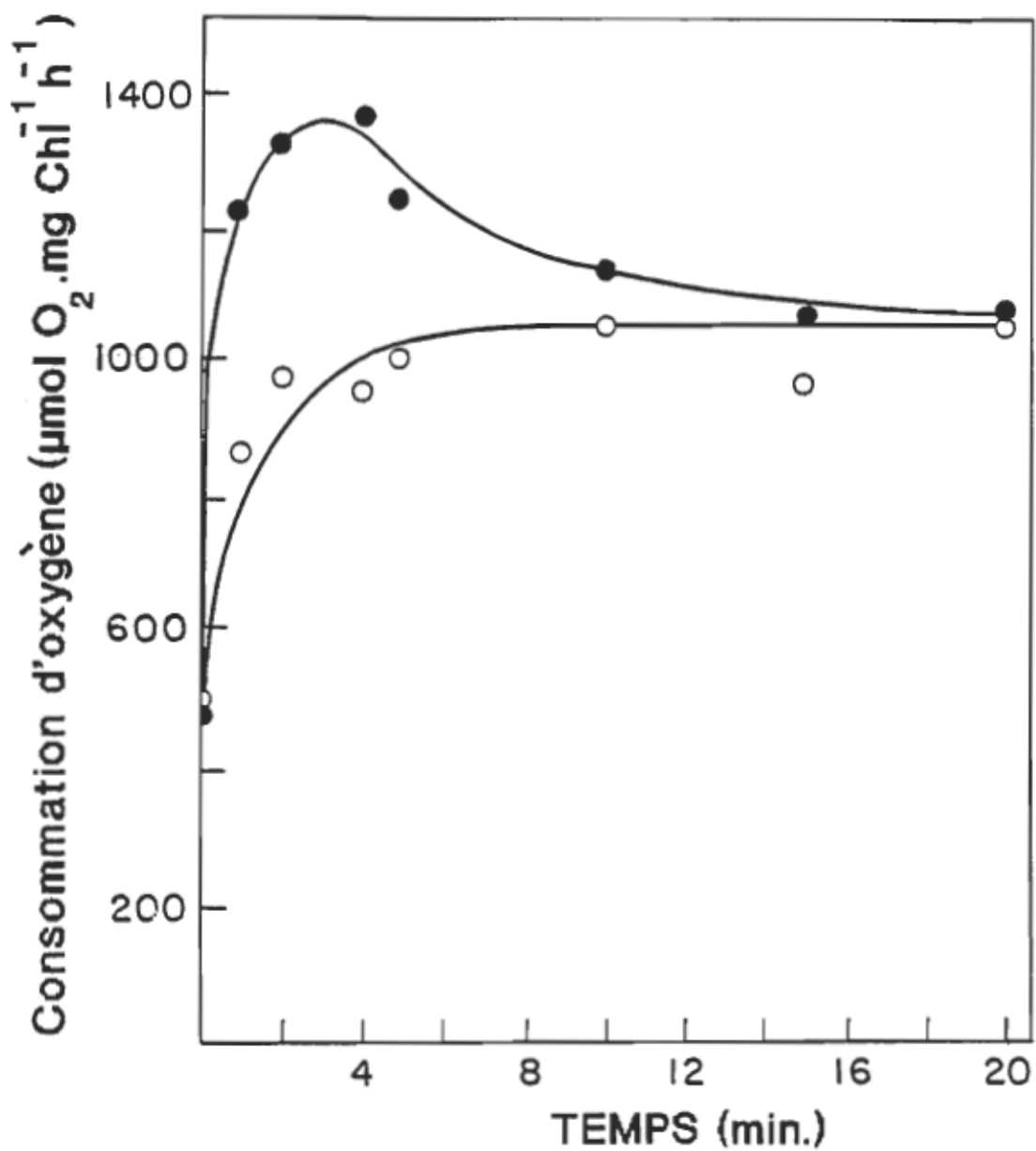


FIGURE 19 : Effet de la période d'incubation sur l'activité des membranes de PSI incubées à 50 °C en absence ou en présence de 10 mM MgCl<sub>2</sub>

—●— MgCl<sub>2</sub> 10 mM

—○— sans sel

DCIPH<sub>2</sub> (100 μM)

afin d'obtenir une stimulation optimale en absence de sel. Cette activation du transport d'électrons du PSI est causée par le changement conformationnel au niveau du complexe cytochromique  $b_6/f$ .

L'activité maximale en présence de  $MgCl_2$  est obtenue après seulement 3 min d'incubation et elle est beaucoup plus grande que celle observée sans sel. Cependant, l'activité diminue lorsque les membranes sont incubées plus de 5 min à 50 °C avec 10 mM de  $MgCl_2$  (Fig. 19). Toutefois, la valeur de la consommation d'oxygène retrouvée après plus de 5 min d'incubation est équivalente à celle observée lorsque le PSI est incubé sans sel. Ainsi, le  $MgCl_2$  crée une stimulation de l'activation thermique du PSI déjà existante. Par contre, cet effet se perd suite à une exposition prolongée au stress thermique. Ainsi, la portion de la stimulation de la consommation d'oxygène par le  $MgCl_2$  est un effet réversible. Cependant, l'activité retrouvée après 5 min d'incubation en absence ou présence de sel demeure constante même après un transfert d'une heure à 22 °C. Le changement conformationnel survenant au niveau du complexe du cytochrome  $b_6/f$  est donc irréversible.

On peut ainsi dire que la perte de l'activité aux températures supérieures à 50 °C (Fig. 18) est l'équivalent

de la période d'incubation prolongée à 50 °C en présence de ce sel (Fig. 19). La perte de l'activité observée à des températures relativement élevées et lors d'une exposition prolongée à 50 °C serait due à la dissociation des espèces ioniques de la membrane photosynthétique.

Ces recherches nous ont permis de déterminer qu'un changement conformationnel au niveau du cytochrome  $b_6/f$  était responsable de la stimulation de l'activité des membranes de PSI sous l'effet d'un choc thermique. De plus, nous avons vérifié que la présence des sels dans le milieu d'incubation à 50 °C favorisait ce changement conformationnel. Ainsi, cet effet de la température sur le transport d'électrons au niveau du PSI pourrait permettre d'augmenter le photocourant produit dans une cellule électrochimique.

### **3.3 Stimulation du transport d'électrons mesurée par électrochimie**

Une cellule photoélectrochimique a été développée au cours des dernières années au laboratoire (Mimeault et Carpentier, 1988). Cette méthode électrochimique mesure le photocourant induit par les membranes photosynthétiques au lieu de mesurer la consommation ou le dégagement d'oxygène. Les résultats obtenus par la cellule photoélectrochimique

peuvent se comparer à ceux observés par la méthode polarographique.

Les thylacoïdes entiers et des fractions membranaires de PSII ont été largement étudiés. Cependant, aucune caractérisation n'avait été produite avec des membranes enrichies en PSI. L'utilisation de ces dernières s'avère d'autant plus intéressante puisque l'activation du transport d'électrons du PSI par le stress thermique pourrait permettre d'augmenter le photocourant produit.

La méthode électrochimique nécessite l'emploi d'un couple donneur-accepteur d'électrons afin de prendre les mesures lorsque le PSI est le matériel utilisé. Ceci diffère lorsque les membranes thylacoïdiennes ou de PSII sont employées. En effet, l'utilisation des thylacoïdes entiers ne nécessite pas obligatoirement l'emploi de donneurs ou d'accepteurs puisque les deux photosystèmes sont présents (Mimeault et Carpentier, 1987 a). Un accepteur peut être utilisé afin d'augmenter le photocourant produit. L'emploi des membranes enrichies en PSII ne nécessite que la présence d'un accepteur d'électrons car le PSII peut donner les électrons provenant de la photolyse de l'eau. Au niveau des fractions membranaires de PSI, les donneurs nécessitant l'ascorbate pour leur réduction ne peuvent être utilisés.

L'ascorbate dégrade le peroxyde d'hydrogène impliqué dans la formation du photocourant. De tous les donneurs utilisés auparavant, seulement le procédé de réduction de la DQ ne nécessitait pas l'ascorbate. C'est donc ce donneur qui fut utilisé. Le MV a servi d'accepteur d'électrons.

