

UNIVERSITE DU QUEBEC

THESE PRESENTEE A

L'UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DU DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE (Ph.D)

PAR

EMMANUEL KWASI NENONENE

EFFETS DU PHOSPHATIDYLGlycérol ET DES CATIONS MONO- ET
DIVALENTS DANS LA FORMATION ET L'ACTIVITÉ DES COMPLEXES
LIPIDES-POLYPEPTIDES DU PHOTOSYSTÈME II.

JUIN 1992

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.

RESUME

La membrane des thylacoïdes des chloroplastes est un réseau continu comportant une région empilée (thylacoïde granaire) et une région non empilée (lamelle du stroma). Elle est constituée de polypeptides comprenant des pigments et des centres d'oxydo-réduction qui sont organisés adéquatement dans un environnement lipidique pour une conversion efficace de l'énergie lumineuse en énergie chimique. Cette membrane des thylacoïdes est le site des fonctions essentielles des plantes vertes. Ces fonctions consistent à absorber la lumière solaire, à produire de l'oxygène et à estérifier l'adénosine diphosphate (ADP) en adénosine triphosphate (ATP) qui est une molécule hautement énergétique. La dégradation de l'eau qui aboutit à la production de l'oxygène a lieu dans la région granaire des thylacoïdes au niveau des polypeptides du photosystème II (PSII). On a souvent pensé que les lipides des thylacoïdes existaient uniquement pour former la matrice de la membrane, mais de nos jours, des travaux sont entrepris pour connaître le rôle structural et fonctionnel de ces lipides.

Nous pensons que les lipides sont nécessaires pour le maintien de la conformation et l'orientation adéquates des polypeptides du PSII. Pour comprendre le rôle et la fonction

de ces lipides, nous nous proposons de reconstituer la membrane des thylacoïdes à partir des polypeptides du PSII et des vésicules formées avec des lipides spécifiques tels les phospholipides. D'une part, des particules de PSII sont extraites de plantules d'orge et l'analyse des polypeptides est faite par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. D'autre part, des vésicules de phosphatidylglycérol (PGV) sont préformées par dispersion du phosphatidylglycérol (PG) dans un milieu aqueux. Ensuite ces particules de PSII sont incubées avec les vésicules de PG pour constituer des complexes PSII-PGV. L'activité photosynthétique de ces particules de PSII est étudiée en mesurant le dégagement d'oxygène. Nous avons observé que ce phospholipide stimule la production d'oxygène dans les particules de PSII. Dans un milieu réactionnel contenant 5 mM $MgCl_2$ et 15 à 100 mM de NaCl, la procédure de congélation-décongélation du système (méthode qui est supposée recréer l'organisation spatiale originale des complexes lipide-protéine (McDonnel et Staehelin 1980)) provoque une diminution de cette activité dans les particules de PSII alors qu'elle reste intacte dans les complexes PSII-PGV. Cet effet stimulateur du PG est strictement lié au rapport lipide/protéine. Il est plus important juste après reconstitution membranaire et diminue avec le temps. Le maintien de cette activité nécessite la présence de cations divalents (Mg^{2+}) à une concentration seuil de 5 à 6 mM qui provoque une agrégation du complexe PSII-PGV.

L'effet de PG et des cations divalents s'expliquerait par une modification de la conformation des polypeptides du PSII et par la neutralisation des charges négatives de surface dans les complexes PSII-PGV. Ces effets provoqueraient une déshydratation de l'interface lipide-eau pour favoriser l'agrégation du système, ainsi qu'une diminution des interactions électrostatiques pouvant empêcher la diffusion des unités de PSII à travers la matrice phospholipidique. Des travaux en spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier viennent appuyer cette hypothèse, en montrant des changements de conformation hélicoïdale au niveau des polypeptides du PSII lorsqu'ils sont en présence du PG et du $MgCl_2$.

REMERCIEMENTS

Je remercie le Dr Mario Fragata de m'avoir accepté dans son laboratoire et de m'avoir guidé par ses conseils à la réalisation de ce travail. Qu'il soit assuré de toute ma gratitude.

Mes sincères remerciements vont aux docteurs Claude Arbour, Michel Lafleur, François Lamarche et Quy Massicotte qui ont bien voulu m'honorer de leur confiance en jugeant ce travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de toute mon admiration.

Cela me fait également plaisir d'adresser ma reconnaissance à tous mes amis qui, sans le savoir, m'ont apporté le soutien moral nécessaire à la réalisation de cette thèse. Je ne peux vous citer tous ici de peur que la liste soit trop longue mais je suis certain que vous vous reconnaîtrez tous n'est-ce pas?!! Hé ho ho!!!, vous avez été tout simplement formidables avec moi.

Cette thèse est dédiée à mes parents, à mes frères et soeurs ainsi qu'à Joanne F., qui ont partagé avec moi, mes inquiétudes et mes joies lors de la rédaction de ce mémoire.

Joanne, I want to share this special event with you and tell you how wonderful you are.

TABLE DES MATIERES

	Page
RESUME	ii
REMERCIEMENTS	v
TABLES DES MATIERES	vi
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES FIGURES	xiii
LISTE DES ABREVIATIONS	xvi
CHAPITRES	
I INTRODUCTION	
1.1 Organisation et fonctionnement de la membrane photosynthétique.....	01
1.1.1 Organisation générale de la membrane des thylacoïdes.....	04
1.1.2 Organisation moléculaire de la membrane des thylacoïdes.....	07
1.1.3 Les systèmes photosynthétiques.....	11
a) Structure et fonction du photosystème I.....	11
b) Structure et fonction du photosystème II.....	14

1.1.4	Le complexe cytochrome b6/f.....	15
1.1.5	Le complexe ATP synthétase et la phosphorylation.....	16
1.1.6	Interrelation entre les différents constituants de la membrane photosynthétique.....	17
1.2	Composition lipidique de la membrane des thylacoïdes.....	19
1.3	But du travail.....	25
II	MATERIELS ET METHODES.....	28
2.1	Matériel biologique et analyse des lipides..	28
2.1.1	Culture des plantules d'orge.....	28
2.1.2	Composés chimiques et analyse des lipides utilisés.....	29
2.2	Méthodes expérimentales.....	32
2.2.1	Extraction des membranes de PSII.....	32
2.2.2	Préparation des vésicules lipidiques.	34
2.2.3	Préparation des complexes PSII-vésicules lipidiques.....	35
2.3	Méthodes d'analyse.....	35
2.3.1	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide.....	35
2.3.2	Mesure du dégagement d'oxygène par polarographie.....	37
2.3.3	Mesure de la variation de turbidité par spectroscopie ultraviolet et visible.	39

2.3.4 Spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier.....	41
III INTERACTIONS PHOTOSYSTEME II - LIPIDES DES THYLACOIDES	
3.1 Organisation moléculaire du photosystème II.	45
3.1.1 Composition polypeptidique du PSII...	45
3.1.2 Les complexes capteurs de lumière et le centre réactionnel.....	52
3.1.3 Le complexe du dégagement d'oxygène..	54
3.2 Reconstitution membranaire.....	57
3.3 Résultats.....	60
3.3.1 Caractérisation des particules sous-membranaires de PSII.....	60
3.3.2 Effet du phosphatidylglycérol sur l'activité de dégagement d'oxygène...	62
a) Dégagement d'oxygène dans le PSII et le complexe PSII-PGV.....	65
b) Réversibilité de l'effet du pH sur les particules de PSII en fonction du temps.....	71
3.3.3 Effet de la phosphatidylcholine sur l'activité de dégagement d'oxygène...	73
3.4 Discussion.....	75
IV EFFETS IONIQUES SUR LES STRUCTURES MEMBRANAIRES RECONSTITUEES	
4.1 Introduction.....	81

4.2 Effets des cations mono- et divalents sur l'activité du PSII.....	82
4.3 Action combinée de PG et de MgCl ₂ sur l'activité photosynthétique.....	85
4.3.1 Variation de l'activité du complexe PSII-PGV en fonction du temps.....	87
4.3.2 Variation de l'activité de dégagement d'oxygène en fonction du rapport PG/PSII.....	89
4.4 Relation entre la turbidité du milieu d'incubation et le dégagement d'oxygène dans les complexes PSII-PGV.....	91
4.5 Importance du polypeptide de 33 kDa.....	94
4.5.1 Désintégration partielle du complexe de dégagement d'oxygène par action des forces ioniques élevées.....	95
4.5.2 Recouvrement de l'activité du PSII dépourvu des polypeptides de 24 et 18 kDa: effet du PG.....	97
4.6 Discussion.....	100
4.6.1 Rôle relatif du rapport PG/PSII et du MgCl ₂ dans le ralentissement de la décroissance de l'activité du complexe PSII-PGV.....	100
4.6.2 Modèle de coopérativité entre les unités de PSII.....	105

V ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE LIPIDE ET POLYPEPTIDES DU PSII PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE PAR TRANSFORMEE DE FOURIER	
5.1 Introduction.....	110
5.2 Structure et modes de vibration des polypeptides du PSII.....	113
5.2.1 Structure des chaînes polypeptides du PSII.....	113
5.2.2 Modes de vibration des amides.....	116
5.3 Structure et modes de vibration des phospholipides.....	118
5.4 Résultats et discussion.....	121
5.4.1 Introduction.....	121
5.4.2 Analyse des spectres FTIR des polypeptides du PSII.....	125
5.4.3 Etude par spectroscopie FTIR des interactions Mg^{2+} avec le phosphatidylglycérol.....	130
5.4.4 Application de la spectroscopie FTIR dans l'étude des complexes PSII-PGV..	138
5.5 Conclusion.....	145
VI CONCLUSION GENERALE.....	148
VII BIBLIOGRAPHIE.....	153

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 1.1 Distribution des lipides dans les membranes des thylacoïdes d'épinard.....	23
Tableau 1.2 Composition lipidique de différentes membranes.....	24
Tableau 3.1 Composition des protéines et des pigments-protéines dans le complexe du photosystème II.....	48
Tableau 3.2 Comportement des lipides en milieu aqueux.	58
Tableau 3.3 Comparaison du taux relatif de polypeptides extrinsèques.....	70
Tableau 3.4 Effet du pH sur les particules de PSII....	74
Tableau 5.1 Tentative d'attribution des bandes de vibration des polypeptides du PSII.....	127
Tableau 5.2a Fréquences de vibration IR du phosphatidylglycérol dans la région des étirements C-H.....	133
Tableau 5.2b Fréquences de vibration IR du phosphatidylglycérol dans la région de 1900 à 900 cm^{-1} .	134
Tableau 5.3a Fréquences de vibration IR des complexes lipides-polypeptides du PSII.....	142

Tableau 5.3b Fréquences de vibration IR des complexes lipides-polypeptides du PSII.....	143
--	-----

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1.1 Organisation structurale du chloroplaste....	03
Figure 1.2 Structure chimique de la chlorophylle.....	05
Figure 1.3 Organisation de la membrane photosynthétique.	08
Figure 1.4 Modèle de la membrane des thylacoïdes.....	10
Figure 1.5 Distribution des photosystèmes à travers la membrane des thylacoïdes.....	12
Figure 1.6 Schéma Z décrivant les transporteurs d'élec- trons dans la membrane photosynthétique.....	18
Figure 1.7 Structure chimique des lipides des membranes de thylacoïdes.....	21
Figure 2.1 Composition des chaînes d'acides gras de la phosphatidylcholine.....	30
Figure 2.2 Composition des chaînes d'acides gras du phosphatidylglycérol.....	31
Figure 2.3 Système optique d'un spectromètre FTIR.....	42
Figure 3.1 Modèle du complexe de PSII.....	46
Figure 3.2 Représentation schématique du centre réac- tionnel du PSII.....	50
Figure 3.3 Spectre d'absorption des particules de PSII.	61
Figure 3.4 Densitogramme électrophorétique du PSII....	63

Figure 3.5 Effet du pH sur les particules de PSII et les complexes PSII-PGV.....	67
Figure 3.6 Effet de la procédure de congélation et de décongélation sur les particules de PSII....	69
Figure 3.7 Variation de l'activité des particules de PSII en fonction du temps.....	72
Figure 3.8 Diagramme représentant l'effet des phospholipides sur les particules de PSII.....	76
Figure 4.1 Effet de sels sur l'activité du PSII.....	84
Figure 4.2 Comparaison entre l'effet des cations sur l'activité du PSII.....	86
Figure 4.3 Décroissance de l'activité du complexe PSII-PGV en fonction du temps.....	88
Figure 4.4 Effet du rapport lipide/protéine sur le PSII.	90
Figure 4.5 Parallélisme entre la turbidité du milieu et l'activité des particules de PSII.....	93
Figure 4.6 Densitogramme électrophorétique des particules de PSII incubées dans un milieu à force ionique élevée.....	96
Figure 4.7 Effet du calcium et du phosphatidylglycérol sur les particules de PSII dépourvues des peptides de 24 et 18 kDa.....	98
Figure 4.8 Courbe théorique des particules de PSII non incorporées dans les vésicules lipidiques lors de l'incubation.....	101

Figure 5.1	Représentation des divers mouvements de vibration d'une molécule.....	112
Figure 5.2	Structure et modes de vibration des amides..	114
Figure 5.3	Spectre d'absorption du triton X-100, des thylacoïdes et des membranes de PSII.....	122
Figure 5.4	Spectre d'absorption de l'oxyde d'hydrogène, de l'oxyde de deutérium, du PSII et du PG... .	124
Figure 5.5	Spectre d'absorption des polypeptides du PSII dans la région des étirements C-H.....	126
Figure 5.6	Spectre d'absorption des polypeptides du PSII dans la région de 1900 à 900 cm^{-1}	129
Figure 5.7	Spectre d'absorption du phosphatidylglycérol dans la région des étirements C-H.....	131
Figure 5.8	Spectre d'absorption du phosphatidylglycérol dans la région de 1900 à 900 cm^{-1}	136
Figure 5.9	Spectre d'absorption du complexe PSII-PGV dans la région des étirements C-H.....	139
Figure 5.10	Spectre d'absorption du complexe PSII-PGV dans la région de 1900 à 900 cm^{-1}	140
Figure 6.1	Effet de MgCl_2 , sur la turbidité d'un mélange de PCh et PG.....	151

LISTE DES ABREVIATIONS

ADP: adénosine diphosphate.

ATP: adénosine triphosphate.

CCL ou LHC: complexe capteur de lumière ou "light harvesting complex".

Chl: chlorophylle.

Cc: concentration critique.

DCBQ: 2,5 dichloro-p-benzoquinone.

DCMU: 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1 diméthylurée.

FNR: ferrédoxine nucléotide réductase.

FTIR: spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier.

MES: acide 2[N-morpholino]éthane sulfonique.

NADP: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

PCh: phosphatidylcholine.

PCy: plastocyanine.

PG: phosphatidylglycérol.

PGV: vésicules de phosphatidylglycérol.

PQ: plastoquinone.

PSI: photosystème I.

PSII: photosystème II.

PSII-PGV: particules de photosystème II incorporées dans les vésicules de phosphatidylglycérol.

P680: centre réactionnel du photosystème II.

P700: centre réactionnel du photosystème I.

SDS-PAGE: sodium dodécylsulfate polyacrylamide gel
électrophorèse.

Temed: N,N,N',N'-tétraméthyléthylène diamine.

Tris ou Trizma: tris(hydroxyméthyl)aminométhane.

CHAPITRE I

INTRODUCTION.

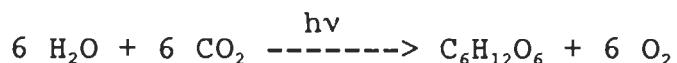
1.1 Organisation et fonctionnement de la membrane photosynthétique.

Les biomembranes sont le siège de phénomènes très importants. Leur premier rôle est la compartimentation des structures biologiques et cette fonction est assurée par les lipides. La membrane cellulaire ne définit pas des entités autonomes, mais plutôt des barrières permettant d'assurer un gradient physico-chimique permanent entre le milieu intérieur et le milieu extérieur. Le fonctionnement physiologique de la membrane permet des échanges continuels de matière, d'information et d'énergie entre la cellule vivante et son environnement. Lipides et protéines sont les constituants les plus importants de la membrane biologique qui délimite une cellule capable d'échange d'énergie avec l'environnement.

Les cellules vivantes tirent leur énergie de deux sources, soit essentiellement de la lumière solaire ou encore des aliments.

La découverte d'un biocatalyseur capable de cliver l'eau en oxygène, en protons et en électrons par l'intermédiaire de la lumière visible, a été un grand pas dans l'évolution de la vie sur terre. Cette découverte a eu deux conséquences importantes: d'une part, l'immense réserve d'eau à la surface de la terre devient ainsi disponible, en tant que source d'hydrogène utilisable par des organismes qui tirent leur énergie de la radiation solaire; d'autre part, la molécule d'oxygène, produit de dégradation de l'eau, devient l'élément principal de la vie en aérobiose.