Avant de vérifier l'augmentation du photocourant par la température, il fallait tout d'abord étudier les conditions optimales de mesures. C'est ainsi que certaines propriétés telles la concentration de DQ, de MV, de chlorophylle, le potentiel imposé, et le pH ont été vérifiées.

L'illumination des fractions membranaires enrichies en PSI dans la cellule photoélectrochimique procure un photocourant beaucoup plus faible que celui observé avec les thylacoïdes (40-60  $\mu\text{A}$ ) (Mimeault et Carpentier, 1987 b) et les membranes de PSII (55  $\mu\text{A}$ ) (Lemieux et Carpentier, 1988). Aucun photocourant de plus de 6  $\mu\text{A}$  ne fut mesuré. En 1988, Mimeault et Carpentier avaient mesuré l'activité photoélectrogénique du PSI et PSII dans les thylacoïdes entiers en utilisant des accepteurs et des donneurs appropriés. Le photocourant produit par le PSI s'était montré inférieur à celui obtenu par le PSII. De plus, ces chercheurs avaient comparé l'activité photoélectrochimique obtenues à partir de membranes enrichies en PSI et PSII. Une fois de

plus, le photocourant généré par le PSI s'était révélé plus faible que celui observé avec les membranes de PSII.

### 3.3.1 Effet du potentiel sur le photocourant

Le photocourant produit en fonction du potentiel imposé (200 à 800 mV vs SCE) est illustré à la **figure 20**. On peut observer que le potentiel maximal est atteint à partir de 600 mV vs SCE. Un potentiel de 750 mV a donc été utilisé pour effectuer les mesures.

Une relation biphasique avait été observée entre le potentiel imposé et le photocourant généré par des thylacoïdes entiers en présence d'accepteurs d'électrons du PSI (Mimeault et Carpentier, 1987). Cependant, une relation monophasique fut observée lorsque le matériel photosynthétique utilisé était le PSII ou en utilisant un accepteur d'électrons du PSII au niveau des membranes thylacoïdiennes (Lemieux et Carpentier, 1988). La nature biphasique de la relation entre le potentiel imposé et le photocourant peut être expliquée par la présence d'un pont redox entre le côté réducteur du PSII et le côté oxydant du

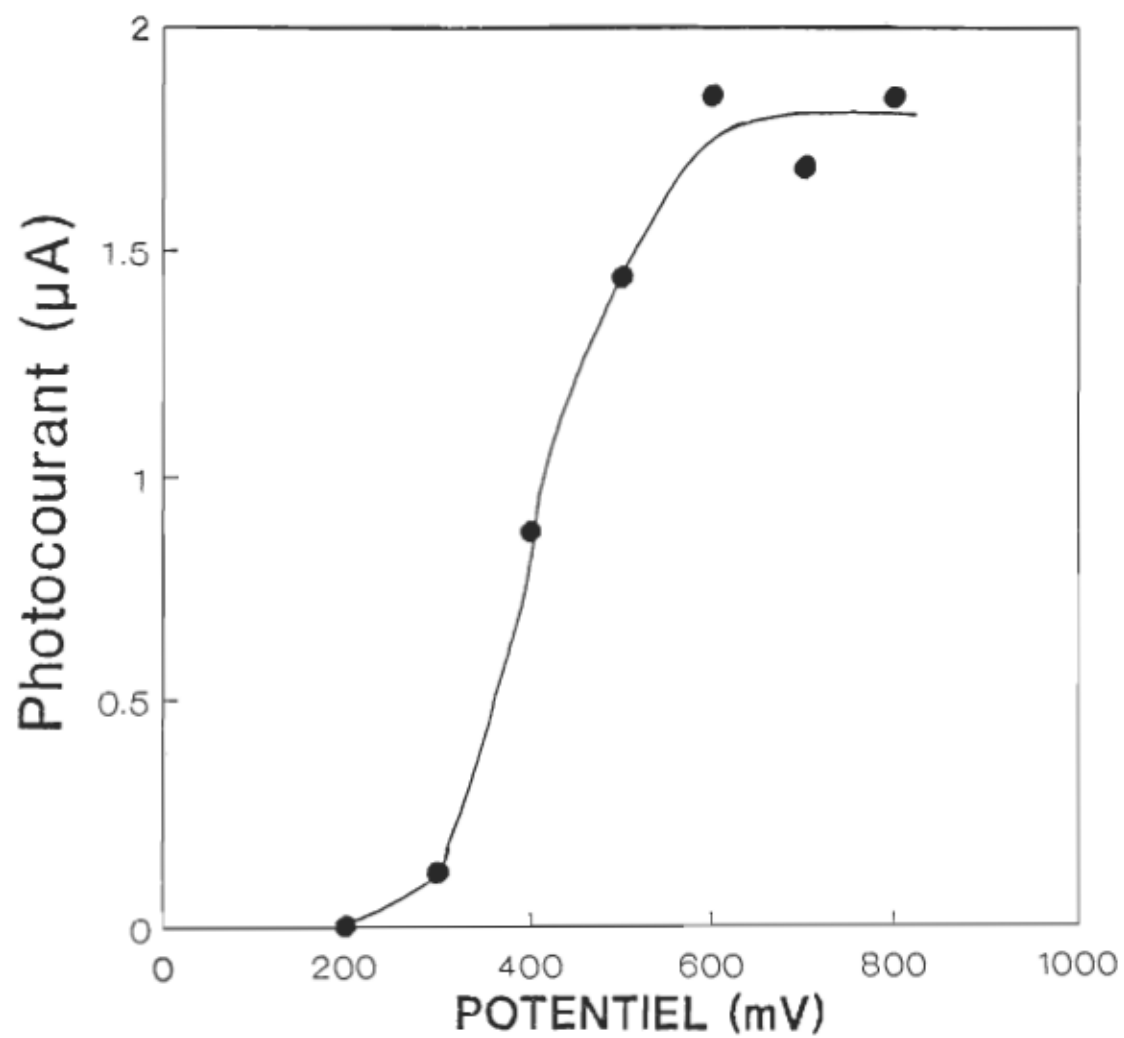


FIGURE 20 : Effet du potentiel imposé sur le photocourant généré par les membranes de PSI en présence de DQ

PSI (Allen et Crane, 1976). Toutefois, ce comportement biphasique pourrait être associé à la réduction du PSI.