L'énergie libre consommée par les systèmes biologiques provient de l'énergie solaire captée par le processus de la photosynthèse. Tous les organismes photosynthétiques à l'exception des bactéries, utilisent l'eau comme donneur d'électrons ou d'hydrogène pour réduire le CO₂ ou d'autres accepteurs d'électrons, libérant ainsi une molécule d'oxygène. Nous pouvons résumer ce mécanisme essentiel de la photosynthèse chez les plantes supérieures par l'équation suivante:



Chez les plantes vertes, cette photosynthèse a lieu dans les chloroplastes (Fig. 1.1). La membrane interne du chloroplaste entoure le stroma qui contient des enzymes

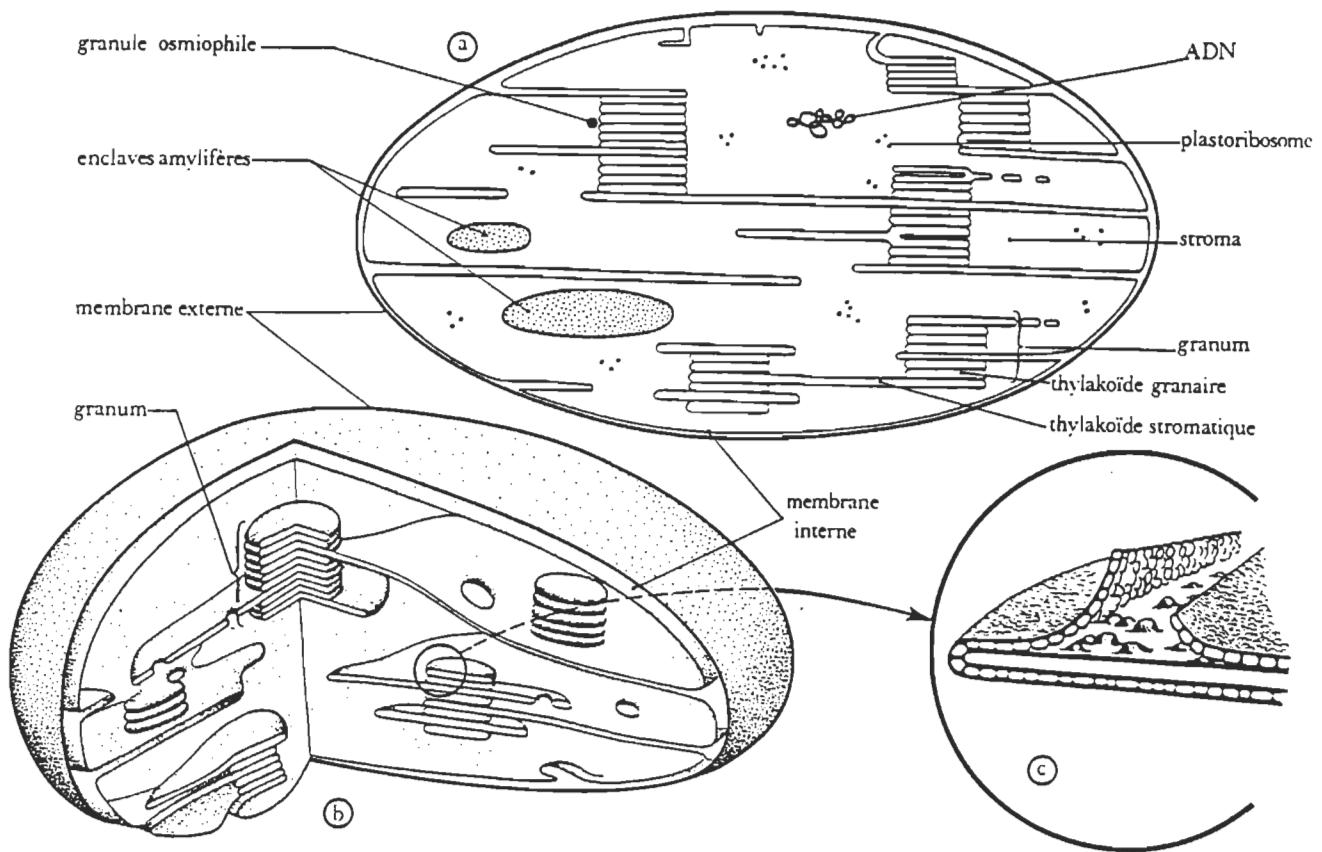


Figure 1.1. Organisation structurale d'un chloroplaste. a) coupe; b) représentation schématique en trois dimensions; c) membrane d'un thylacoïde granaire montrant ses particules constitutives (Camefort, 1972).

solubles et des structures membranaires qui sont des vésicules aplatis, empilées transversalement en travers du chloroplaste. Ces vésicules sont appelées les thylacoïdes et leurs empilements forment des grana. Les membranes des thylacoïdes renferment les pigments et les enzymes nécessaires à la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique.

1.1.1 Organisation générale de la membrane des thylacoïdes.

La première étape de la photosynthèse est l'absorption de la lumière par des centaines de molécules de chlorophylle (Fig. 1.2) qui sont des molécules photoréceptrices. Ces molécules de chlorophylle (Chl) transfèrent leur énergie d'excitation aux centres réactionnels où ont lieu les réactions chimiques. Il existe deux types de chlorophylles (a et b) qui diffèrent par un substituant sur l'un des pyroles. Dans le cas de la Chl a, c'est un groupement méthyle (CH_3) alors que dans la Chl b, c'est un groupement formyle (CHO). Comme nous le verrons sur un spectre d'absorption (voir Fig. 3.3) ces deux types de Chl se complètent pour l'absorption de la lumière solaire incidente. Néanmoins il reste une importante région spectrale de 500 à 600 nm où cette absorption de lumière est très faible.

Les membranes des thylacoïdes contiennent également des pigments dits accessoires qui sont les caroténoïdes. Ces

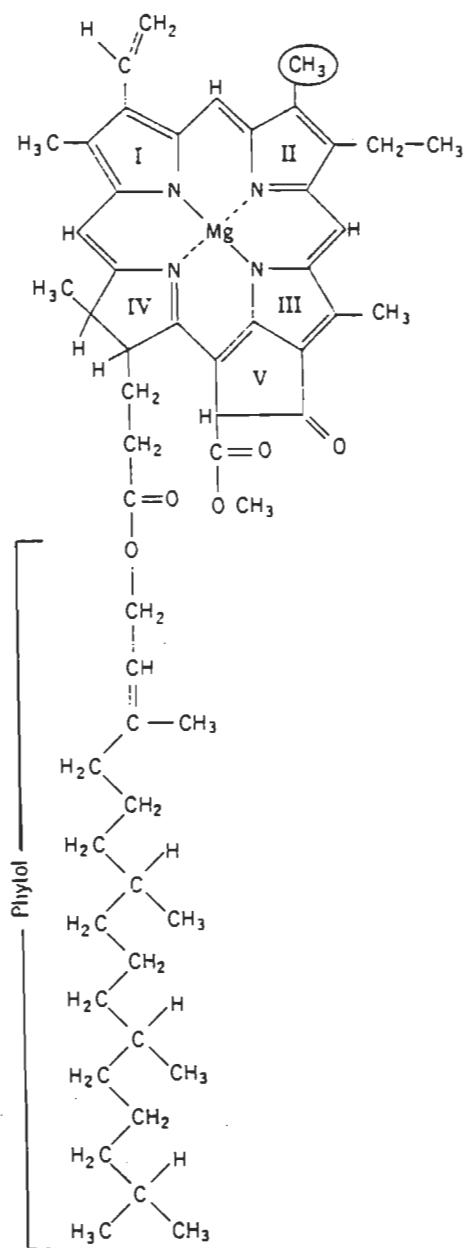


Figure 1.2. Structure chimique de la chlorophylle *a*. Le groupement CH_3 est remplacé par CHO dans la chlorophylle *b*.

pigments semblent jouer également un rôle dans le mécanisme de la photoréception et dans certains cas, participent à la composition des complexes capteurs de lumière ou "light harvesting complex" (CCL ou LHC). Ils seraient liés de façon spécifique et non covalente aux complexes pigments-protéines.

Notons ici que, même si la fonction de la plupart des molécules de Chl est d'absorber la lumière, seules les molécules de Chl des centres réactionnels sont capables d'effectuer le processus de transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique. Cette transformation a lieu au niveau des centres réactionnels du photosystème I (PSI) et du photosystème II (PSII).

Tous les pigments de Chl dans les membranes des thylacoïdes sont associés à des polypeptides spécifiques pour former des complexes Chl-protéines, ce qui expliquerait la variation du taux de Chl qui suit intimement le taux pigments-protéines.

La photosynthèse est divisée en deux étapes: la première aboutit à l'estérification par un phosphate inorganique de l'adénoside diphosphate (ADP) pour donner l'adénoside triphosphate (ATP) et à la réduction du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP) en NADPH_2 . Ceci constitue la phase lumineuse et a lieu dans les membranes thylacoïdiennes. La seconde, la phase obscure, s'effectue dans le stroma et utilise l'ATP et le NADPH pour réduire le dioxyde de carbone atmosphérique en hexoses et autres biomolécules organiques à travers le cycle de Calvin (Arnon 1987).

La double membrane des thylacoïdes dont la propriété primaire, comme pour toute membrane cellulaire, est d'assurer un gradient physico-chimique permanent entre l'espace thylacoïdien et l'espace stromatique, est le site de la fonction essentielle des plantes vertes (absorption de la lumière solaire et transfert d'énergie).

1.1.2 Organisation moléculaire de la membrane des thylacoïdes.

Dans l'organisation des protéines des membranes thylacoïdiennes, on peut distinguer cinq types de complexes: le complexe Chla/b LHC du PSII (Chla/b LHCII), le complexe Chla/PSII (PSII), le complexe Chla/PSI (PSI), le complexe cytochrome b6/f (cyt b6/f) et le complexe ATP synthétase (Murphy 1986a). Ces complexes protéiniques sont responsables de l'absorption de la lumière, du transport des électrons, de la genèse du gradient de protons et de la synthèse de l'ATP dans les membranes des thylacoïdes.

Il existe une distribution asymétrique des complexes protéiniques aussi bien latéralement que transversalement à travers la membrane des thylacoïdes. Cette membrane peut être définie sur le plan structurel et fonctionnel comme un réseau continu comportant deux régions bien distinctes: une région empilée (thylacoïde granaire) et une région non empilée (lamelle du stroma). La face externe de cette

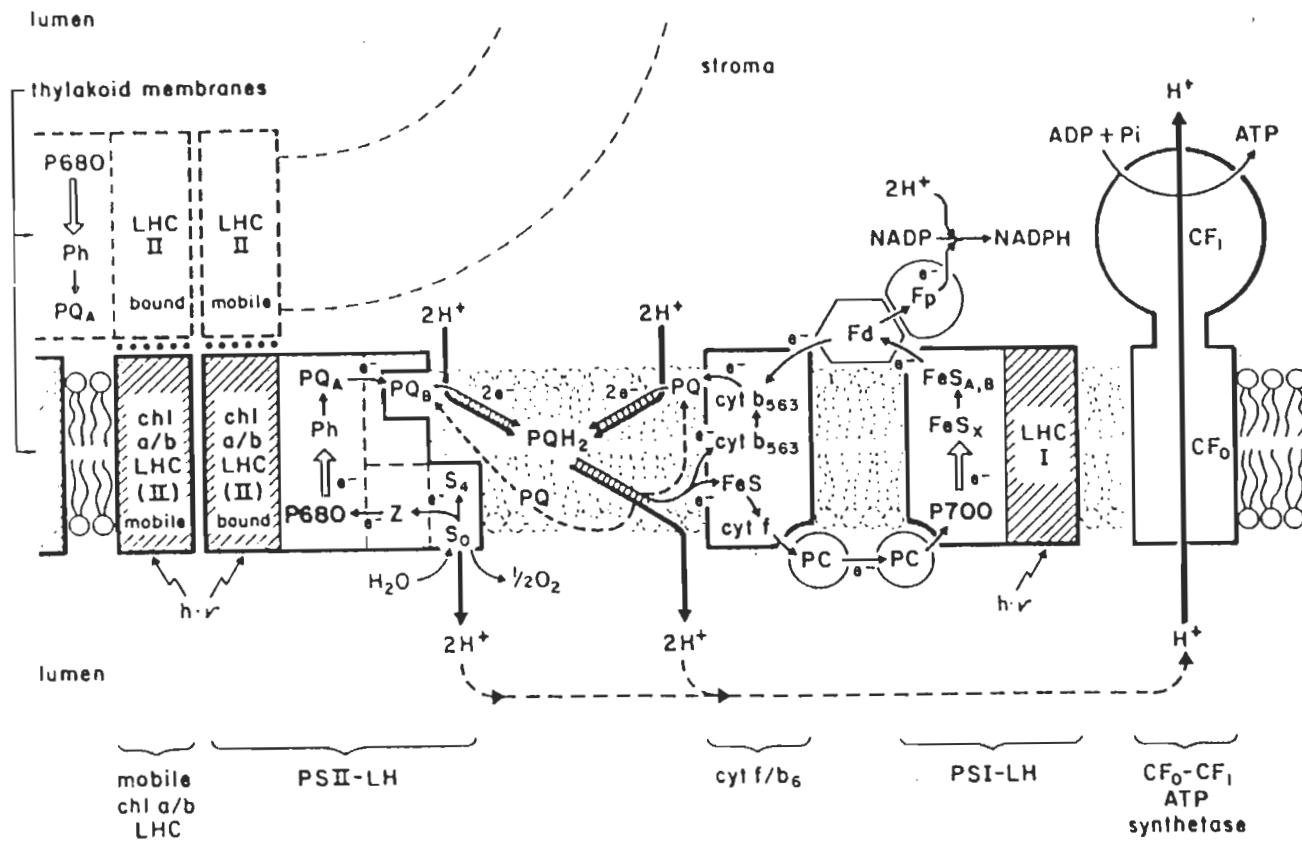


Figure 1.3. Organisation de la membrane photosynthétique avec ses différents constituants qui participent au transport d'électrons (Staehelin et Arntzen, 1983).

dernière est en contact avec le stroma du chloroplaste où a lieu la fixation du dioxyde de carbone, alors que la face interne de toute la membrane des thylacoïdes entoure le lumen.

Le transport d'électrons depuis l'eau jusqu'au NADP nécessite trois systèmes polypeptidiques: le PSII, le cytochrome b6/f et le complexe PSI. Ces systèmes sont en relation les uns avec les autres par la mobilité latérale du "pool" de plastoquinones et de la plastocyanine (Fig 1.3). Ce sont des polypeptides membranaires comprenant des pigments et des centres d'oxydo-réduction qui sont organisés pour une conversion efficace de l'énergie lumineuse en énergie chimique (Fig 1.4).

Le cytochrome b6/f se trouve dans les régions granaire et stromatique (Albertsson et coll. 1991), alors que l'ATP synthétase est localisée uniquement dans la partie non empilée de la membrane des thylacoïdes (Barber 1986, Anderson et Andersson 1988). La ségrégation régionale des photosystèmes I et II fait l'objet de nombreuses controverses, mais des travaux récents (Horváth et coll. 1989, Chow et coll. 1991, Svensson et coll. 1991) montrent une hétérogénéité latérale dans la distribution des photosystèmes à travers la membrane des thylacoïdes. Il existerait deux populations distinctes (α et β) de photosystèmes. Le PSI_α et le PSII_α se trouveraient dans les thylacoïdes granaires alors que le PSI_β et le PSII_β seraient

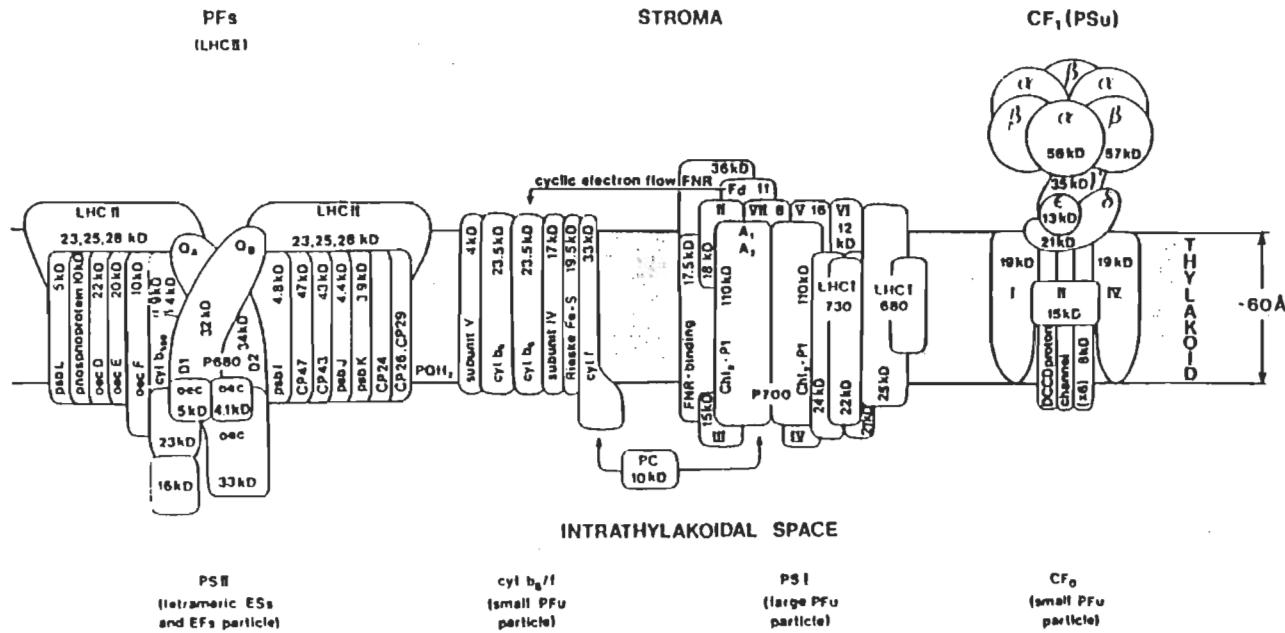


Figure 1.4 Modèle de membrane des thylacoïdes avec les différents polypeptides et leur poids moléculaire (Simpson et von Wettstein, 1989).

localisés quant à eux dans les lamelles du stroma.

1.1.3 Les systèmes photosynthétiques.

a) Structure et fonction du photosystème I.

Chez les plantes supérieures, le photosystème I (PSI) est composé de huit sous-unités protéiniques, d'environ deux cents molécules de chlorophylle a, des caroténoïdes, des phylloquinones et des d'ions sulfureux. Le PSI peut être défini comme une unité structurale capable de catalyser la photo-réduction de la ferrédoxine en utilisant la plastocyanine ou le cytochrome b6/f comme donneur d'électrons. Des mesures de cinétique de photo-oxydation du centre réactionnel du PSI ont permis à Svensson et coll. (1991) de déterminer deux populations (α et β) de PSI. Ces deux types de PSI diffèrent les uns des autres par la taille de leur complexe capteur de lumière ou "light harvesting complex" (CCL ou LHC), par leur composition en pigments chlorophylliens et par leur localisation au niveau de la membrane des thylacoïdes. Svensson et coll. (1991) présentent un modèle de la membrane des thylacoïdes (voir Fig. 1.5) qui montre que le PSI_α est localisé en périphérie de la région granaire et représente environ 35 % du PSI total, alors que le PSI_β se trouve dans les lamelles du stroma en proportion beaucoup plus élevée (65 %). Le LHC du PSI (LHCI) est une antenne périphérique

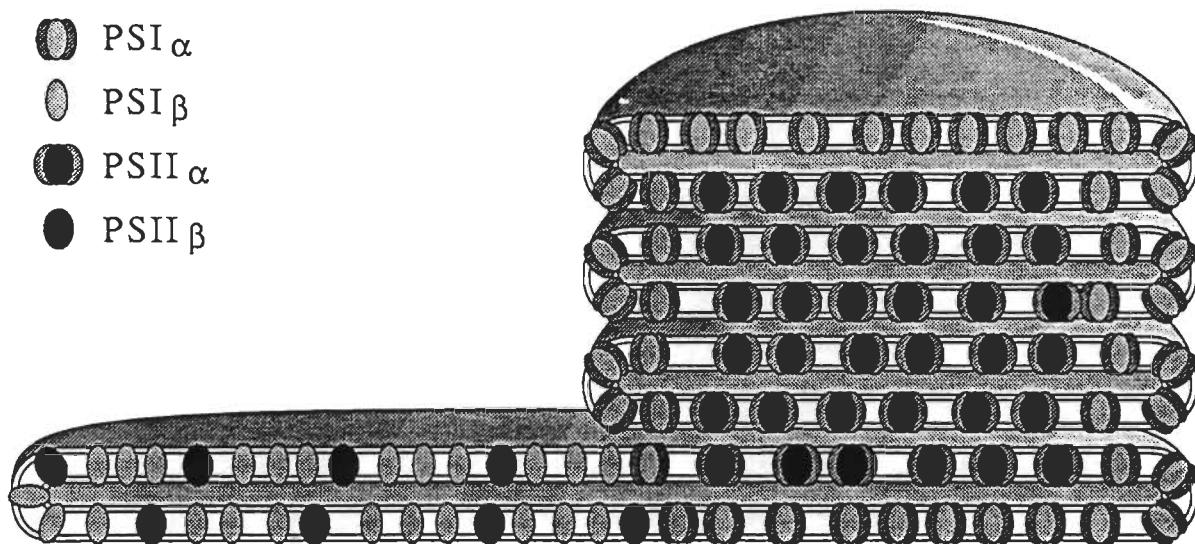


Figure 1.5. Modèle de membrane des thylacoïdes avec la distribution des photosystèmes (Svensson et coll. 1991). Le PSI_α et le PSII_α qui possèdent une antenne captrice de lumière de taille beaucoup plus importante se trouvent dans les grana. Le PSII_α est localisé dans la partie centrale de la région granaire, alors que le PSI_α se trouve en périphérie. Le PSI_β et le PSII_β sont localisés dans la région stromatique.

constituée de Chla/b-protéine avec une proportion importante de Chl b (Thornber 1986). La taille de cette antenne est beaucoup plus importante dans la région granaire que dans la région stromatique, et le LHC du PSI α contient beaucoup plus de Chl b (Svensson et coll. 1991).

L'absorption de la lumière par le PSI induit une excitation des pigments, excitation qui est canalisée vers des molécules de chlorophylles spéciales appelées P700. Bien que la nature exacte du donneur primaire d'électrons P700 ne soit pas bien connue, beaucoup de travaux concourent à considérer que c'est un dimère de chlorophylle a et que son maximum d'absorption se situe à 694 nm alors que sa forme oxydée P700 $^{+}$ absorbe à 687 nm (Ikegami et Itoh 1986, 1988). Le P700 ainsi excité est capable de transférer un électron à l'accepteur primaire A $_0$. C'est la première étape d'une succession de transfert d'électrons depuis la plastocyanine jusqu'à la ferrédoxine (Golbeck 1987). Ce phénomène correspond à une décroissance de l'énergie chimique du système et à une stabilisation de la séparation de charge. Les propriétés chimiques des accepteurs A $_1$ et F $_x$ (voir Fig. 1.6) ne sont pas bien connues mais l'on pense que A $_1$ serait une phylloquinone (vitamine K $_1$) et F $_x$ un centre de sulfure ferreux (FeS); F $_A$ et F $_B$ seraient liés au FeS alors que la ferrédoxine et la plastocyanine seraient respectivement un accepteur et un donneur d'électrons extrinsèques (Lagoutte et Mathis, 1989). La ferrédoxine participe aussi au flux d'électrons cyclique au

niveau du PSI, un processus couplé à la translocation des protons et à la synthèse de l'ATP. Sous sa forme réduite, la ferrédoxine perdra son électron pour la réduction du NADP par l'intermédiaire de complexe FNR (ferrédoxine nucléotide réductase). Le trou d'électrons laissé au niveau de la plastocyanine lors de cette séparation de charge sera comblé par des électrons provenant du PSII via le complexe cytochrome b6/f (Pschorr et coll., 1988).

b) Structure et fonction du photosystème II.

Le photosystème II (PSII) est ainsi dénommé parce que survenu relativement tard dans l'évolution par rapport au PSI. Le PSII confère à la plante, sa capacité d'utiliser l'eau comme donneur d'électrons et de libérer l'oxygène. Il contient environ vingt polypeptides, deux cents molécules de Chl a et b, et des pigments accessoires. Il est activé par la lumière de longueurs d'onde plus courtes (680 nm) comparativement au PSI. Des études de cinétique de fluorescence permirent à Anderson et Melis (1983) de déduire qu'il existerait deux types de photosystème II:

(i) Le PSII_a représente environ 70 à 80 % du PSII total dans la membrane thylacoïdienne. Il est localisé uniquement dans les grana et participe au transport linéaire d'électrons et à la phosphorylation non-cyclique (voir Horváth et coll. 1987, 1989).

(ii) Le PSII_β qui constitue environ 20 à 30 % du PSII total, quant à lui, se trouve presqu'en totalité, localisé dans les lamelles du stroma.

En plus de l'hétérogénéité de leur distribution à travers la membrane, ces deux types de PSII diffèrent également par la dimension de leurs antennes capricieuses de lumière. Le PSII_α contient le LHC II intrinsèque et périphérique (mobile) alors que le PSII_β contiendrait uniquement le LHC II intrinsèque qui lui reste intimement lié (Horváth et coll. 1989). L'organisation moléculaire du PSII fera l'objet d'une étude plus approfondie dans le chapitre 3.

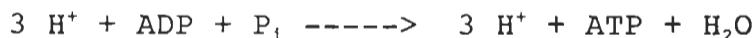
1.1.4 Le complexe cytochrome b6/f.

Le cytochrome b6/f est un complexe protéinique transmembranaire constitué de cinq polypeptides dont le cytochrome f un polypeptide de 34 kDa plus ou moins hydrophobe; le cytochrome b-563 un polypeptide de 23 kDa servant dans le transport vectoriel d'électrons entre les surfaces luménale et stromatique de la membrane des thylacoïdes; le polypeptide de 20 kDa comprenant le groupement à haut potentiel Fe₂S₂ de Rieske; le polypeptide de masse moléculaire comprise entre 15 et 17 kDa dont la fonction est mal connue mais qui jouerait un rôle structural avec le cytochrome b-563 et qui se lierait à la protéine du groupe Fe₂S₂ de Rieske; et enfin un polypeptide de faible masse

moléculaire de 5 kDa. La fonction du complexe cytochrome b₆/f est de drainer les électrons du PSII au PSI servant ainsi d'oxydo-réductase au complexe plastoquinol-plastocyanine et en même temps de pompe à protons. Il serait aussi impliqué dans le transport cyclique d'électrons autour du PSI (Murphy 1986a, Albertsson et coll. 1991).

1.1.5 Le complexe ATP synthétase et la photophosphorylation.

L'ATP synthétase est un complexe enzymatique constitué d'au moins huit sous-unités polypeptidiques différentes qui forment les facteurs de couplage CF₁-CF₀. Ce complexe participe à la translocation des protons et catalyse la réaction de phosphorylation de l'ADP en ATP, selon l'équation suivante:



Le facteur de couplage CF₁ est formé de cinq polypeptides de 59, 56, 37, 17.5 et 13 kDa. Il constitue le composant extrinsèque de l'ATP synthétase et est situé sur la face stromatique de la membrane des thylacoïdes (Strotman et Bickel-Sandkötter 1984). Le facteur CF₁ contient les sites actifs de l'enzyme. Le facteur CF₀ comporte trois sous-unités protéiniques transmembranaires, hydrophobes, de masse moléculaire de 15, 12.5 et 8 kDa. Le CF₀ sert de site de fixation membranaire à CF₁ et agit dans la conduction vers le stroma,

des protons provenant du "pool" de plastoquinones et de la photolyse de l'eau.

Nous devons mentionner ici que lorsque l'énergie lumineuse est captée par la membrane (pigments chlorophylliens), interviennent de façon couplée, un transfert d'électrons longitudinal et un transfert de protons transmembranaire. La différence de pH ainsi créée par suite du passage des protons à travers la membrane provoque la synthèse de l'ATP. Ces protons ainsi que des cations divalents dont le plus important serait le Mg^{2+} , sont requis pour la synthèse de l'ATP (McCarthy et Nalin 1986, Ort 1986).

L'enzyme ATP synthétase est la plus importante pompe à protons. Elle fonctionne en utilisant la force motrice des protons générée par l'oxydation et le transport des électrons. Elle est aussi responsable de l'équilibre acido-basique à l'intérieur de la cellule (Nelson 1988).

1.1.6 Interrelations entre les différents constituants de la membrane photosynthétique.

Les deux photosystèmes sont interreliés par une chaîne de transport d'électrons depuis Q_A l'accepteur primaire du PSII en passant par le cyt b6/f, jusqu'au centre réactionnel P700 du PSI. Cette voie de flux d'électrons est disposée en série. Elle est représentée sous forme de schéma communément appelé schéma Z (cf Fig 1.6). Le donneur primaire du PSII, (P680),

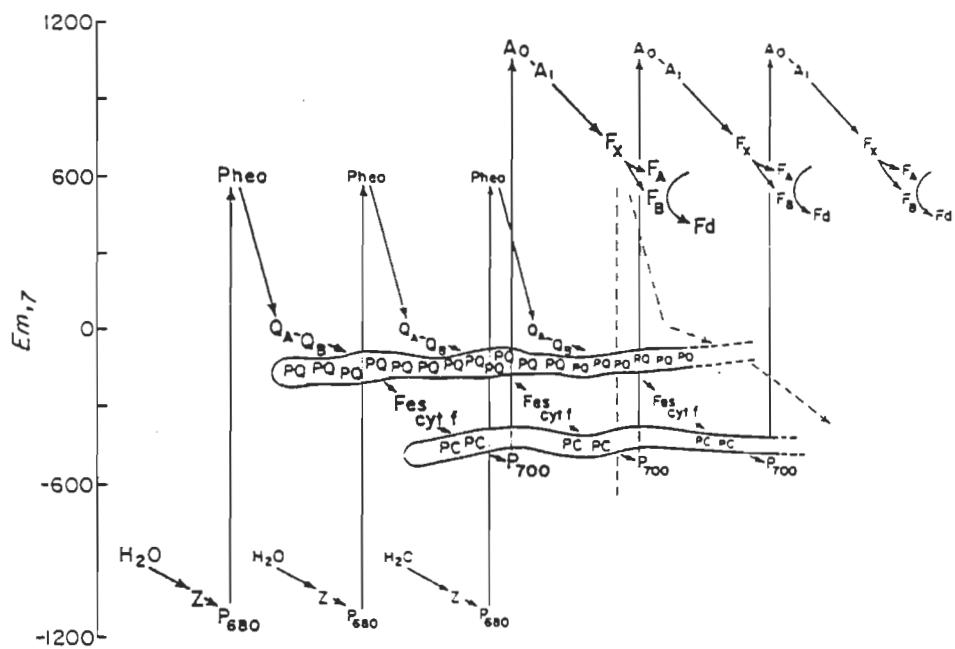


Figure 1.6. Schéma Z décrivant les transporteurs d'électrons dans la membrane photosynthétique (Ort, 1986).

transfert à Q_A par l'intermédiaire de la phéophytine, les électrons qui lui sont fournis par la quinone à haut potentiel Z. Ces électrons, après avoir transité par Q_B , sont accumulés dans un "pool" mobile et lipophile de plastoquinones (PQ). Ils restent ainsi disponibles pour réduire le centre fer-soufre associé au cyt b6/f qui à son tour, réduira le "pool" de plastocyanines (PCy), une métallo-protéine hydrosoluble. Ce transfert d'électrons depuis la molécule d'eau jusqu'à la ferrédoxine est donc assumé par trois complexes protéiques transporteurs d'électrons (le PSII, le cyt b6/f et le PSI) qui sont interconnectés par deux "pool" mobiles.

Au cours de ces différents processus de transport d'électrons, s'effectue une translocation de protons de l'extérieur vers l'intérieur de la membrane des thylacoïdes, et qui seront pompés par le complexe enzymatique ATP synthétase pour catalyser la formation d'ATP à partir d'ADP.

1.2 Composition lipidique de la membrane des thylacoïdes.

Tous les constituants protéiniques que nous venons de décrire ainsi que tous les éléments de la chaîne de transport d'électrons sont distribués dans un environnement lipidique qui forme l'architecture tridimensionnelle de la membrane des thylacoïdes. On a longtemps pensé que les lipides existaient tout simplement pour former la matrice de la membrane cellu-

laire et donc ne jouaient qu'un rôle structurale dans la formation de cette membrane. De nos jours, plusieurs auteurs tentent de comprendre le rôle et la fonction des lipides dans l'activité enzymatique des protéines de l'appareil photosynthétique (Rawyler et Siegenthaler 1980, Gounaris et coll. 1983, 1984, Quinn et Williams 1983, Farineau et coll. 1984, Sprague 1987, Horváth et coll. 1989, Siegenthaler et coll. 1989). Le rôle fonctionnel des lipides membranaires est d'autant plus ambigu et complexe à définir que ces lipides sont responsables du maintien de la conformation et de l'orientation adéquates des protéines membranaires pour l'expression de leurs fonctions. L'étude de ces rôles structural et fonctionnel est faite par la méthode de reconstitution membranaire (McDonnel et Staehelin 1980, Siegel et coll. 1981, Siefermann-Harms et coll. 1982, Sprague et coll. 1985) ou encore par l'effet des lipases spécifiques (Rawyler et Siegenthaler 1981, Tuquet et coll. 1984) qui nous renseignent sur l'importance de certains phospholipides dans l'activité photosynthétique.