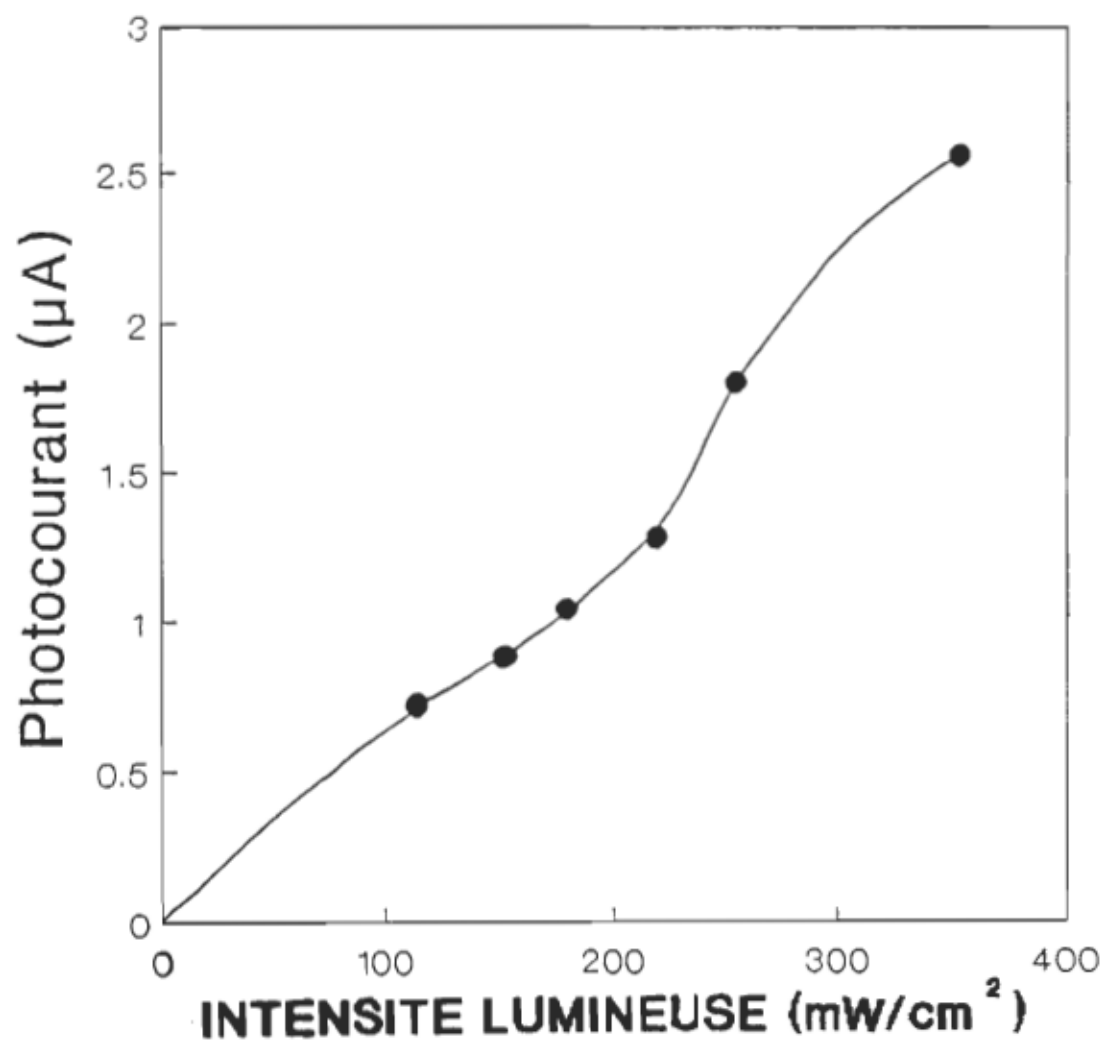
Les résultats que nous obtenons avec les fractions membranaires de PSI ne semblent pas vraiment démontrer une relation biphasique, nous obtenons plutôt une courbe sigmoïde (Fig. 20). En effet, la production du photocourant est lente entre 0 et 300 mV alors qu'elle est plus rapide à partir de 300 mV. On ne peut cependant conclure qu'une relation biphasique est obtenue avec les membranes enrichies en PSI puisque un plus grand nombre de points entre 0 et 300 mV serait nécessaire. Si un comportement biphasique est observé avec ces membranes, alors on ne pourrait l'expliquer que par la réduction du PSI.

### 3.3.2 Effet de l'intensité lumineuse

La figure 21 présente l'influence de l'intensité lumineuse sur le photocourant. Le projecteur utilisé ne permet pas d'obtenir la saturation du photocourant. L'intensité optimale procurée par ce projecteur est de  $350 \text{ mW/cm}^2$ ; c'est donc cette intensité qui fut utilisée.

Lorsque le matériel utilisé est le PSII, une saturation est obtenue à  $720 \text{ mW/cm}^2$  (Lemieux et Carpentier, 1988).



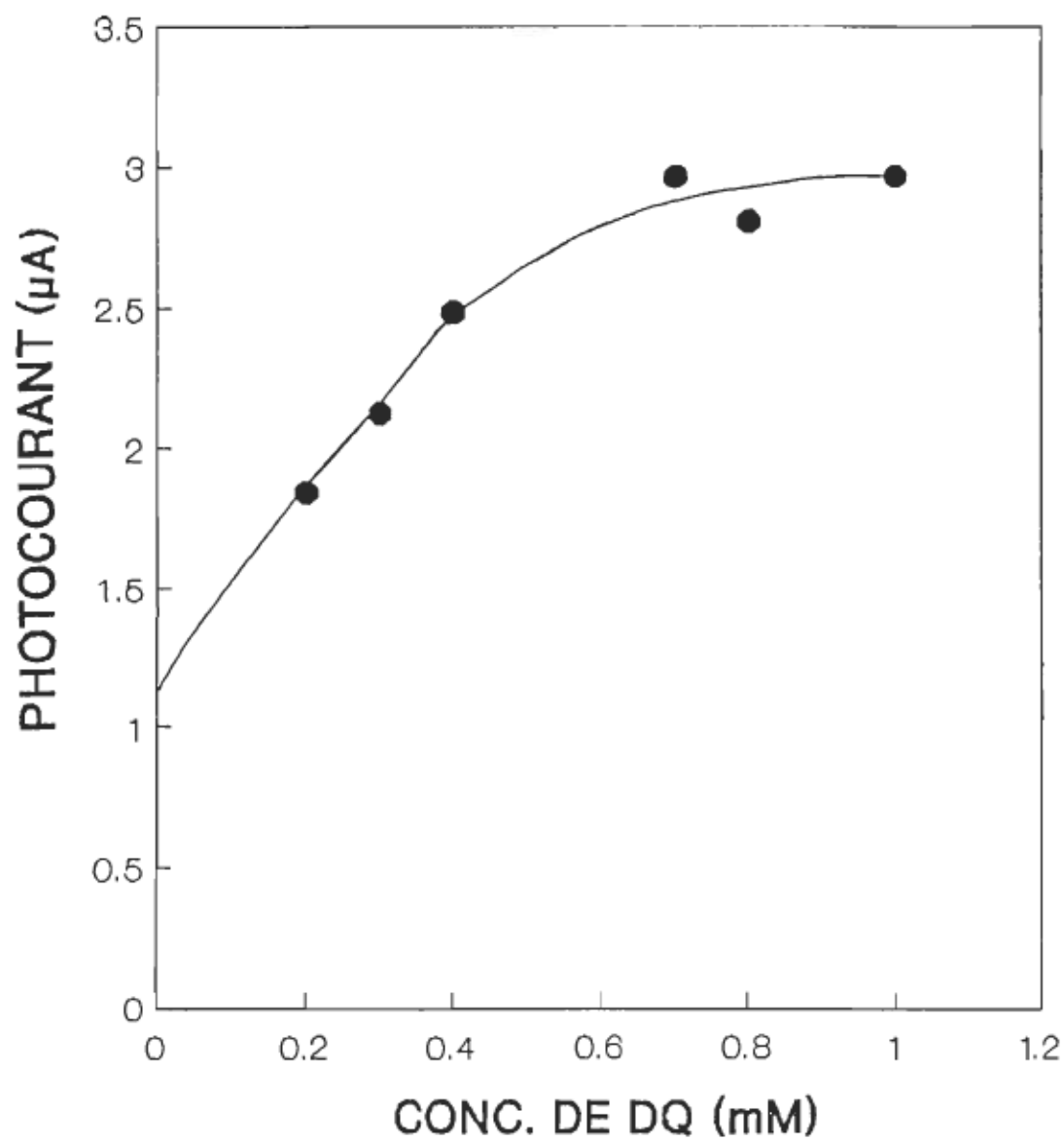


**FIGURE 21 :** Effet de l'intensité lumineuse sur le photocourant généré par les membranes de PSI en présence de DQ

Cependant en utilisant les thylacoïdes, la saturation de l'activité de ces membranes n'est pas atteinte par la méthode électrochimique (Lemieux et Carpentier, 1988) alors que par la méthode photoacoustique, la saturation est obtenue à une intensité lumineuse inférieure à  $200 \text{ W/m}^2$  (Carpentier et al., 1987). De tels résultats indiquent que la dispersion et les réflexions de la lumière avec la cellule réduisent probablement l'absorption de l'énergie par l'échantillon (Lemieux et Carpentier, 1988). C'est peut-être le même phénomène qui survient avec les fractions membranaires de PSI puisque la saturation de l'activité par la lumière n'est pas obtenue.

### 3.3.3 Effet de la concentration de la duroquinone

La figure 22 démontre que la concentration optimale de DQ est obtenue à partir de 0.5 mM. La DQ est réduite selon le procédé décrit dans matériel et méthode mais la SOD n'est pas utilisé puisqu'on voulait obtenir le maximum de photocourant possible. Les résultats de cette expérience se comparent à ceux retrouvés avec la consommation d'oxygène (Fig. 12), démontrant que le photocourant produit est de nature photosynthétique.



**FIGURE 22 :** Effet de la concentration de DQ sur le photocourant généré par les membranes de PSI

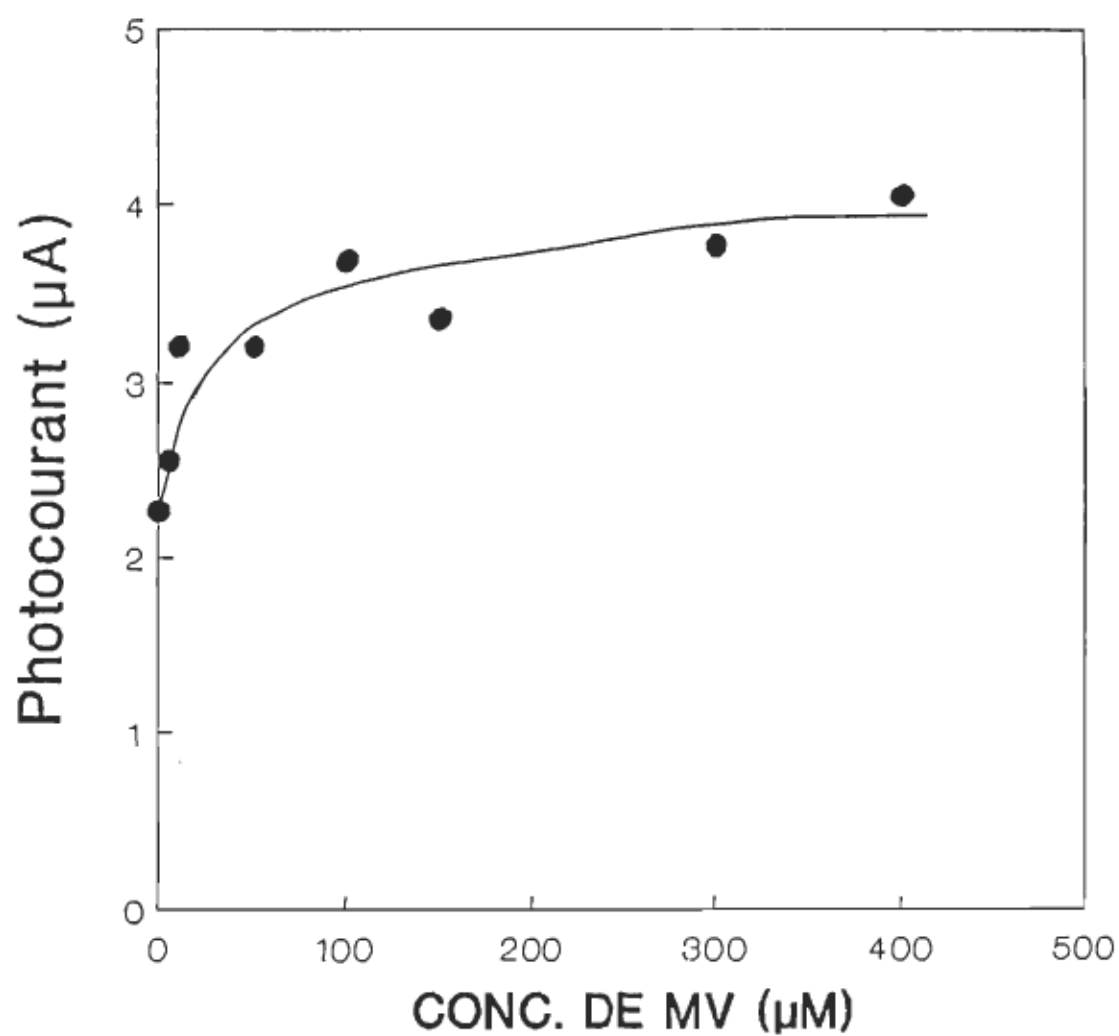
#### **3.3.4 Effet de la concentration du méthyl viologène**

Le MV permet d'intensifier le photocourant à partir de 0.2 mM (Fig. 23). Une concentration de 0.5 mM a été utilisée pour réaliser les mesures. Le MV augmente le photocourant généré par les fractions membranaires de PSI par un facteur de 2. Ces résultats peuvent se comparer à ceux obtenus par Fujii et ses collaborateurs (1990) qui ont mesuré la consommation d'oxygène par la méthode polarographique, démontrant une fois de plus que le photocourant est d'origine photosynthétique.

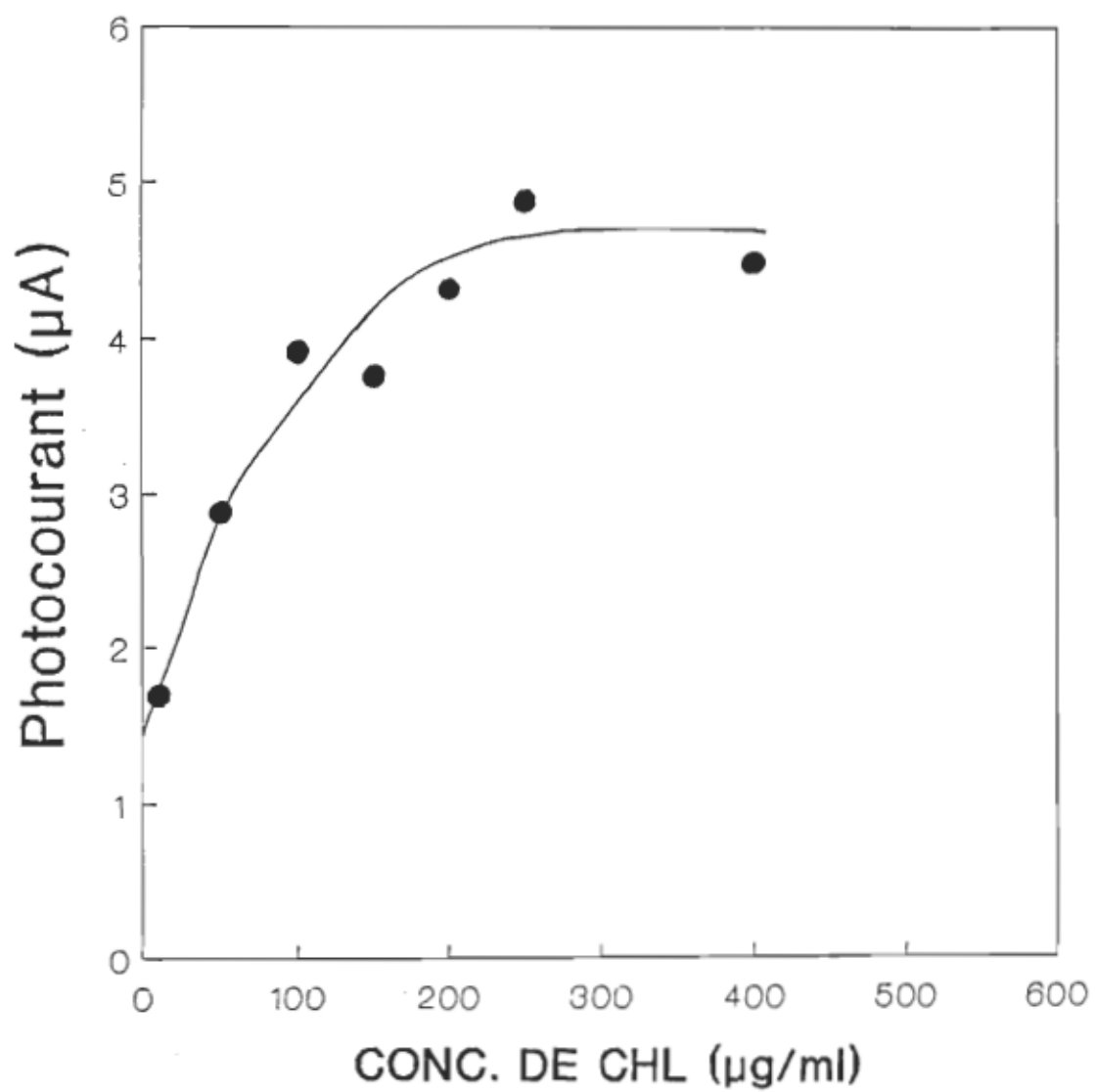
Le site accepteur d'électrons du MV se situe au niveau du centre  $F_B$  (Fujii et al., 1990). Le MV peut augmenter le photocourant produit à cause de sa plus grande affinité à accepter les électrons du PSI que ne le fait l'oxygène et il peut mieux réduire l'oxygène que ne le peut le côté accepteur de ce photosystème. C'est donc un effet catalytique (Goetze et Carpentier, 1990).