Les lipides représentent environ 25 à 35 % (p/p) de la masse totale de la membrane des thylacoïdes, le reste étant constitué de protéines et de pigments. Ces lipides, comme l'indique la figure 1.7, sont glycosylés et polaires. On peut les séparer en cinq classes distinctes: le monogalactosyldiacylglycérol (MGDG), le digalactosyldiacylglycérol (DGDG), le sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG), le

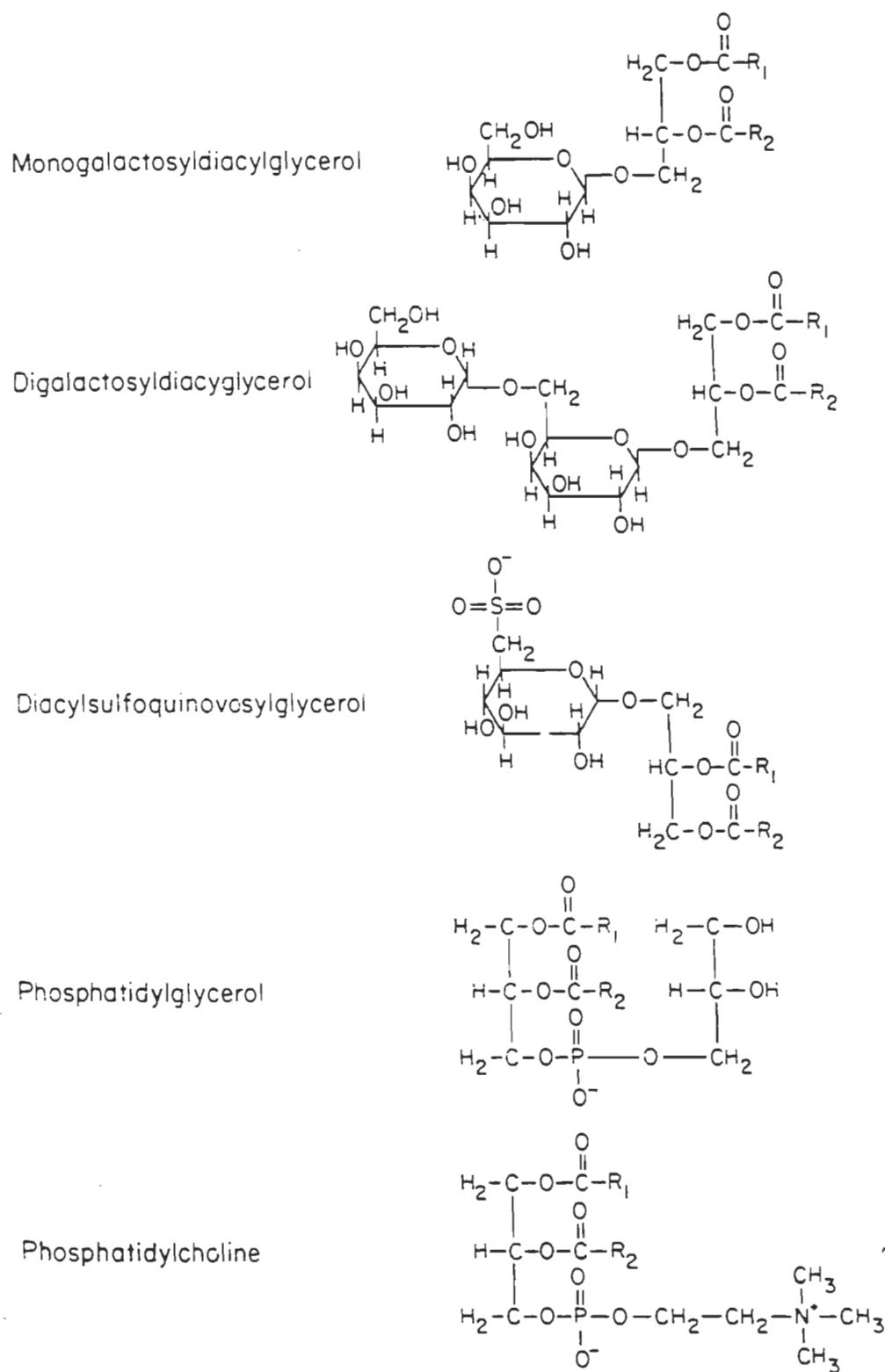


Figure 1.7. Structure chimique des lipides des membranes de thylacoïdes (Ort, 1986).

phosphatidylglycérol (PG) et la phosphatidylcholine (PCh). Les galactolipides (MGDG et DGDG) non chargés représentent à eux seuls environ 78 % des lipides totaux alors que le lipide zwitterionique (PCh) constitue 5 %. Quant aux lipides anioniques (PG et SQDG), ils constituent respectivement 7 et 10 % (voir tableau 1.1). Cette composition lipidique est pour le moins unique dans les biomembranes par sa proportion élevée en glycolipides (MGDG, DGDG et SQDG) et son faible taux en phospholipides (PG et PCh) (voir Murata et coll. 1990) lorsqu'on la compare au contenu lipidique des autres membranes (voir tableau 1.2).

Il faut noter que les lipides des thylacoïdes (Fig. 1.7) ne sont pas distribués de façon homogène à travers la membrane ce qui confère à la structure membranaire une asymétrie transversale et latérale (Siegenthaler et Giroud 1986, Siegenthaler et coll. 1987a, 1988). Cette ségrégation latérale et transversale dans la distribution des lipides nous laisse présumer que la diffusion latérale et transmembranaire des chaînes d'acides gras, retrouvées au niveau des membranes naturelles, seraient très ralenties, voire inexistantes, dans les thylacoïdes. Certains lipides s'accumulent préférentiellement au niveau de la surface concave ou convexe de la membrane en raison de leur encombrement stérique, et d'autres sont connus pour réagir spécifiquement avec des protéines localisées à des endroits différents de la membrane thylacoïdienne (Pick et coll. 1987). D'autre part, selon Murphy

Tableau 1.1 Distribution des lipides dans les membranes des thylacoïdes d'épinard d'après Siegenthaler et coll. (1987a) et Murata et coll. (1990).

<u>Siegenthaler et coll. (1987a)</u>			<u>Murata et coll. (1990)</u>		
<u>% Des différents lipides</u>		<u>% Lipides Totaux</u>		<u>% Lipides totaux</u>	
Memb. Ext.	Memb. Int.	Memb. Ext.	Memb. Int.	Total	
MGDG ^a	65	35	35.2	18.9	54.1
DGDG	15	85	3.6	20.5	24.1
SQDG	40	60	3.8	5.8	9.6
PG	70	30	5.2	2.2	7.4
PCh	60	40	2.9	1.9	4.8
			50.7	49.3	100
					100

^a MGDG, monogalactosyldiacylglycérol; DGDG, digalactosyldiacylglycérol; SQDG, sulfoquinovosyldiacylglycérol; PG, phosphatidylglycérol; PCh, phosphatidylcholine.

Tableau 1.2 Composition lipidique de différentes membranes (en % de la quantité totale de lipides) d'après Shechter 1990.

	Myéline	Erythrocyte	Mitochondrie	Microsome	E. Coli
Cholestérol	25	25	5	6	0
Phospholipides totaux	32	56	95	94	100
PE ^a	14	20	28	17	80
PS	7	11	0	0	0
PCh	11	23	48	64	0
PI	0	2	8	11	0
PG	0	0	1	2	15
DPG ^b	0	0	11	0	5
Sphingolipides	32	18	0	0	0
Autres	11	1	0	0	0

^aPE, PS, PCh, PI, PG: phosphatidyléthanolamine, sérine, choline, inositol, glycérol

^bDPG: diphosphatidylglycérol ou cardiolipide.

et Woodrow (1983), la membrane stromatique contient environ 33 % de MGDG, 30 % de DGDG, 15 % de SQDG, 14 % de PG et 7 % de PCh alors que ces lipides sont présents dans la région granaire des thylacoïdes en proportion respective de 44, 18, 9, 33 et 2 %. Ce dernier résultat bien que très intéressant pourrait cependant être entaché d'erreur vu que le pourcentage total se chiffre à 106 %.

1.3 Buts du travail.

Les lipides sont essentiels pour l'activité catalytique de plusieurs enzymes membranaires. La plupart des enzymes deviennent inactifs ou du moins perdent de façon très importante leur activité lorsque l'environnement lipidique se trouve modifié. La phosphatidylcholine (PCh) par exemple est le seul phospholipide qui active l'enzyme β hydroxybutyrate déshydrogénase contenu dans la membrane mitochondriale (voir Gennis 1989). Alors que les phospholipides activent la pyruvate oxydase d'*Escherichia coli*, que l'activité du Ca^{2+} -ATPase du reticulum endoplasmique dépend du contenu en phospholipides et que la phosphatidylsérine et le phosphatidylglycérol (PG) restorent l'activité enzymatique de Na^+/K^+ -ATPase dans les plasma membranes de cellules animales, le transport du glucose dans les membranes d'érythrocytes n'est pas perturbé par la transition de phase (crystal-liquide en gel) lorsque la reconstitution membranaire est effectuée avec du PG alors

qu'il est affecté lorsqu'il s'agit de la PCh (voir Gennis 1989). Les travaux de Massicotte et coll. (1990) montrent que l'altération de l'environnement lipidique des récepteurs du glutamate par la phospholipase C peut moduler la conformation et la fonction de ces récepteurs.

Le présent travail se propose d'étudier le rôle fonctionnel des lipides et les changements conformationnels que ceux-ci peuvent induire aux protéines, auxquelles ils sont liés par des interactions physiques diverses telles que les interactions électrostatiques, les liaisons hydrogène, les interactions hydrophobes et les interactions de van der Waals. A cette fin, la méthode de reconstitution membranaire sera utilisée. La reconstitution membranaire semble heuristique car, bien qu'elle ne nous donne pas tous les éléments biochimiques nécessaires et indispensables pour parfaire la qualité et la quantité des constituants de la membrane naturelle, elle nous permet néanmoins de comprendre le rôle et la fonction de chaque élément pris séparément. Cette reconstitution se fera par incubation des polypeptides du photosystème II des thylacoïdes, avec des vésicules unilamellaires formées à partir de phospholipides tels que le phosphatidylglycérol (PG) ou la phosphatidylcholine (PCh) pour former des protéoliposomes. Les protéines vont s'orienter à l'intérieur de la membrane de phospholipides selon les interactions qui peuvent avoir lieu (voir plus haut). D'après la forme et les réarrangements structuraux que celles-ci vont subir, on peut s'atten-

dre à la modification de l'activité de ces polypeptides, par exemple, au niveau de la fonction essentielle des complexes de dégagement d'oxygène du PSII.

Nous étudierons l'effet des cations mono et divalents sur l'activité du photosystème II. Cette étude se fera respectivement sur les polypeptides du PSII, sur des dispersions aqueuses de PG et PCh soniquées et sur des mélanges PSII-lipides. Elle nous permettra, en fonction de la variation de la turbidité du système, de déterminer d'une part, la concentration ionique nécessaire pour obtenir une activité maximale et d'autre part, le seuil d'agrégation des vésicules lipidiques, autrement dit la concentration critique pour une agrégation du système membranaire.

Enfin, la spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier nous fournira des données nécessaires et indispensables pour analyser les interactions moléculaires qui se produisent lors de la reconstitution et de l'agrégation des systèmes membranaires.

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES.

2.1 Matériel biologique et analyse des lipides.

2.1.1 Culture des plantules d'orge.

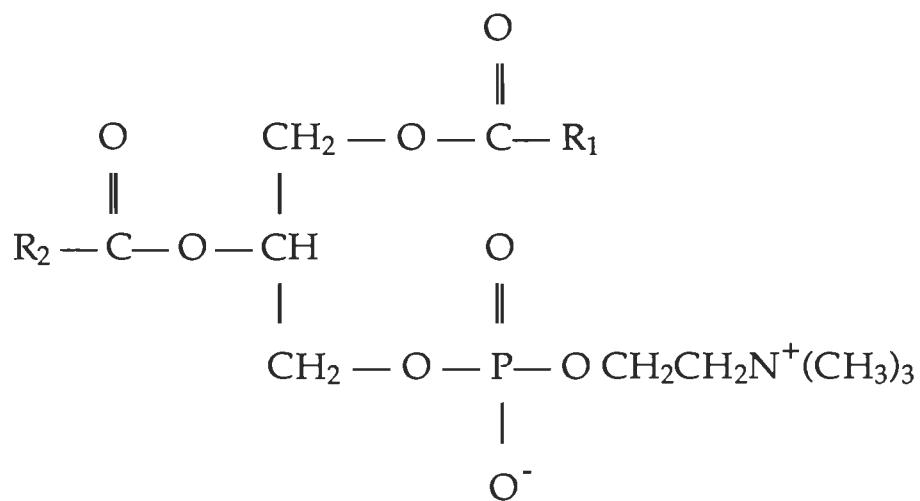
- Nous nous sommes proposé de travailler sur des feuilles d'orge (Hordeum vulgare), d'une part, parce que la culture de cette plante supérieure de type C₃ est relativement facile. D'autre part, parce que nous pouvons contrôler certains paramètres de croissance des plantules tels que l'humidité de la chambre de croissance (70 ± 10 %), la température (25°C) et l'éclairage assuré par une lampe au sodium qui délivre une intensité de 470 W. La récolte des feuilles est faite au bout du 8^{ème} jour. Six heures avant l'expérimentation, les plantules sont placées à l'obscurité afin de permettre les réactions de la phase obscure de la photosynthèse, et du même fait, de réduire la quantité d'amidon dans les plantes.

2.1.2 Composés chimiques et analyse des lipides utilisés.

Toutes les substances chimiques utilisées dans ce travail pour la préparation des solutions tampons proviennent de Sigma Chemical Company (St Louis, MO, USA) et de Fisher Scientifique (Ottawa, ON, Canada). L'oxyde de deutérium (99.9 atome % D) provient de MSD Isotopes (Division de Merck Frosst Canada Inc., Montréal, Québec), alors que le $\text{BF}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 14 % (p/v) provient de Pierce Chemical Company (Rockford, IL, USA).

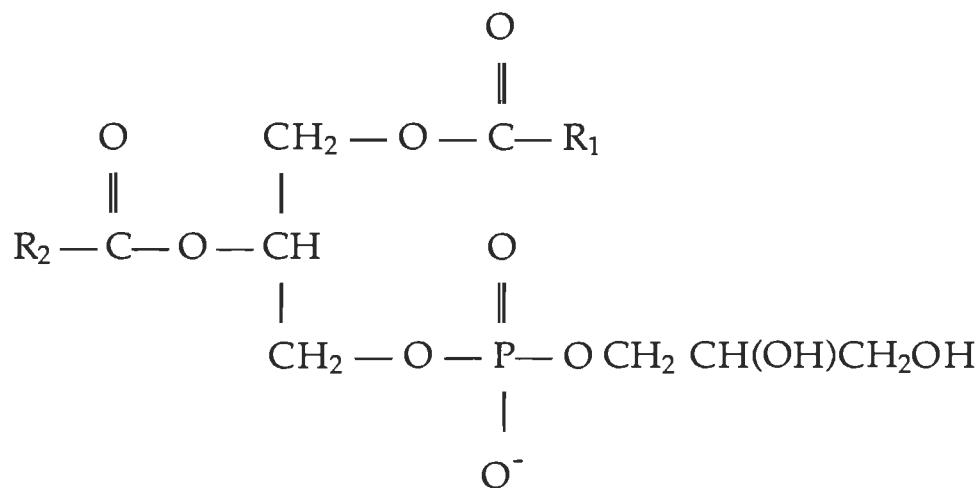
Le L- α -phosphatidylglycérol (PG) est obtenu auprès de Serdary Research Lab. Inc. (London, ON, Canada). Les chaînes d'acides gras des lipides utilisés, sont analysées par chromatographie en phase gazeuse des esters de méthyl formés (voir e.g. Lehninger 1981). La méthylation est faite avec 0.1 mg de lipide et 1 mL de $\text{BF}_3/\text{CH}_3\text{OH}$. Les lipides méthylés sont solubilisés dans 40 μL d'hexane distillé. L'identification de chaque groupe de méthyl-ester est assurée par comparaison de son temps de rétention avec celui d'un standard connu. Cette analyse est pratiquée sur un chromatographe en phase gazeuse, modèle 3700 de Varian (Sunnyvale, Ca, USA) équipé d'un intégrateur Shimadzu, modèle C-R3A (Kyoto, Japon).

La L- α -phosphatidylcholine (PCh) a été extraite dans le laboratoire selon la méthode de Singleton et coll. (1965). Brièvement, la lécithine est précipitée par de l'acétone froide, et cette étape est répétée une à deux fois, afin



CHAÎNES D'ACIDES GRAS	MOLE %
16:0	37.9
16:1	2.1
18:0	9.8
18:1	34.0
18:2	14.0
20:4	2.2

Figure 2.1. Structure chimique de la phosphatidylcholine extraite du jaune d'oeuf avec la composition des chaînes d'acide gras.



CHAÎNES D'ACIDES GRAS	MOLE %
16:0	36.45
16:1	0.63
18:0	12.67
18:1	32.59
18:2	11.60
18:3	2.97

Figure 2.2. Structure chimique du phosphatidylglycérol extrait du jaune d'oeuf avec la composition des chaînes d'acide gras.

d'éliminer tous les pigments. Ensuite, elle est solubilisée dans l'éthanol à la température de la pièce, concentrée et dissoute dans 300 mL d'éther de pétrole. Les phospholipides obtenus sont alors précipités dans l'acétone froide, redissous dans un volume minimum d'éther de pétrole et précipités de nouveau dans l'acétone froide: cette étape permet d'assurer la purification des phospholipides. Le précipité ainsi recueilli, est dissous dans du chloroforme en vue de la chromatographie sur colonne d'alumine (80-200 mesh). L'élution est assurée avec un mélange de chloroforme:méthanol (9:1). Enfin, l'étape de la chromatographie en couche mince sur gel de silice avec un éluant composé d'un mélange chloroforme:méthanol:eau (65:25:4), permet de vérifier la pureté des fractions de PCh obtenues.

La composition des chaînes d'acides gras de la PCh et celle du PG sont reportées sur les figures 2.1 et 2.2. Tout au long de ce travail, nous utiliserons des phospholipides dont la composition est sus-mentionnée afin d'éviter l'effet de changements de chaînes d'acides gras sur l'activité photosynthétique (voir à ce sujet Huner et coll. 1987).

2.2 Méthodes expérimentales.

2.2.1 Extraction des membranes de photosystème II.

Les membranes de PSII sont isolées à partir de jeunes

plants d'orge selon la méthode de Berthold et coll. (1981), avec quelques modifications décrites par Ford et Evans (1983), Ikeuchi et Inoue (1986) ainsi que Ghanotakis et coll. (1987). 100g de feuilles sont broyées pendant environ une minute dans 250 mL de tampon contenant 50 mM Tricine-NaOH (pH 7.8), 0.4 M de Sorbitol et 10 mM NaCl. Cet homogénat est filtré à travers huit couches de toile et la suspension de chloroplastes ainsi obtenue est centrifugée à 277 K pendant 90 sec à une vitesse de 5049 x g. Le culot est suspendu dans un volume minimum de tampon contenant 10 mM Tricine-NaOH (pH 7.8), 10 mM NaCl et 5 mM MgCl₂ et centrifugé de nouveau à 277 K pendant 5 min à une vitesse de 1075 x g. Le culot ainsi obtenu représente des thylacoïdes que nous suspendons dans un tampon de 20 mM MES-NaOH (pH 6.5), 0.4 M Sucrose, 15 mM NaCl et 5 mM MgCl₂ désigné ici comme tampon A, pour obtenir une concentration de chlorophylle de 2 mg/mL. Le dosage de chlorophylle est fait selon les méthodes de Arnon (1949) et Holden (1976).

Ensuite la suspension de thylacoïdes est incubée sous faible agitation, avec un volume équivalent de tampon A contenant 5 % de Triton X-100 (20mg/mg de Chl), à 273 K pendant 20 min et à l'obscurité. Après cette période d'incubation, la préparation est centrifugée à 277 K pendant 3 min à une vitesse de 4300 x g et le surnageant est recueilli pour être centrifugé de nouveau à 277 K pendant 35 min à 29000 x g. Le culot final obtenu représente les

membranes de PSII que nous suspendons dans un faible volume de tampon A contenant 0.1 % de digitonine et 30 % (v/v) d'éthylène glycol. Ces membranes de PSII sont conservées à 143 K pour une utilisation ultérieure.

Avant d'être utilisées, les particules de PSII sont lavées dans du tampon A, et centrifugées à 277 K pendant 35 min, à une vitesse de 29000 x g. La concentration de chlorophylle dans nos préparations de PSII est maintenue à 2 mg/mL.

2.2.2 Préparation des vésicules lipidiques.

Les vésicules lipidiques sont préparées suivant la méthode de Huang (1969) avec quelques légères modifications. Le lipide dissous dans du chloroforme, est séché sous un jet d'azote pendant un temps suffisamment long pour éliminer toute trace de solvant. Le film de lipide obtenu est dispersé dans le tampon A sus-mentionné ou dans une autre solution lorsque celle-ci est indiquée. La suspension aqueuse ainsi obtenue, constituée de vésicules multilamellaires de taille variable, est soumise à une sonication pendant 13 minutes, à une puissance de 160 W, dans un sonicateur Heat Systems-Ultrasonics, modèle W-225R (Plainview, LI, USA). Cette procédure de sonication qui nous permet d'obtenir des vésicules unilamellaires, s'effectue à une température variant entre 277 et 283 K, sous un courant d'azote pour éviter l'auto-oxydation des chaînes hydrocarbonées. Elle se

fait dans un tube sans sonde de titane lorsque la quantité de lipide n'excède pas 20 mg dans un volume total de 2 mL.

2.2.3 Préparation des complexes PSII-Vésicules lipidiques.

Les particules membranaires de PSII sont mélangées et incubées, pendant 20 minutes à l'obscurité et à une température de 273 K, avec des vésicules lipidiques, pour former un complexe PSII-Lipide. La quantité de PSII est calculée en fonction de sa teneur en chlorophylle. Les différentes extractions de particules de PSII que nous avons utilisées dans ce travail ont un rapport Chl/protéine compris entre 0.12 et 0.13 (voir tableau 1 dans Fragata et coll. 1990a). La concentration de protéine est déterminée selon la méthode de Lowry et coll. (1951). Le rapport lipide/Chl est maintenu à 20/1 (p/p) soit 23 moles de PG/mole de Chl c'est-à-dire un rapport lipide/protéine de 2.50/1 (p/p) tout au long de ce travail sauf lorsque nous le mentionnerons pour d'autres conditions d'expérimentation.

2.3 Méthodes d'analyse.

2.3.1 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide.

La composition protéique des membranes de PSII intactes et de celles qui ont subi un traitement de sels pour la dégrada-

tion de certains polypeptides, est analysée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide selon la méthode décrite par Chua (1980).

Les échantillons sont dilués à 1 mg/mL de chlorophylle dans une solution tampon composée de 5 mM Tris (pH 6.8), 5 % mercapto-éthanol, 1.5 % SDS et 28 % glycérol. Les protéines standard provenant de Bio-Rad Laboratories, (Richmond, Ca, USA) qui nous serviront de référence pour la détermination du poids moléculaire des polypeptides des membranes de PSII, sont diluées au 10^{ème} dans la solution tampon sus-mentionnée. Ces préparations chauffées à 100°C pendant 5 minutes et refroidies à la température de la pièce, sont déposées sur un gel de compression constitué de 5 % polyacrylamide (5 % acrylamide et 0.13 % bis-acrylamide), 0.025 % persulfate d'ammonium, 0.1 M de Tris (pH 6.8) avec 0.1 % SDS et 16 µL de Temed dans un volume total de gel de 10 mL. Ce gel de compression surmonte un gel de séparation composé de 15 % polyacrylamide (15 % acrylamide et 0.4 % bis-acrylamide), 0.125 % persulfate d'ammonium, 1 M de Trizma (pH 9.1) avec 0.1 % SDS et 25 µL Temed dans 40 mL de gel. Au gel de compression, aussi bien qu'au gel de séparation, sont ajoutées 6 M d'urée. Le système discontinu de polyacrylamide permet d'augmenter la résolution des bandes de protéines (voir Hames, 1981). Un second procédé d'électrophorèse utilisant un gradient de sucre a été utilisé pour confirmer les bandes et le poids moléculaire des protéines. Dans ce

cas, un gradient de 10 à 20 % de sucre dans le gel de séparation et 7.5 % de sucre dans le gel de compression ont été utilisés à la place de l'urée.

Les différentes protéines sont soumises à un champ électrique de 75 mA à l'aide d'un générateur de courant Ortec, modèle 4100 Pulsed Constant Power Supply. A la fin de la migration des protéines, le gel de séparation est coloré au bleu de Coomassie brillant R-250 (Bio-Rad Laboratories) et ensuite décoloré dans une solution contenant 3 % de glycérol, 20 % de méthanol et 7 % d'acide acétique glacial. Cette procédure de coloration-décoloration, révèle les protéines contenues dans les membranes de PSII. Le poids moléculaire, ainsi que la concentration relative obtenue à partir de l'intensité d'absorbance de chaque bande de protéine, sont déterminés à l'aide d'un densitomètre, modèle LKB 2222-020 Ultroscan XL Laser, muni d'un intégrateur, modèle LKB 2220 (Pharmacia LKB Biotechnology, Baie d'Urfé, Québec, Canada).

2.3.2 Mesure du dégagement d'oxygène par polarographie.

Les chloroplastes, plus précisément les complexes Chl-protéines du photosystème II, lorsqu'ils sont illuminés en présence d'un accepteur artificiel d'électrons, peuvent produire un dégagement d'oxygène selon la réaction de Hill:



Cette production d'oxygène est mesurée par une méthode polarographique utilisant un système d'électrodes dont une cathode en platine et une anode en argent avec un pont de solution de KCl saturée pour assurer une continuité électrique entre les deux électrodes (Hansatech D.W. Oxygen Electrode Unit, King's Lynn, Norfolk, England). Cette électrode de Clark est recouverte d'une membrane de Téflon de 0.0125 mm d'épaisseur, perméable à l'oxygène, qui la sépare du milieu réactionnel. Ce système d'électrodes beaucoup plus orthodoxe que ceux précédemment utilisés, permet d'enregistrer une réponse presqu'instantanée, caractéristique des réactions photosynthétiques (Delieu et Walker, 1972). Il a d'autre part comme atout principal, la possibilité de réaliser des mesures dans un volume très faible de 0.5 à 2 mL.

Le principe de la polarographie consiste dans la réduction au niveau de la cathode, de l'oxygène en peroxyde d'hydrogène. Le courant ainsi généré est directement proportionnel à la quantité d'oxygène réduite, c'est-à-dire à la capacité du matériel photosynthétique de dégager ou de consommer de l'oxygène. La chambre de réaction est entourée d'un compartiment de verre en silicate de bore, dans lequel circule de l'eau maintenue à une température donnée par un bain thermostaté.

L'activité des particules de PSII ($0.02 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ de Chl) est mesurée en présence de 350 μM de DCBQ, utilisé comme accepteur artificiel d'électrons. Après une période

d'incubation de 2 minutes à l'obscurité, à une température de 298 K dans la chambre de réaction, avec un milieu tampon approprié (pH et concentration ionique), les échantillons sont irradiés par une lumière blanche à intensité saturante.

2.3.3 Mesure de variation de la turbidité par spectrophotométrie ultraviolet et visible.

L'agrégation des particules en suspension dans un milieu aqueux peut être suivie par l'augmentation de la turbidité du milieu. La mesure de cette agrégation fait appel à la théorie de Rayleigh-Gauss-Debye (voir Day et coll. 1980), lorsque les particules sont petites par rapport à la longueur d'onde de la lumière émise. Cette théorie est basée sur le fait que lorsqu'une lumière d'intensité I_0 passe à travers une solution dans laquelle sont dispersées des particules, il y a une dispersion de cette lumière incidente et une diminution de la lumière transmise (I). Ce phénomène répond à l'expression:

$$I = I_0 \exp(-Bd)$$

où d représente la dimension ou le parcours optique occupé par les particules, et B leur absorbance spécifique.

Cette absorbance spécifique est définie par:

$$B = \frac{8\pi^3(\varepsilon_L - \varepsilon_w)^2}{3\lambda^4\varepsilon_w^2} \frac{Nv^2}{}$$

ε_L et ε_w représentent respectivement l'indice de réfraction de la particule phospholipidique (1.44) et de l'eau (1.33) (voir Tredgold 1977), λ la longueur d'onde, N le nombre de particules par unité de volume et v le volume de la particule.

La variation de la turbidité des échantillons de PSII, des vésicules lipidiques et des complexes protéines-lipides, est étudiée par addition de $MgCl_2$ au milieu d'incubation et suivie sur un spectrophotomètre SLM modèle DW-2000 (SLM Instruments, Urbana, ILL, USA), sans son "beam scrambler".

Le milieu d'incubation des échantillons, qui dans ce cas, servira aussi de solution tampon pour la préparation des vésicules lipidiques est composé de 20 mM MES-NaOH (pH 6.5), 0.4 M sucrose, 15 mM NaCl, désigné ici comme tampon B.

Le changement de turbidité est apprécié par rapport à une solution de référence composée de tampon B, lorsque l'on ajoute 2 μL d'une solution-mère de ce même tampon B contenant 1 M de sels de chlorures, dans un volume total d'échantillons de 2 mL. La concentration de Chl est fixée à 0.4 mg.mL⁻¹ alors que celle des lipides est à 8 mg.mL⁻¹.

2.3.4 Spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier.

Les méthodes spectroscopiques permettent d'élucider les changements électroniques et structuraux survenant au niveau des biomolécules. C'est ainsi que l'infrarouge par transformée de Fourier servira dans l'investigation et la caractérisation de la structure et de la fonction des complexes protéines-lipides du photosystème II. Les questions théoriques concernant la méthode FTIR seront développées plus loin dans le chapitre 5.

Contrairement à la méthode conventionnel, l'infrarouge par transformée de Fourier irradie l'échantillon avec toutes les longueurs d'ondes de façon simultanée. Son principe consiste à amener un faisceau polychromatique sur un séparateur de faisceau (beam splitter) qui va transmettre une première moitié de la radiation et réfléchir la deuxième moitié, sur deux miroirs M_1 et M_2 , placés à angle droit l'un par rapport à l'autre (Fig. 2.3, voir Pachler et coll. 1988). Alors que M_1 est fixe, M_2 mobile peut se déplacer perpendiculairement à son axe. Après avoir parcouru une distance L , le faisceau réfléchi tombe sur le miroir M_1 . Sa radiation est une fois encore réfléchie pour revenir sur le séparateur de faisceau, après avoir parcouru une distance totale de $2L$. Le faisceau transmis suit un parcours similaire, mais grâce au mouvement de va-et-vient du miroir M_2 sur une distance X , la longueur du parcours de ce faisceau transmis devient alors $2(L + X)$.

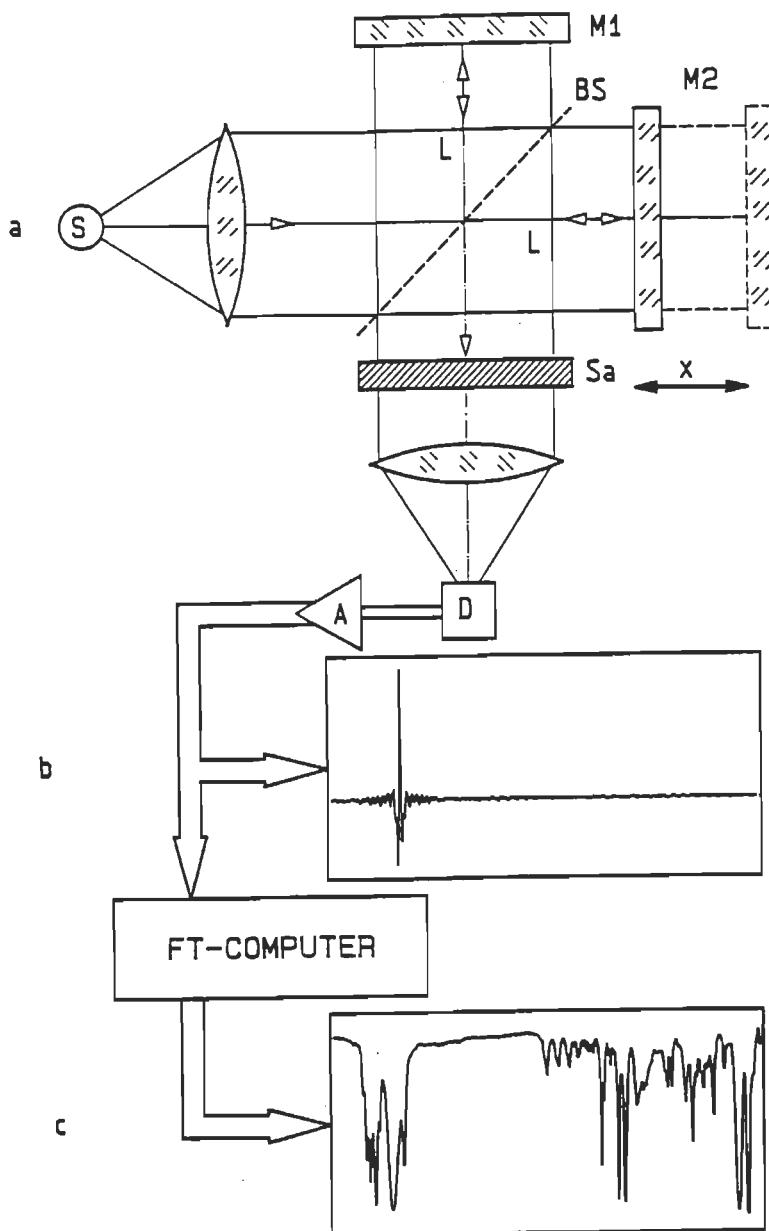


Figure 2.3. Système optique d'un spectromètre FTIR (Pachler et coll. 1988).
 a) Schéma d'un interféromètre de Michelson: (S) source de radiation; (Sa) échantillon; (D) détecteur; (A) amplificateur; (M1) miroir fixe; (M2) miroir mobile; (BS) séparateur de faisceau ou beam splitter; (X) déplacement de miroir; (L) distance parcourue par le faisceau réfléchi. b) Interférogramme ou signal enregistré par le détecteur. c) Spectre obtenu par transformée de Fourier de l'interférogramme.