#### **3.3.5 Effet de la concentration de chlorophylle**

Le photocourant varie également avec la concentration de chlorophylle contenue dans les suspensions de PSI (Fig. 24). Le photocourant maximal est obtenu avec une concentration de



**FIGURE 23 :** Effet de la concentration du MV sur le photocourant généré par les membranes de PSI en présence de DQ



**FIGURE 24 :** Effet de la concentration de chlorophylle sur le photocourant généré en présence de DQ

250  $\mu\text{g/mL}$ . Puisque le volume de la chambre de la cellule est de 80  $\mu\text{L}$ , cette concentration correspond à une quantité de 20  $\mu\text{g}$  de chlorophylle provenant des préparations de PSI. Si on compare ces résultats à ceux obtenus avec des membranes enrichies en PSII, le photocourant maximal est atteint à partir d'une concentration de chlorophylle de 100  $\mu\text{g/mL}$  (Lemieux et Carpentier, 1988). Il faut donc une plus grande quantité de PSI que de PSII afin de générer un photocourant optimal.

#### 3.3.6 Effet du pH

Le photocourant est également très sensible aux effets du pH (Fig. 25). Tel qu'indiqué sur cette figure, le PSI est plus actif aux pH basiques. Un pH de 7.8 fut donc utilisé.

En utilisant des membranes enrichies en PSII ou en étudiant ce photosystème dans les thylacoïdes entiers, le photocourant optimal est obtenu à un pH de 6.0 (Lemieux et Carpentier, 1988). Lorsque le PSI est mesuré au niveau des membranes thylacoïdiennes, un pH de 8.0 est nécessaire pour générer un courant optimal.

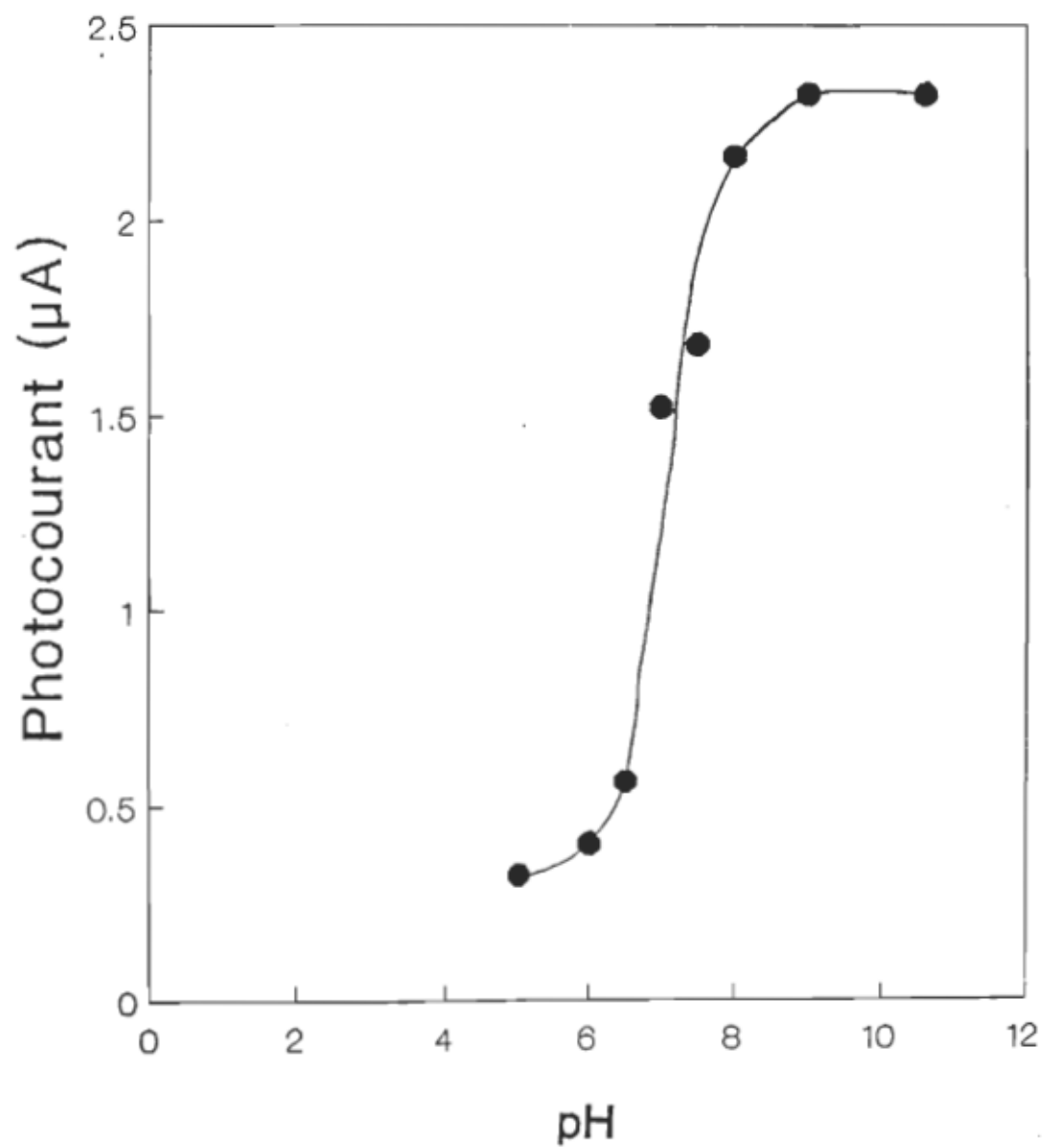


FIGURE 25 : Effet du pH sur le photocourant généré par les membranes de PSI en présence de DQ



### 3.3.7 Effet de la température

Toutes les conditions étudiées, il ne restait plus qu'à mesurer l'effet de la température sur le photocourant produit par le PSI. Les résultats de cette expérience sont démontrés à la figure 26. Le temps d'incubation est de 5 min et la température est variée au niveau de la cellule-même par le bain thermostaté. La température permettant le maximum de courant se situe à 50 °C. Ainsi, la stimulation par le stress thermique permet d'augmenter le photocourant produit par un facteur de quatre.

### 3.3.8 Discussion

L'utilisation des fractions membranaires de PSI permet d'étudier les caractéristiques photoélectrogéniques de ce photosystème de façon plus précise que ne le permet l'emploi des thylacoïdes entiers puisque les deux photosystèmes sont présents dans ces derniers.