C'est ainsi qu'au cours de la recombinaison au niveau du séparateur, les deux faisceaux possèdent une différence de longueur de parcours de $2X$, ce qui crée une interférence. Le faisceau recombiné est modulé au niveau du "beam splitter", et passe à travers l'échantillon pour être focalisé sur le détecteur. Sa fréquence de modulation est définie par l'expression $F = V \times W$ où V est la vitesse de déplacement du miroir (0.5 cm.s^{-1}) et W le nombre d'ondes (5000 à 500 cm^{-1}) dans nos conditions expérimentales. Le jeu des miroirs provoque à la sortie du détecteur, un interférogramme qui est la somme trigonométrique des ondes pour toutes les fréquences utilisées. La transformation de Fourier de l'interférogramme donne le spectre infrarouge, source de renseignements sur les vibrations fréquentielles des liaisons interatomiques des molécules biologiques étudiées. Cette étude est faite à l'aide d'un spectromètre Bomem DA3.02 infrared Fourier transform (Bomem Inc, Vanier, Québec, Canada), équipé d'un détecteur MCT (mercure-cadmium-tellure). Le séparateur de faisceau est constitué de germanium déposé sur une plaque de bromure de potassium (KBr) et couvre la région de 500 à 5000 cm^{-1} , la vitesse du balayage est de 0.50 cm/sec avec une ouverture de faisceau de 1.5 mm et une résolution de 4 cm^{-1} . Ce système est muni d'un filtre passe-bas de 20.0 KHz et d'un filtre passe-haut de 2.0 Hz .

Les échantillons (PSII et les vésicules lipidiques), sont préparés dans deux solutions différentes: la première est un

tampon constitué d'eau lourde (D_2O), et composé de 20 mM MES-NaOH (pD 6.5), 0.4 M sucre et 15 mM NaCl; la seconde est une solution constituée uniquement de D_2O . Les membranes de PSII sont incubées pendant deux heures, dans ces solutions, et ensuite centrifugées pendant 35 minutes, à une vitesse de 29000 x g et à une température de 277 K. Ces étapes d'incubation et de centrifugation sont répétées une seconde fois, afin d'éliminer l'eau (H_2O) des préparations, en raison de ses larges bandes dans les régions étudiées. Le culot final est pris en sandwich entre deux fenêtres de BaF₂ dont la référence a été préalablement prise. D'autre part, pour éliminer les traces de D_2O ou H_2O , une autre méthode consiste à préparer de minces films, en déposant quelques gouttes d'échantillons (PSII, vésicules lipidiques ou encore complexe PSII-lipide) sur les fenêtres et à les laisser sécher pendant 10 à 24 heures.

Les spectres d'absorption sont obtenus en FTIR, par addition de 100 ou 500 interférogrammes. Les fenêtres de BaF₂, de dimensions 25 mm de diamètre et 2 mm d'épaisseur, couvrent une région allant de 1000 à 50000 cm^{-1} et leur indice de réfraction est de 1.45. Elles proviennent de la compagnie Harrick Scientific (Ossining, NY, USA).

CHAPITRE III

INTERACTIONS PHOTOSYSTEME II - LIPIDES DES THYLACOIDES.

Le photosystème II ainsi que les lipides font partie intégrante de la membrane des thylacoïdes. Leur fonction ne peut être étudiée sans une connaissance préalable de la structure de la membrane photosynthétique et des mécanismes de transfert d'énergie et d'électrons qui s'y produisent. C'est ainsi que nous décrirons d'abord, les aspects structuraux des constituants de cette membrane, avant d'entreprendre l'étude des interactions privilégiées entre protéines et lipides des thylacoïdes.

3.1 Organisation moléculaire du photosystème II.

3.1.1 Composition polypeptidique du photosystème II.

Des techniques d'électrophorèse ont permis de déterminer la composition du complexe de PSII. Il est constitué d'une vingtaine de polypeptides, des pigments de chlorophylle et de caroténoïde, des molécules de phéophytine, des quinones, des

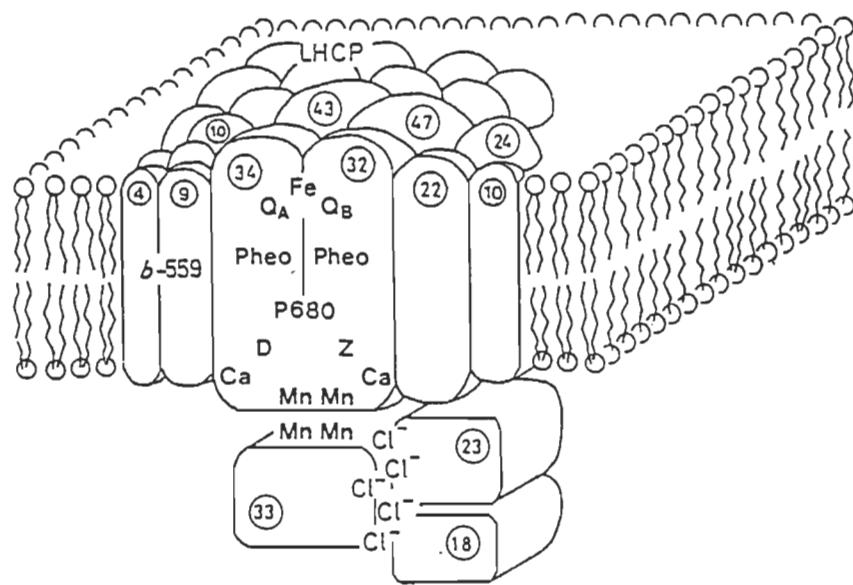


Figure 3.1. Modèle du complexe de PSII (Murata et Miyao 1989).

ions inorganiques et des lipides (Fig 3.1). Ce complexe protéinique est subdivisé en cinq groupes de constituants (voir Tableau 3.1):

Le "core" complexe du PSII comporte cinq polypeptides hydrophobes, environ cinquante molécules de chlorophylle a associées aux polypeptides de 47 et 43 kDa (Camm et Green 1980). Le polypeptide de 47 kDa est un complexe Chla-protéine, et on pense qu'il aurait un site de fixation pour le P680 et la phéophytine ou encore qu'il agirait comme antenne du centre réactionnel du PSII proprement dit (Camm et Green 1983, 1984, Nakatani et coll. 1984). Mais selon Yamagishi et Katoh (1984), ce polypeptide peut être arraché au complexe du PSII sans qu'il y ait perte significative de photoactivité. Le polypeptide de 43 kDa se lierait lui aussi à la chlorophylle a et servirait probablement comme collecteur de lumière interne en plus du LHCII; il aurait quant à lui un site de fixation pour la quinone Q_A (Murphy 1986a, 1986b) et fonctionnerait uniquement dans le transfert d'énergie.

Deux autres polypeptides d'environ 34 et 32 kDa, respectivement D-1 et D-2 (Arntzen et Pakrasi 1986, Barber 1987, Nanba et Satoh 1987) constitueraient le centre réactionnel proprement dit. D-1 interagirait avec le polypeptide de 43 kDa pour former un site de fixation à la quinone Q_B (accepteur secondaire d'électrons du PSII) et

Tableau 3.1 Composition des protéines et des pigments-protéines dans le complexe du photosystème II d'épinard (Murata et Miyao, 1987)

Composés	Caractéristiques	Stoechiométrie
<u>Protéines du core complexe</u>		
47 kDa	Chl-protéine	1
43 kDa	Chl-protéine	1
34 kDa	protéine D1	1
32 kDa	protéine D2	1
9 kDa]	cyt b-559	2
4 kDa]		2
<u>Protéines extrinsèques</u>		
33 kDa	hydrophile	1
23 kDa	hydrophile	1
18 kDa	hydrophile	1
<u>Complexes capteurs de lumière</u>		
25 et 28 kDa	Chl-protéine	-
<u>Autres protéines</u>		
24 kDa	hydrophobe	-
22 kDa	hydrophobe	-
10 kDa	hydrophobe	-
10 kDa	phosphoprotéine	-
5 kDa	hydrophile	-
<u>Pigments et autres composés</u>		
chl <i>a</i> + <i>b</i>		~200
Pheophytine		2
Plastoquinone		3
Lipides		~300
Mn ²⁺		4

aurait une grande affinité pour les herbicides tels l'atrazine et le DCMU (3-[3,4-dichlorophényl]-1,1-diméthylurée) (Sandmann et Böger 1986). Le polypeptide D-2 lierait aussi des herbicides du genre atrazine et servirait de site de fixation à la quinone Q_A et à la semiquinone D.

Les travaux de Takahashi et coll. (1986) suggèrent que Z, donneur primaire d'électrons à P680, serait localisé sur le polypeptide D-1. La semiquinone D, semblable et symétrique à Z, photo-oxydable mais ne participant pas au transfert d'électrons de l'eau au centre réactionnel P680, serait, quant à elle, localisée sur le polypeptide D-2 (Fig 3.2). Z et D sont des tyrosines alors que D-1 et D-2 seraient des polypeptides de même masse moléculaire d'environ 32 kDa (Rutherford 1989). L'ensemble D-1 et le polypeptide de 43 kDa ainsi que D-2 et le polypeptide de 47 kDa doivent être très proches les uns des autres pour permettre un transfert d'électrons efficace entre les quinones Q_A et Q_B .

A côté de ces quatre polypeptides du "core" complexe, existe le cytochrome b-559. Localisé du côté oxydant du photosystème II et de masse moléculaire variant entre 4 et 10 kDa, c'est un dimère $\alpha\beta$ (Widger et coll. 1985) qui, avec les polypeptides de 47 et 43 kDa, entoure les complexes D-1 et D-2 (Murata et coll. 1984, Rutherford 1989, Simpson et Von Wettstein 1989). La fonction du cytochrome b-559 est très peu connue et son rôle dans le processus de dégagement d'oxygène est discutable mais on pense qu'il participerait à

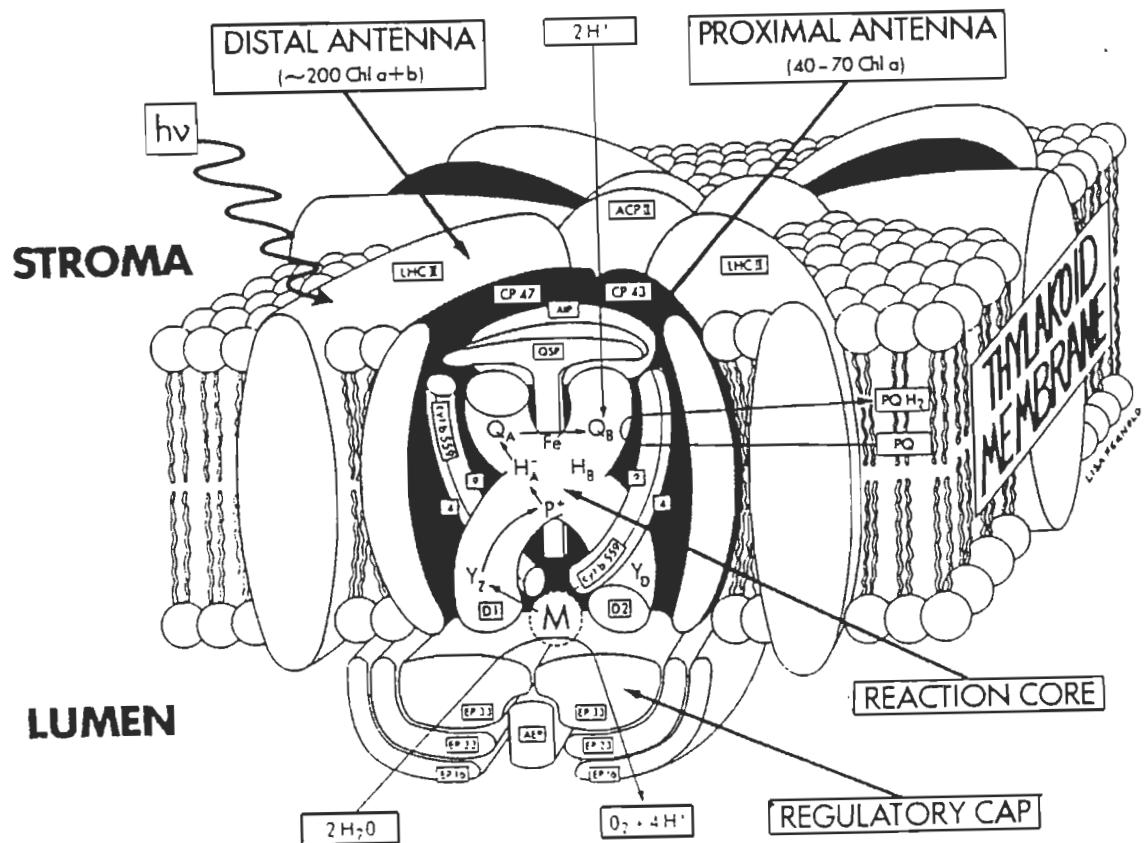


Figure 3.2. Représentation schématique du centre réactionnel du PSII avec les antennes proximale et distale (Hansson et Wydrzynski 1990).

la translocation des protons aussi bien du côté réducteur que du côté oxydant du photosystème II (Butler et Matsuda 1983).

Au centre réactionnel du PSII se trouve intimement lié le "light-harvesting complex" ou complexe capteur de lumière (LHC ou CCL), constitué à moitié de chlorophylle a et b, et de protéines de 25 et 28 kDa. Selon Staehelin (1986), il existerait un deuxième type de CCL qui serait mobile et qui se déplacerait latéralement au travers de la membrane suite à sa phosphorylation (Kyle et coll. 1984) pour servir au PSI et qui aurait de ce fait un rôle dans la régulation de la distribution de l'énergie lumineuse entre les deux photosystèmes. Notons aussi que ces CCL joueraient, non seulement le rôle d'antenne mais contribueraient aussi à l'empilement des thylacoïdes pour la formation des grana (Barber 1986, Thornber 1986, Iordanov et Goltsev 1987, Allen 1992).

Sur la face luménale de la membrane granaire se trouvent les polypeptides extrinsèques de 33, 23 et 18 kDa qui forment le complexe de dégagement d'oxygène (Murata et Miyao 1987).

Il existe d'autres constituants protéiniques dont les polypeptides 24, 22, et 10 kDa qui sont des composés hydrophobes, une phosphoprotéine de 10 kDa et une protéine hydrophile de 5 kDa (voir Murata et Miyao 1987).

D'autre part, il y a la présence de chlorophylle a et b, la phéophytine et la plastoquinone dont nous avions décrit les rôles dans le transfert d'électrons, des atomes de manganèse et des ions chlorures qui sont des cofacteurs dans le processus de dégagement d'oxygène, et des lipides, constituants importants de la membrane des thylacoïdes.

3.1.2 Les complexes capteurs de lumière et le centre réactionnel.

Pour des raisons historiques, l'étude du PSII a débuté bien après celle du PSI dont la composition paraissait beaucoup plus simple et aussi parce que le PSI est d'une stabilité plus grande alors que le PSII est très labile surtout en raison de la fragilité de son complexe de dégagement d'oxygène (Gregory 1989). De nos jours, de nombreux travaux sont effectués sur le PSII (voir pour littérature récente Hansson et Wydrzynski 1990). Cet essor résulte de sa grande similitude avec le centre réactionnel des bactéries qui a été étudié par cristallographie (Deisenhofer et coll. 1984, 1985, Michel et Deisenhofer 1986).

Le clivage de la molécule d'eau en oxygène et en protons a lieu dans des complexes membranaires comprenant plusieurs polypeptides et le processus comporte trois types de réactions: la photo-oxydation d'une paire spéciale de chlorophylle (P680) qui utilise la phéophytine comme accepteur

primaire, et qui elle-même subséquemment, devient donneur d'électrons à la plastoquinone, molécule stable sur le plan énergétique dans la séparation de charge; l'oxydation de l'eau en molécule d'oxygène et en protons qui utilise un site catalytique d'oxydo-réduction constitué de quatre atomes de manganèse et qui nécessite des cofacteurs inorganiques tels les ions calcium et chlorures (Critchley 1985); et enfin la réduction de la plastoquinone par les protons ainsi émis qui vont générer une énergie électrochimique pour la synthèse de l'ATP par l'enzyme ATP synthétase. Comme nous l'avons mentionné plus haut, le complexe du PSII est localisé en majeure partie dans la région empilée de la membrane des thylacoïdes.

Les pigments de l'antenne chlorophyllienne absorbent un photon de la lumière solaire et l'antenne canalise son énergie vers le centre réactionnel P680. Ce dernier passe à un état excité $P680^*$ en absorbant un photon, cède un électron à la phéophytine et se charge positivement. $P680^+$ se trouve ainsi dans un état oxydé avec un potentiel d'oxydo-réduction de 0.85 V lui permettant de tirer un électron du donneur primaire Z. La séparation des charges augmente lorsque successivement la phéophytine transmet son électron à la quinone Q_A , et qu'à son tour, celle-ci le transmet à la quinone Q_B pendant que la charge positive portée par $P680^+$ est neutralisée par un électron provenant de Z, et que $P680$ recouvre sa configuration électronique fondamentale.

Située à la face externe de la membrane des thylacoïdes, la quinone Q_B lorsqu'elle a acquis deux électrons après deux cycles, capte deux protons, intègre le "pool" de plastoquinone dans la matrice lipidique de la membrane et est remplacée par une autre quinone non réduite (Barber 1987). Les protons vont ainsi passer de l'extérieur à l'intérieur de la membrane par ce phénomène d'oxydo-réduction de la plastoquinone. Le cycle des électrons au niveau du complexe du PSII s'achève quand la tyrosine Z située à la face interne de la membrane, recouvre son électron qui lui sera fourni par le cycle d'oxydation de l'eau S_0-S_4 (Ghanotakis et Yocum 1985). Les protons provenant de la dégradation de l'eau et de l'oxydo-réduction de la plastoquinone serviront à la synthèse de l'ATP.

La molécule Z serait une plastosemiquinone (O'Malley et Babcock 1984), S_0-S_4 un complexe catalyseur de l'eau (Ghanotakis et Yocum, 1985), la phéophytine un accepteur intermédiaire d'électrons, Q_A et Q_B des quinones capables d'échange ionique avec le "pool" de molécules liposolubles que sont les plastoquinones (Staehelin 1986) et le P680 un dimère de chlorophylle (Diner 1986) qui trouve son maximum d'absorption à 680 nm.

3.1.3 Le complexe de dégagement d'oxygène.

Les protéines extrinsèques de masse moléculaire 33, 24 et 18 kDa, sont associées au PSII par la surface interne de la

membrane des thylacoïdes. Ces polypeptides sont très hydrophiles en raison de leur indice de polarité respectif (49, 49, 52); ils sont respectivement acide, neutre et basique, avec des points isoélectriques respectifs de 5.2, 6.4 à 7.3 et 9.5 (Kuwabara et Murata 1984, Jansson 1984, Murata et Miyao 1985). Ils forment les protéines du complexe de dégagement d'oxygène.

Les études biochimiques du complexe de dégagement d'oxygène ont été facilitées lorsque l'on a réussi à isoler des membranes de PSII par des traitements aux détergents (voir, e.g., Berthold et coll. 1981). Leur identification est confirmée par des traitements à pH élevé (Kuwabara et Murata 1982) ou encore des traitements avec des concentrations ioniques de sels mono- ou divalents qui détachent ces protéines de leur site de fixation (voir Miyao et Murata 1989) et par conséquent font baisser ou même suppriment complètement le rôle de ce complexe qui est de dégrader l'eau et de produire de l'oxygène (Murata et Miyao 1985, Ghanotakis et Yocum 1985, Andersson 1986). Le polypeptide de 33 kDa est relié au système photosynthétique par des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogène (voir Miyao et Murata 1989). Cependant pour 24 et 18 kDa ce sont des liaisons électrostatiques qui régissent le rattachement de ces polypeptides au complexe du photosystème II (Andersson 1986). Beaucoup d'auteurs ont essayé de mieux comprendre la complexité du PSII en le scindant en ses plus petits composants par chromatographie

(Ikeuchi et coll. 1985, Fragata et coll. 1990a). Ikeuchi et ses collaborateurs ont réussi à solubiliser la membrane de PSII avec de l'octylglucopyranoside (OGP) par centrifugation sur gradient de sucrose. Ils ont caractérisé, par électrophorèse à deux dimensions, les protéines du PSII et ont prouvé que la machinerie minimale qui pourrait oxyder la molécule d'eau et produire de l'oxygène est le centre réactionnel avec les atomes de manganèse et la protéine de 33 kDa. C'est ainsi que Miyao et coll. (1987) montrent que ce polypeptide de 33 kDa est capable d'accélérer la transition de l'état S_3 à S_0 , c'est-à-dire la catalyse de la réaction de dégradation l'eau, et que cette protéine joue le rôle de régulateur dans la stabilisation des atomes de manganèse (Miyao et Murata 1987, Ghanotakis et Yocum 1990). L'atome de manganèse est un cofacteur indispensable pour la production d'oxygène, il catalyse la réaction de transfert d'électrons et présente plusieurs degrés d'oxydation relativement stables. Les ions manganèse peuvent céder de deux à sept électrons à d'autres atomes et l'activité de dégradation de l'eau nécessite quatre atomes de manganèse par centre réactionnel P680. Quant aux polypeptides de 24 et 18 kDa, ils ne participeraient pas directement au mécanisme catalytique de la dégradation de l'eau car on peut obtenir une production d'oxygène lorsque ces peptides sont détachés du complexe du PSII (Ghanotakis et coll. 1985). La protéine de 24 kDa dont le site de fixation se trouve sur le polypep-

tide de 33 kDa, serait un régulateur qui augmenterait l'affinité du site d'oxydation de l'eau aux ions chlorures (Andersson et coll. 1984) et elle peut être remplacée par des ions calcium (Ghanotakis et coll. 1984a, Miyao et Murata 1984). La protéine de 18 kDa quant à elle est fixée sur le polypeptide de 24 kDa, son rôle n'est pas très bien connu mais on pense qu'elle augmenterait aussi l'affinité du PSII aux ions chlorures et calcium (Ghanotakis et coll. 1984b, Miyao et Murata 1985).

3.2 Reconstitution membranaire.

Les interactions entre les lipides polaires et les protéines sont des facteurs importants dans la détermination des propriétés fonctionnelles des membranes biologiques et la plupart des informations sur le rôle des lipides sont obtenues en étudiant des bicouches formées par un lipide spécifique ou encore un mélange de lipides. Certains lipides des thylacoïdes, dont le plus important MGDG, ne forment pas des liposomes lorsqu'ils sont dispersés en milieu aqueux mais plutôt des systèmes micellaires hexagonaux de type H_I et H_{II} (voir tableau 3.2). Quant aux phospholipides, essentiels dans la composition des membranes biologiques, la présence de longues chaînes d'acides gras hydrophobes et surtout d'une tête polaire phosphodiester hydrophile confèrent à ces types de lipides un caractère amphiphile qui permet une formation

Tableau 3.2 Comportement des lipides des membranes de chloroplaste en milieu aqueux. (Sprague et Staehelin 1984)

Extrait lipidique	Méthode	Structures observées
Lipides totaux	Dispersion	- Vésicules - Arrangements tubulaires - Particules lipidiques
Lipides totaux dépigmentés	Phase inverse	- Vésicules - Particules lipidiques
MGDG ^a	Dispersion	- Agrégats amorphes
	Phase inverse	- Réseaux tubulaires - Arrangements tubulaires
DGDG	Dispersion	- Vésicules
	Phase inverse	- Vésicules
PG	Dispersion	- Vésicules
PCh	Dispersion	- Vésicules

^a MGDG, monogalactosyldiacylglycérol; DGDG, digalactosyldiacylglycérol; PG, phosphatidylglycérol; PCh, phosphatidylcholine.

spontanée de structure lamellaire en milieu aqueux (voir e.g., Webb et Green 1991). La taille de la tête polaire et le degré d'hydratation sont les indices qui permettent de déterminer la configuration que le lipide adoptera en milieu aqueux. La formation ou non de la structure lamellaire trouve son importance dans l'étude de la reconstitution membranaire et donc dans le rôle structural et fonctionnel des lipides de la membrane des thylacoïdes.

Les travaux de Murphy et Woodrow en 1983 montrent que les lipides anioniques (PG et SQDG) contribuent pour 43 % de la totalité des chaînes d'acides gras dans la région granaire. D'autre part, le pKa de ces lipides anioniques varie entre 2.9 et 2.0, et dès lors, dans les conditions physiologiques, ils se trouvent chargés négativement. La densité de charge due aux lipides anioniques est très élevée, de l'ordre de 1 pour 700 Å² et nécessite la présence des cations pour l'équilibre dans le phénomène d'empilement des thylacoïdes. On trouve aussi dans cette région granaire la PCh, phospholipide zwitterionique dont la charge nette est nulle au pH physiologique. En raison du haut degré d'hydratation de sa tête polaire (la choline), et de la forte tendance de ce lipide à garder son organisation lamellaire (McIntosh et coll. 1987, Wilshut 1991), la PCh nécessiterait une forte concentration en sels pour participer à l'empilement des thylacoïdes.

3.3 Résultats expérimentaux.

3.3.1 Caractéristiques spectroscopiques et biochimiques des complexes PSII et PSII-PGV.

La figure 3.3 montre un spectre d'absorption typique de particules de PSII que nous avons utilisées, tout au long de nos travaux. L'analyse du spectre révèle des contributions significatives des pigments photosynthétiques majeurs: la Chl a (maximum à 435 et 677 nm), la Chl b (maximum dans la région de 470 nm, avec un épaulement aux environs de 650 nm) les caroténoïdes, probablement la β -carotène (maximum entre 460 et 471 nm, et un épaulement près de 490 nm). Ce spectre révèle d'autre part une très faible bande à 540 nm qui a été attribuée à la phéophytine (voir à ce sujet Fragata et coll. 1987). Notons que le spectre du complexe PSII-vésicules lipidiques ne diffère pas de façon significative de celui des particules de PSII. En effet, les absorbances (A) de PSII et de PSII incorporé dans les vésicules de PG (PSII-PGV) normalisées à leur absorbance à 435 nm, donnent des ratios A_{471}/A_{435} , A_{488}/A_{435} , A_{650}/A_{435} et A_{677}/A_{435} de 0.70, 0.64, 0.32 et 0.66 pour le PSII, et 0.70, 0.63, 0.31 et 0.58 pour le PSII-PGV.

Le diagramme de la composition polypeptidique obtenu par SDS-PAGE, met en évidence huit polypeptides (Figure 3.4). Leur poids moléculaire estimé par densitométrie des gels d'électrophorèse, révèle des polypeptides de 33, 30, 26, 24,

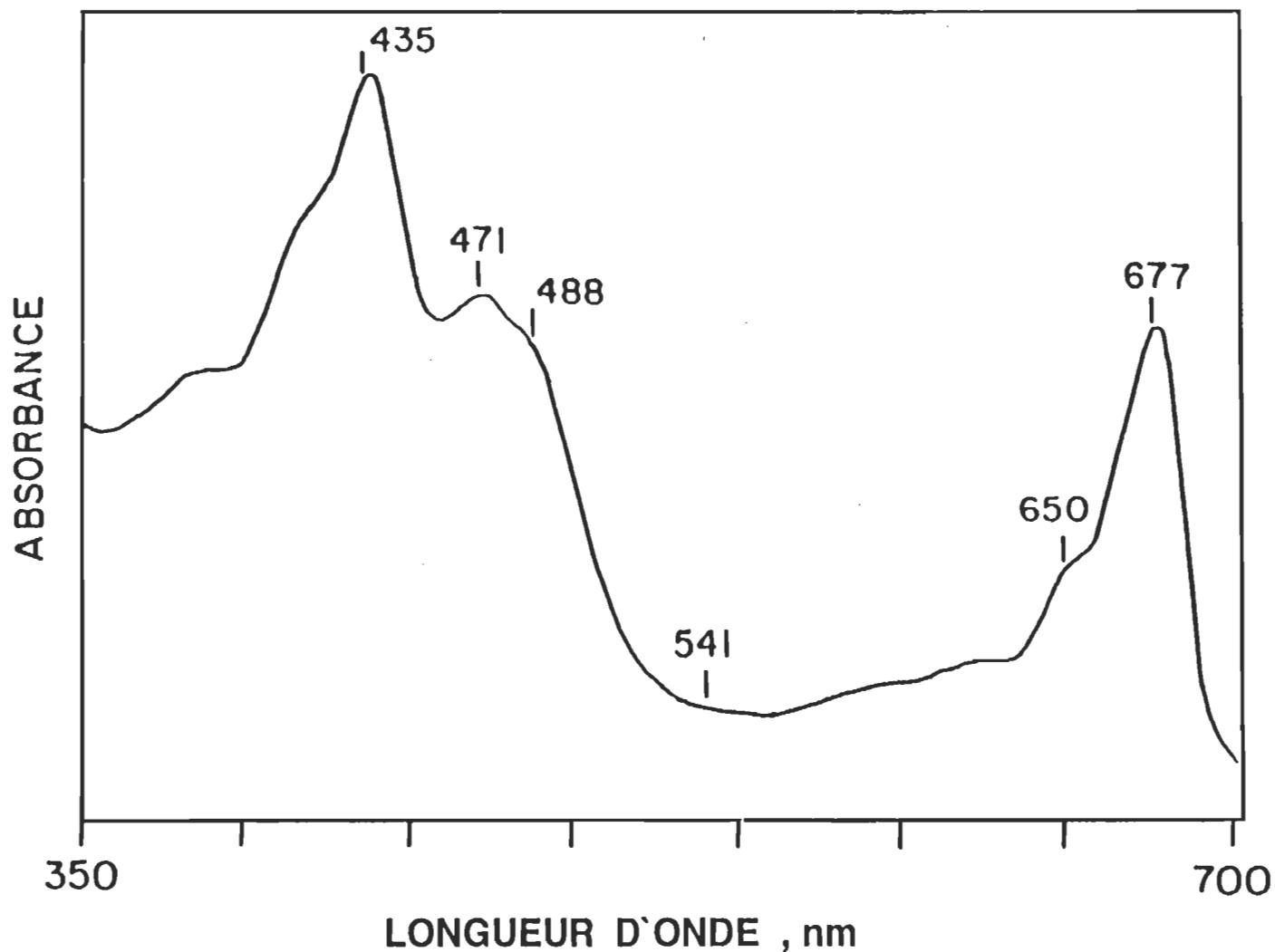


Figure 3.3. Spectre d'absorption des particules de PSII solubilisées dans un tampon contenant 20 mM MES-NaOH (pH 6.0), 0.4 M Sucrose, 15 mM NaCl et 5 mM MgCl₂.

23, 22, 19, et 17 kDa (voir e.g., Ghanotakis et Yocum 1985, Beauregard et Popovic 1988), parmi lesquels ceux de 33, 23 et 17 kDa forment le complexe de dégagement d'oxygène (Homann 1987, Ghanotakis et Yocum 1990). Cette analyse nous prouve que notre préparation de particules de PSII n'est pas contaminée par des polypeptides du photosystème I et par ailleurs, que les polypeptides 47 et 43 kDa ne sont pas indispensables dans l'activité photochimique de dégagement d'oxygène du PSII (Takahashi et coll. 1990).