L'application de cette cellule photoélectrochimique est une pile solaire dont le matériel de base serait les membranes photosynthétiques. Ainsi, si le PSI est utilisé pour créer une telle pile, les conditions suivantes seraient à remplir : une concentration de chlorophylle de 250 µg/mL,

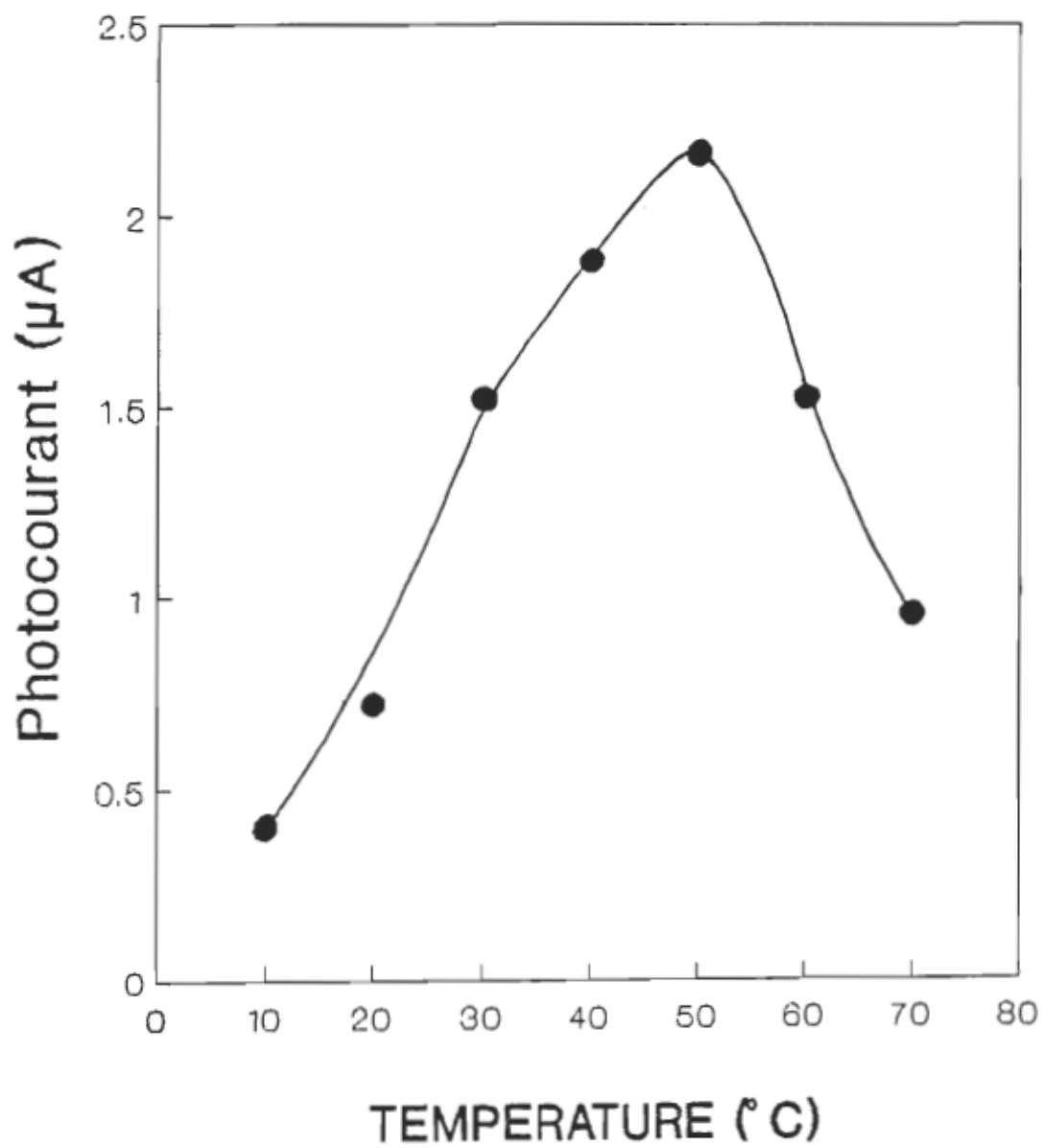


FIGURE 26 : Effet de la température sur le photocourant généré par les membranes de PSI en présence de DQ

un pH de 8.0, un potentiel d'au moins 600  $\mu$ A, des concentrations d'accepteur (MV) et de donneur (DQ) d'au moins 0.5 mM dans les deux cas. De plus, il faudrait chauffer le système à 50 °C afin d'optimiser le photocourant produit par de telles membranes.

L'inconvénient de l'utilisation de membranes enrichies en PSI dans une telle pile est que ce photosystème procure moins de photocourant que ne le font les membranes thylacoïdiennes entières et les PSII isolés. De plus, la nécessité de chauffer la cellule à 50 °C ne rend pas son application très utile. Cependant, l'emploi d'un autre donneur d'électrons permettrait d'améliorer le photocourant généré par le PSI. D'autres études sont donc nécessaires afin de permettre l'utilisation éventuelle de ce photosystème dans une future pile photoélectrochimique.

## CHAPITRE 4

### CONCLUSION

Ce projet de recherche consistait à vérifier si les fractions membranaires de PSI étaient affectées par le stress thermique *in vitro*, c'est à dire, si elles subissent une augmentation de leur activité lorsqu'elles sont exposées pendant 5 min à une température de 50 °C.

Une stimulation thermique de l'activité dans les membranes enrichies en PSI fut observée à l'aide de deux méthodes : la polarographie et l'électrochimie. La présence de sels tels que le  $MgCl_2$  à 10 mM, le NaCl et le KCl 20 mM contribue à améliorer la stimulation du transport d'électrons sous l'effet d'un stress thermique.

Cette caractéristique de l'activité du PSI sous l'effet de la chaleur nous a également permis d'augmenter le photocourant généré par ce photosystème dans la cellule photoélectrochimique.

Ivanov et ses collaborateurs en 1986 avaient supposé que la dissociation du complexe protéique du PSII et sa migration vers l'antenne du PSI, sous l'effet de la chaleur, contribuaient à stimuler le transport d'électrons au niveau du PSI.

L'observation d'une telle stimulation au niveau des fractions membranaires de PSI nous permet de rejeter cette hypothèse d'Ivanov. De plus, tous les donneurs d'électrons permettant d'observer cette activation thermique du transport d'électrons ont leur site d'oxydation au niveau du cytochrome  $b_6/f$ .

Ces résultats pourraient donc concorder avec l'hypothèse de Thomas et collaborateurs (1986) qui stipulaient qu'un changement conformationnel survenant au niveau du cytochrome  $b_6/f$  était responsable de l'augmentation de l'activité du PSI à 50 °C. De plus, cette hypothèse est confirmée par l'absence de stimulation aux températures élevées dans les membranes de PSI immobilisées, l'immobilisation empêchant les mouvements protéiques.

Gounaris et ses collaborateurs (1983) avaient toutefois supposé que l'origine de cette stimulation thermique de l'activité du PSI provenait de la réorganisation lipidique de

la membrane thylacoïdienne. Le changement conformationnel n'est donc pas encore défini. Ainsi, afin de vérifier plus amplement l'hypothèse de Thomas (1986) et de poursuivre ces travaux, il faudrait isoler le cytochrome  $b_6/f$  et caractériser les modifications survenant au niveau de ce complexe cytochromique sous l'effet d'un choc thermique.

Une reconstitution membranaire pourrait également être faite à partir des membranes enrichies en PSI et PSII. Le PSI pourrait ainsi être soumis à un stress de 5 min à 50 °C alors que le PSII pourrait demeurer intact. En mesurant l'activité de ces deux photosystèmes recombines, le PSII servant de donneur d'électrons au PSI, nous pourrions vérifier si une activation thermique du transport d'électrons du PSI est observée. Si tel était le cas, il se pourrait qu'il y ait un effet de protection physiologique au niveau de l'appareil photosynthétique. En effet, le PSII perdant son activité à la température à laquelle le PSI commence à subir une augmentation de son activité, le chloroplaste a peut-être développé un mécanisme de protection physiologique contre l'effet des températures élevées.

## BIBLIOGRAPHIE

- Al-Khatib, K. Wiest, S.C., (1990). Solution Effects on the Thermability of Bean Chloroplast Thylakoids, Crop Science, 30: 90-96
- Allen, M.J., Crane, A.E., (1976). Null potential voltametry- An approach to the study of plant photosystem, Bioelectrochem. Bioenerg., 3: 84-91
- Allred, D.R., Staehelin, L.A., (1986). Spatial organization of the cytochrome  $b_6$ -f complex within chloroplast thylakoid membranes, Biochem. Biophys. Acta, 849: 94-103
- Armond, P.A., Björkman, O., Staehelin, L.A., (1980). Dissociation of supramolecular complexes in chloroplast membranes. A manifestation of heat damage to the photosynthetic apparatus, Biochim. Biophys. Acta 601: 433-442
- Arnon, D.I., (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts, Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*, Plant Physiol., 24: 1-15
- Barber, J., (1982). Influence of surface charges on thylakoid structure and function, Ann. Rev. Plant Physiol. 33: 261-295
- Berry, J., Björkman, O., (1980). Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants, Ann. Rev. Plant Physiol., 31: 491-543
- Boekema, E.J., Malkin, R., (1990). The structure of spinach photosystem I studied by electron microscopy, Biochim. Biophys. Acta, 1017: 49-56
- Bonenfant, D., Carpentier, R., (1989). Stabilization of the structure and functions of a photosystem I submembrane fraction by immobilization in an albumin-glutaraldehyde matrix, Appl. Biochem. Biotech., 1, 26: 59-71
- Boucher, N., Harnois, J., Carpentier, R., (1989). Effect of cations on heat stimulation of photosystem I in stroma lamellae preparations. In Current Research in Photosynthesis, Vol. III (M. Baltscheffsky, ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 295-298

- Boucher, N., Harnois, J., Carpentier, R., (1989). Heat-stress stimulation of electron flow in a photosystem I submembrane fraction, Biochem. Cell Biol., 68: 999-1004
- Bruce, B.D., Malkin, R., Wynn, M., Zilber, A., (1989). Structural organization and function of polypeptide subunits in photosystem I, Techniques and new developments in Photosynthesis Research, ed. by J. Barber and R. Malkin, Plenum Publishing Corporation
- Carpentier, R., Leblanc, R. M., Mimeault, M. (1987). Photoinhibition and chlorophyll photobleaching in immobilized thylacoid membranes, Enzyme Microb. Technol., 9: 489-493
- Carpentier, R., Mimeault, M. (1987). The photosynthetic partial reactions involved in photoelectrochemical current generation by thylacoid membranes, Biotechnology Letters, 9: 111-116
- Chaisompongpan, N., Li, P.H., Davis, D.W., Markhart, A.H., (1990). Photosynthetic Responses to Heat Stress in Common Bean Genotypes Differing in Heat Acclimatation Potential, Crop Science 30: 100-104
- Chen, Q., Lauzon, L.M., DeRocher, A.E., Vierling, E. (1990). Accumulation, Stability, and Localization of a Major Chloroplast Heat-Shock Protein, J. Cell Biol. 110: 1873-1883
- Critchley, C., Chopra, R.K., (1986). Protection of photosynthetic  $O_2$  evolution againsts heat inactivation: the role of chloride, pH, and coupling status, Phosynth. Research 15: 143-152
- Debus, R. J., Barry, B.A., Babcock, G.F., Mc Intosh, L. (1988). Site-directed mutagenis identifies a tyrosine radical involved in the photosynthetic oxygen-evolving system, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 427-430
- Delieu, T., Walker, D.A., (1972). An improved cathode for the measurement of photosynthetic oxygen evolution by isolated chloroplasts, New Phytol., 71: 201-225
- Evans, M.C.W., Bredenkamp, G., (1990). The structure and function of the ophotosystem I reaction centre, Physiol. Plant., 79: 415-420
- Foyer, C.H., (1984). Photosynthesis. In Cell Biology: A Series of Monographs. E. Edward Bittar, Series Editor, A wiley-interscience publication John Wiley & Sons, New-York.
- Fujii, T., Yokoyama, E.I., Inoue, K., Sakurai, H. (1990). The sites of electron donation of photosystem I to methyl viologen, Biochem. Biophys. Acta, 1015: 41-48



- Goetze, D., Carpentier, R. (1990). Oxygen mediated photosystem 1 activity in thylacoid membranes monitored by a photoelectrochemical cell, Photochem. Photobiol., 52: 1057-1060
- Golbeck, J.H., (1987). Structure, function and organization of the Photosystem I reaction center complex, Biochem. Biophys. Acta, 895: 167-204
- Gounaris, K., Brain, A.P.R., Quinn, P.J., Williams, W.P., (1983). Structural and functional changes associated with heat-induced phase-separations of non-bilayer lipids in chloroplast thylakoid membranes, FEBS Lett. 153: 47-53
- Gounaris, R., Brain, A.P.R., Quinn, P.J., Williams, W.P., (1984). Structural reorganisation of chloroplast thylakoid membranes in response to heat-stress, Biochim. Biophys. Acta 766: 198-208
- Gross, E.L., (1979). Cation-induced increases in the rate of P700 in photosystem I particules, Arch. Biochem. Biophys., 195: 198-204
- Gross, E.L., Grenier, J., (1978). Regulation of excitation energy distribution in subchloroplast particules: Photosystem I, Arch. Biochem. Biophys., 178: 387-398
- Guillot-Salomon, T., Bahl, J., Ben-Rais, L., Alpha, M.-J., Cantrel, C., Dubacq, J.-P., (1989). Effect of high temperatures on oxygen evolving activity and lipid composition of isolated chloroplasts from spinach and jojoba leaves, Biol. Role of Plant Lipids, 567-569
- Haehnel, W., (1984). Photosynthetic electron transport in higher plants, Ann. Rev. Plant Physiol., 35: 659-693
- Havaux, M., Lannoye, R., (1987). Reversible effects of moderately elevated temperature on the distribution of excitation energy between the two photosystems of photosynthesis in intact avocado leaves, Photosynth. Research 14: 147-158
- Inoue, H., Kitamura, T., Noguchi, M., (1987). Heat inactivation of electron transport reactions in photosystem II particles, Physiol. Plant 71: 441-447
- Isawa, S., (1980). Acceptors and donors for chloroplast electron transport, Method in Enzymology, 69: 413-431
- Ivanov, A.G., Velitchkova, M.Y., (1990). Heat-induced changes in the efficiency of P700 photo-oxidation in pea chloroplast membranes, J. Photochem. Photobiol. 4: 307-320

- Ivanov, A.G., Velitchkova, M.Y., Kafalieva, D.N., (1986). Heat-induced changes in photosystem I reaction centre in pea chloroplast membranes, Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences 39: 123-126
- Izawa, S., Pan, R.L., (1978). PSI electron transport and phosphorylation supported by electron donation to the plastoquinone region, Biochem. Biophys. Res. Commun., 83: 1171-1177
- Joliot, P., Joliot, A. (1986). In Photosynthesis III - Photosynthetic Membranes and Light harvesting systems, Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Ed. by L. A. Staehelin et C.J. Arntzen, New-York, Berlin, Tokyo, 19: 528-538
- Kobza, J., Edwards, G.E., (1987). Influences of leaf temperature on photosynthetic Carbon Metabolism in Wheat, Plant Physiol. 83: 69-74
- Krishnan, M., Nguyen, H.T., Burke, J.J. (1989). Heat Shock Protein Synthesis and Thermal Tolerance in Wheat, Plant Physiol. 90: 140-145
- Kyle, D.J., Arntzen, C.J. (1983). Photobiochem. Photobiophys. 5: 11-15
- Lagoutte, B., Mathis, P., (1989). The photosystem I reaction center: structure and photochemistry, Photochem. Photobiol., 49: 833-844
- Lemieux, S., Carpentier, R. (1988). Properties of immobilized thylacoid membranes in a photosynthetic photoelectrochemical cell, Photochem. Photobiol., 48: 115-121
- Lemieux, S., Carpentier, R. (1988). Properties of a photosystem II preparation in a photoelectrochemical cell, J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 2: 221-231
- Marshall, J.S., DeRocher, A.E., Keegstra, K., Vierling, E. (1990) Identification of heat shock protein hsp70 homologues in chloroplasts, Proc. Natl. Acad. Sci., 87: 374-378
- McCain, D.C., Croxdale, J., Markley, J.L., (1989). Thermal Damage to Chloroplast Envelope Membranes, Plant Physiol., 90: 606-609
- Mimeault, M., Carpentier, R. (1987 a). Electrochemical monitoring of electron transfer in thylacoid membranes, Enzymes Microb. Technol., 10: 691-693
- Mimeault, M., Carpentier, R., (1987 b). Electrochemical differentiation between photosystem I and II in thylakoid membranes, Biochem. Cell Biol., 66: 436-441

- Mimeault, M., Carpentier, R., (1989). Kinetics of photocurrent induction by a thylakoid containing electrochemical cell, Bioelectrochem. Bioenerg., 22: 145-158
- Misr, A.N., Meena, M., (1986). Effect of temperature on senescing detached rice leaves: I. Photoelectron transport activity of chloroplasts, Plant Science, 46: 1-4
- Murphy, D.J., (1986). The molecular organization of the photosynthetic membranes of higher plants, Biochim. Biophys. Acta, 864: 33-94
- Nash, D., Miyao, M., Murata, N., (1985). Heat inactivation of oxygen in Photosystem II particles and its acceleration by chloride depletion and exogenous manganese, Biochim. Biophys. Acta, 807: 127-133
- Nugent, J.H.A., Bendall, D.S., (1987). Functional size measurements on the chloroplast cytochrome bf complex, Biochim. Biophys. Acta, 893: 177-183
- Peters, F.A.L.J., Van Wielink, J.E., Wong Fong Sang, H.W., De Vries, S., Kraayenhof, R., (1983). Studies on well coupled photosystem I enriched subchloroplast vesicles content and redox properties of electron-transfer components, Biochim. Biophys. Acta, 722: 460-470
- Purcell, M., Carpentier, R. (1990). A phytotoxicity biosensor using photosynthetic membranes, Water Poll. Res. J. Canada, 25: 175-185
- Raison, J.K., Berry, J.A., (1979). Viscotropic denaturation of chloroplast membranes and acclimation to temperature by adjustment of lipid viscosity, Carnegie Inst. Wash., 78: 149-152
- Raison, J.K., Pike, C.S., Berry, J.A., (1982). Growth Temperature-Induced Alterations in the Thermotropic Properties of Nerium oleander Membrane Lipids, Plant Physiol., 70: 215-218
- Raison, J.K., Roberts, J.K.M., Berry, J.A., (1982). Correlations between the thermal stability of chloroplast (thylakoid) membranes and the composition and fluidity of their polar lipids upon acclimation of the higher plant, Nerium oleander, to growth temperature, Biochim. Biophys. Acta, 688: 218-228
- Reilly, P., Nelson, N., (1988). Photosystem I complex, Photosynth. Research, 19: 73-84
- Restivo, T.M., Tassi, F., Maestri, E., Lorenzoni, C., Puglisi, P.P., Marmioli, N., (1986). Identification of chloroplast associated heat-shock proteins in Nicotina plumbaginifolia protoplasts, Curr. Genet., 11: 145-149

- Sakurai, H., San Pietro, A., (1985). Association of Fe-S centers(s) with the largest subunit(s) of photosystem I particles, J. Biochem., 98: 69-76
- Santarius, K.A., (1980). Membrane lipids in injury of spinach chloroplasts, Physiol. Plant, 49: 1-6
- Scheller, H.V., Moller, B.L., (1990). Photosystem I polypeptides, Physiol. Plant., 78: 484-494
- Scheller, H.V., Svendsen, I., Moller, B.L., (1989). Subunit composition of photosystem I and identification of center X as a [4Fe-4S] iron-sulfur cluster, J. Biol. Chem., 264: 6929-6934
- Schreiber, U., Armond, P.A., (1978). Heat-induced changes of chlorophyll fluorescence in isolated chloroplasts and related heat-damage at the pigment level, Biochim. Biophys. Acta, 502: 138-151
- Seemann, J.R., Downton, J.S., Berry, J.A., (1986). Temperature and Leaf Osmotic Potential as Factors in the Acclimation of Photosynthesis to High Temperature in Desert Plants, Plant Physiol., 80: 926-930
- Singh, B.R., Singhal, G.S., (1989). Role of Surface Proteins in the Manifestation of Temperature Effect on Thylakoid Membranes, Biochem. Physiol. Pflanzen, 185: 1-10
- Sundby, C., Anderson, B., (1985). Temperature-induced reversible migration along the thylakoid membrane of photosystem II regulates its association with LHC-II, FEBS Lett., 191: 24-28
- Sundby, C., Melis, A., Mäenpää, P., Andersson, B., (1986). Temperature-dependent changes in the antenna size of Photosystem II. Reversible conversion of Photosystem II<sub>α</sub> to Photosystem II<sub>β</sub>, Biochim. Biophys. Acta, 851: 475-483
- Süss, K.-H., Yordanov, I.T., (1986). Biosynthetic Cause of in Vivo Acquired Thermotolerance of Photosynthetic Light Reactions and Metabolic Responses of Chloroplasts to Heat Stress, Plant Physiol., 81: 192-199
- Thomas, P.G., Quinn, P.J., Edouards, W. (1986). The origin of photosystem-I-mediated electron transport stimulation in heat-stressed chloroplasts, Planta, 167: 133-139
- Thomasset, B., Thomasset, T., Vejux, A., Jeanfils, J., Barbottin, J.N., Thomas, D., (1982). Immobilized thylakoids in a cross-linked albumin matrix, Plant Physiol., 70: 714-722

- Thurnauer, M.C., Brown, J.W., Gast, P., Feezel, L.L., (1989). EPR studies of the vitamin  $k_1$  semiquinone radical anion. Comparison to the electron acceptor  $A_1$  in green plant photosystem I, Radiat. Phys. Chem., 34: 647-651
- Upham, B.L., Hatzios, K.K., (1986). Diethyldithiocarbamate, a new photosystem I electron donor of Mehler-type Hill reactions, Z. Naturforsch., 41c: 861-866
- Velitchkova, M., Ivanov, A.G., Petkova, R., (1989). Mechanism of heat induced stimulation of PSI activity in pea chloroplasts, Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci., 587-590
- Velitchkova, M.Y., Ivanov, A.G., Christov, A.M., (1989). Ultrastructure and Fluorescence Properties of a granal and stromal Membranes of Peas Chloroplasts Exposed to Heat Stress, Photosynthetica, 23: 360-363
- Venediktov, P.S., Krivoshejeva, A.A., (1984). Effects of pH and deuterium oxide on the heat-inactivation temperature of chloroplasts, Planta, 160: 200-203
- Vierling, E., Mishkind, M.L., Schmidt, G.W., Key, J.L., (1986). Specific heat shock proteins are transported into chloroplasts, Proc. Natl. Sci., 83: 361-365
- Vierling, G., Harris, L.M., Chen, Q., (1989). The Major Low-Molecular-Weight Heat Shock Protein in Chloroplasts Shows Antigenic Conservation among Diverse Higher Plant Species, Molec. Cell. Biol., 9: 461-468
- Vigh, L., Gombos, Z., Horvath, Joo, F., (1989). Saturation of membrane lipids by hydrogenation induced thermal stability in chloroplast inhibiting the heat-dependent stimulation of Photosystem-I mediated electron transport, Biochem. Biophys. Acta, 979: 361-364
- Wynn, R.M., Luong, C., Malkin, R., (1989). Maize photosystem I, Identification of the subunit which binds plastocyanin, Plant Physiol., 91: 445-449
- Wynn, R.M., Malkin, R., (1988). Characterization of an isolated chloroplast membrane Fe-S protein and its identification as the photosystem I Fe-S<sub>A</sub>/Fe-S<sub>B</sub> binding protein, FEBS Lett., 229: 293-297
- Wynn, R.M., Malkin, R., (1990). The photosystem I 5.5 kDa subunit (the psaK gene product), An intrinsic subunit of the PSI reaction center complex, FEBS Lett., 262: 45-48

Yordanov, I., Dилова, S., Petkova, R., Pangelova, T., Goltsev, U., Süss, K.-H., (1986). Mechanisms of the temperature damage and acclimation of the photosynthetic apparatus, Photobiochem. Photobiophys., 12: 147-155

Zilber, A.L., Malkin, R., (1988). Ferredoxin cross-links to a 22 kD subunit of photosystem I, Plant Physiol., 88: 810-814