3.3.2 Effet du phosphatidylglycérol sur l'activité de dégagement d'oxygène des particules de PSII.

Plusieurs travaux suggèrent que le PG est nécessaire pour supporter l'activité du PSII et pour maintenir l'organisation supramoléculaire des complexes Chl-protéine (Rawyler et Siegenthaler 1981, Gounaris et Barber 1985, Huner et coll. 1987, Siegenthaler et coll. 1989). Le traitement des membranes sub-thylacoïdiennes de PSII par la phospholipase A₂ provoque une diminution de près de 60 % du contenu des membranes de PSII en PG, et de 100 % de leur contenu en PCh (Tuquet et coll. 1984, Horváth et coll. 1989). Cette réduction du contenu en phospholipides a pour conséquence une perte de 75 % de l'activité de dégagement d'oxygène au niveau du PSII (Tuquet et coll. 1984). Ce traitement par la phospholipase A₂ ne provoque ni la perte de glycolipides (MGDG,

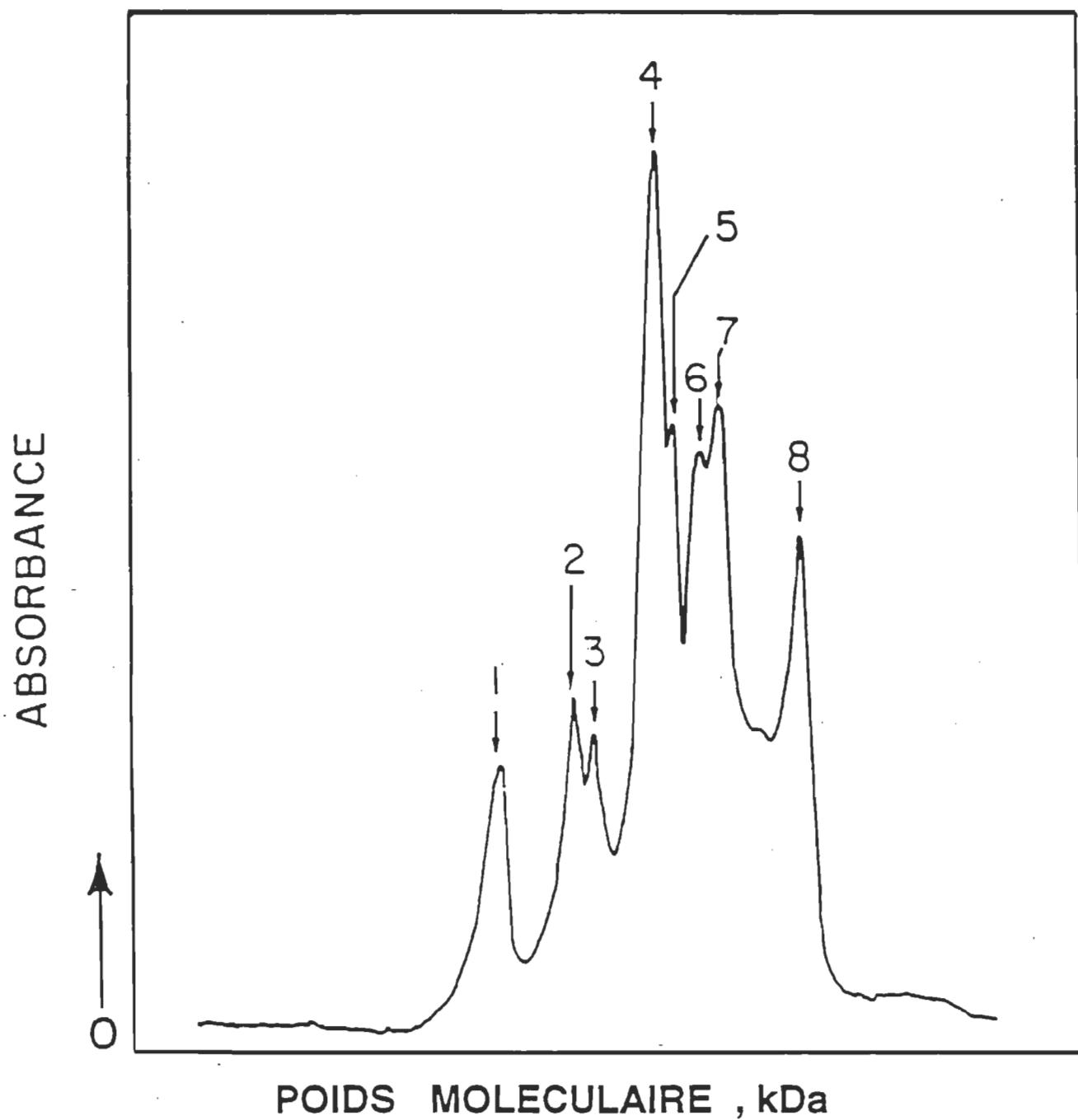


Figure 3.4. Densitogramme d'un gel d'électrophorèse de particules de PSII. Le poids moléculaire des polypeptides exprimé en kDa est de: (1) 33, (2) 30, (3) 26, (4) 24, (5) 23, (6) 22, (7) 19, (8) 17.

DGDG et SQDG), ni la perte de polypeptides surtout ceux du complexe de dégagement d'oxygène, ni celle d'atomes de manganèse. Par contre, la microscopie électronique révèle une structure beaucoup moins nette qui laisse supposer une certaine altération dans l'organisation de la membrane (Tuquet et coll. 1986). Il est important de mentionner que quelles que soient l'ampleur et la durée du traitement enzymatique, il reste toujours un "pool" de 20 à 25 % de PG qui demeure inaccessible à l'enzyme, et l'activité résiduelle du PSII semble être due à ce "pool" intact de PG (Tuquet et coll. 1986, Horváth et coll. 1989). Notons à ce propos que l'inhibition de l'activité de dégagement d'oxygène du PSII, conséquence de la diminution de PG est attribuable aux changements d'orientation moléculaire de la phéophytine (accepteur primaire d'électrons), ainsi qu'à l'altération de la distance qui sépare cette phéophytine de la quinone Q_A (Jordan 1984). Ces travaux sont en nette contradiction avec ceux de Gounaris et coll. (1983) qui avaient démontré que l'addition d'un mélange de lipides anioniques (PG et SQDG) aux membranes de PSII, entraîne une inhibition complète du dégagement d'oxygène. Gounaris et ses collaborateurs attribuent cela à la déstabilisation des interactions moléculaires du PSII provoquée par la présence des lipides chargés négativement. Cette controverse nous pousse à une investigation plus approfondie de l'activité de dégagement d'oxygène des particules de PSII incorporées dans des vésicules constituées

à partir de lipides des thylacoïdes. Dans les paragraphes qui vont suivre, nous examinons les données obtenues avec les vésicules de PG dans des intervalles de pH allant de 3 à 10, de même que l'effet du cycle de congélation-décongélation, méthode courante utilisée pour promouvoir l'incorporation des protéines dans différents types de liposomes (McDonnel et Staehelin 1980, Siegel et coll. 1981, Sprague et coll. 1985). Nous comparerons ensuite les résultats obtenus avec ceux de la phosphatidylcholine qui est un lipide zwitterionique.

a) Dégagement d'oxygène dans le PSII et le complexe PSII-PGV.

Les particules de PSII utilisées dans l'investigation de l'effet du phosphatidylglycérol, ont un taux de dégagement d'oxygène qui varie entre 400 et 600 μ moles $O_2 \cdot mg^{-1} Chl \cdot h^{-1}$. Cette activité est complètement inhibée par le DCMU à une concentration de 100 μ M, et cet effet est également observé sur les complexes PSII-PGV. Notons ici que cette inhibition indique que le site de fixation du DCMU sur les complexes du PSII, situé entre la quinone primaire Q_B et le bassin de plastoquinone (voir Lam et coll. 1983, Carpentier et Nakatani 1985), n'est pas altéré dans notre préparation. D'autre part, cela prouve que dans la complexation du PSII avec les vésicules de PG, ce site reste toujours accessible.

Les particules de PSII sont mélangées, sous faible agita-

tion, avec des vésicules de PG préalablement constituées, pendant 20 minutes, à la température de 277 K. A la fin du temps d'incubation, un aliquot est pris, pour une étude immédiate du dégagement d'oxygène, et un deuxième aliquot va subir un cycle de congélation à 143 K pendant 30 minutes, suivi d'une décongélation à 277 K pendant la même durée. Les particules de PSII sans lipide additionnel vont subir les mêmes traitements et serviront de référence.

La figure 3.5 représente les variations de l'activité de dégagement d'oxygène en fonction du pH. Nous pouvons remarquer que l'activité du PSII augmente de pH 3 à pH 6.5, ensuite décroît progressivement dans la région basique, pour atteindre son niveau minimum autour de pH 10. Ces observations sont en accord avec des résultats publiés dans la littérature, mais dans un intervalle de pH restreint (Critchley 1983, 1985, Ikeuchi et Inoue 1986, Homann 1988a). Cette étude préalable nous permet de comparer les résultats obtenus avec le complexe PSII-PGV dans un milieu à faible ou forte acidité. L'analyse des données nous montre que le PG stimule le dégagement d'oxygène dans les particules de PSII, surtout dans la région acide (voir Fragata et coll. 1990b, Nénonéné et Fragata 1990). Nous pouvons observer aussi que le milieu basique tend à favoriser d'une certaine manière une meilleure production d'oxygène dans le complexe PSII-PGV que dans les particules de PSII non incorporées dans les vésicules lipidiques (voir Figure 3.5 inset).

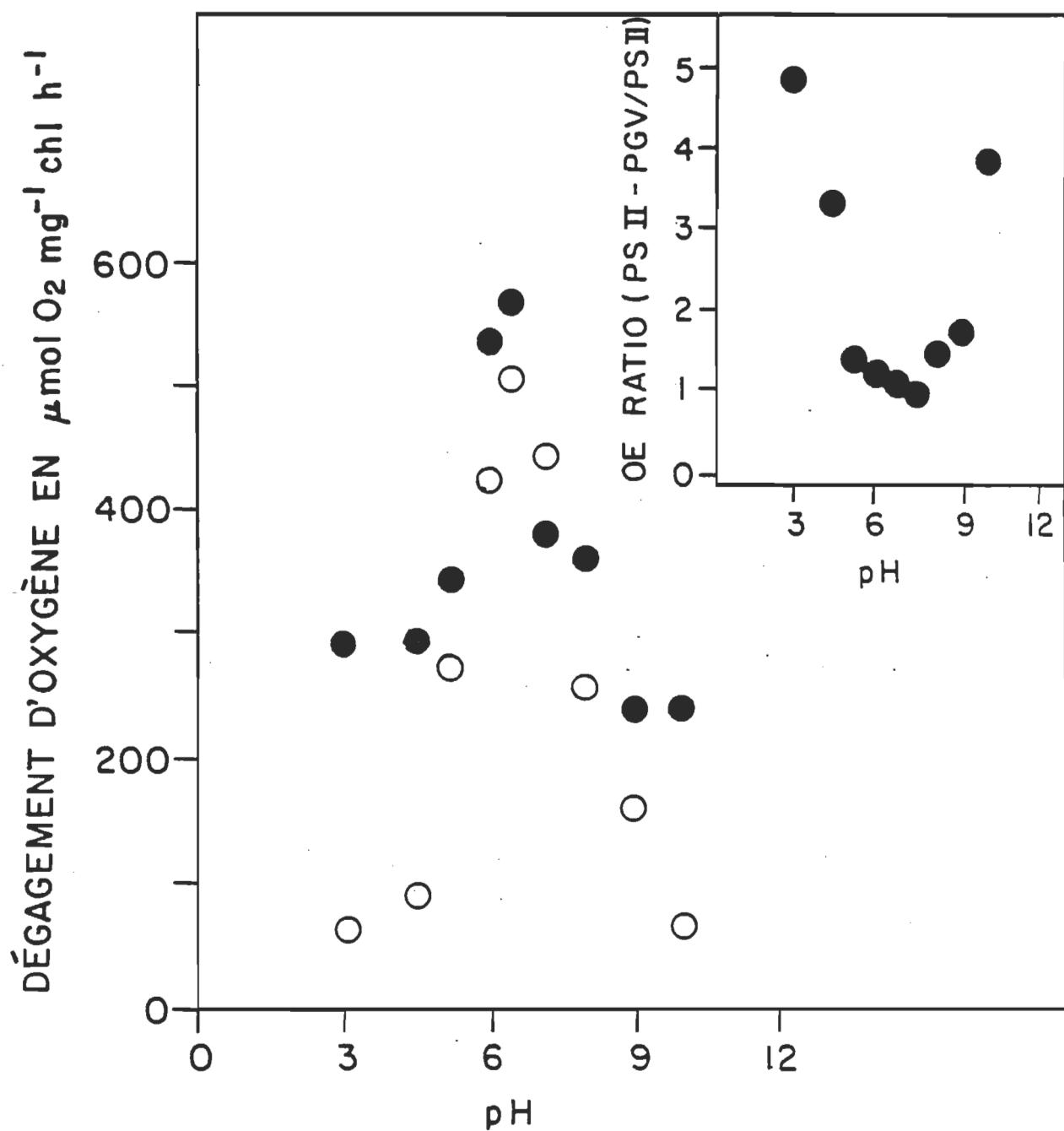


Figure 3.5. Effet du pH sur l'activité de dégagement d'oxygène des particules de PSII (○) et des complexes PSII-PGV (●). En "inset" le rapport de l'activité PSII-PGV / PSII. (O.E.: dégagement d'oxygène).

L'effet combiné du pH et du cycle de congélation-décongélation (étape qui est supposée recréer l'organisation spatiale originale des complexes lipide-protéine, McDonnel et Staehelin 1980) est représenté sur la figure 3.6. Sans aucun doute, la photolyse de l'eau au niveau du PSII sans lipide a diminuée alors que cette activité n'est pas affectée pour des particules de PSII incorporées dans des vésicules de PG. Ce lipide aurait probablement un effet cryoprotecteur sur le PSII (Nénonéné et Fragata 1990).

La diminution de l'activité du PSII dans les régions à forte et à faible taux d'acidité, peut éventuellement être due à la perte des protéines extrinsèques, surtout les polypeptides de 23 et 18 kDa du complexe de dégagement d'oxygène (voir à ce sujet, Kuwabara et Murata 1982, Tuquet et coll. 1984). Pour vérifier si cette hypothèse est valable dans le cas présent et donc si l'effet du pH n'est autre que la conséquence de la perte de peptides, nous avons fait incuber à 277 K, les particules de PSII dans du tampon A de pH différents (4.0, 6.5, 9.0) et à une concentration de Chl de 1 mg/mL. La durée de l'incubation fut de 3 minutes, légèrement plus longue que celle habituellement requise dans la chambre de réaction du moniteur d'oxygène, pour une mesure de routine du dégagement d'oxygène (voir Matériels et Méthodes). Ensuite, les échantillons sont centrifugés à 29000 x g, pendant 5 minutes, à 277 K et le culot est dilué dans du tampon A (pH 6.5). L'électrophorèse de ces particules de

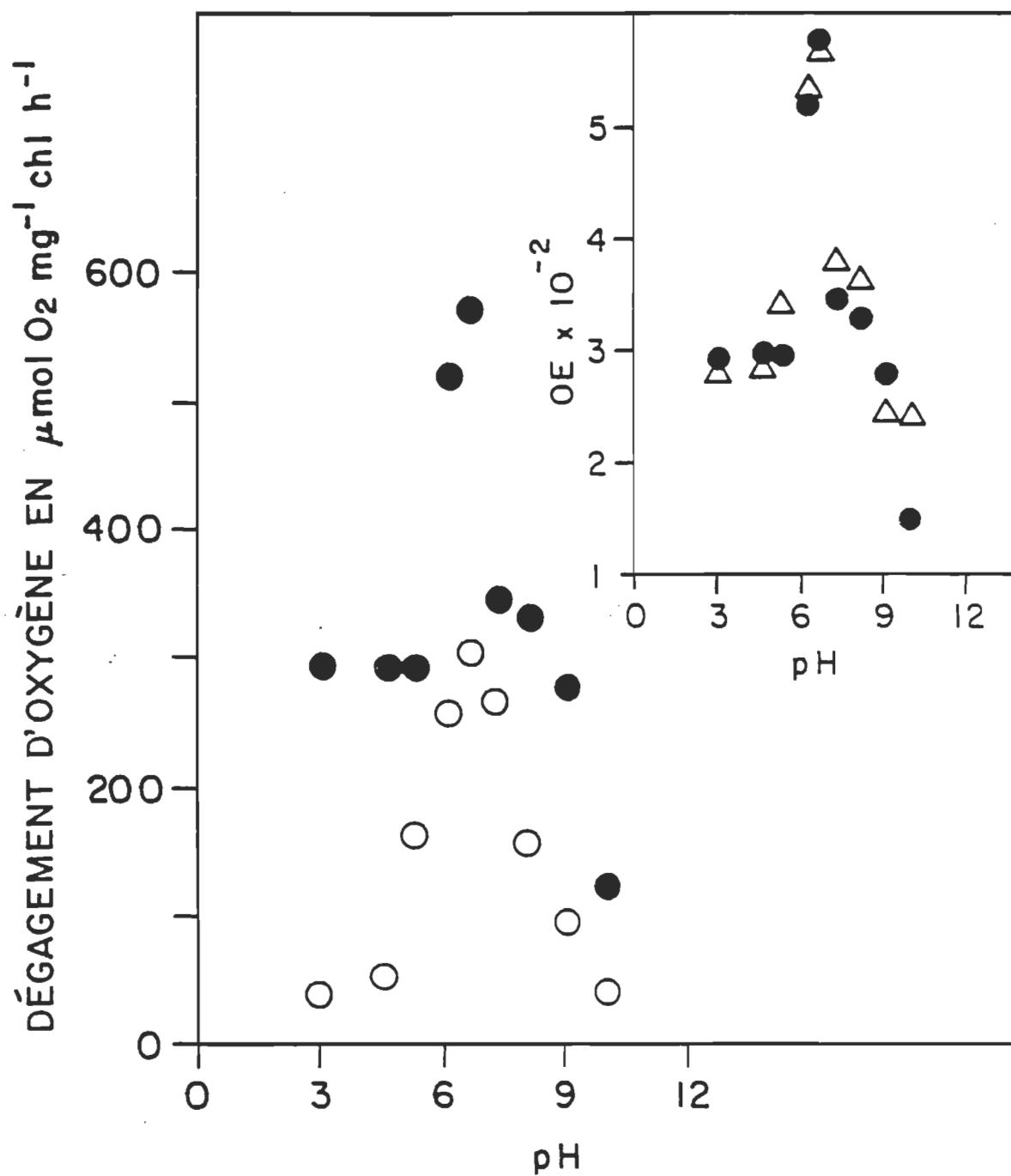


Figure 3.6. Effet de la procédure de congélation/décongélation sur les particules de PSII (○) et des complexes PSII-PGV (●). En "inset" PSII-PGV congelé et décongelé (●) et PSII-PGV non congelé (Δ). (O.E.: dégagement d'oxygène).

Tableau 3.3 Comparaison du taux relatif^a de polypeptides extrinsèques impliqués dans le dégagement d'oxygène des particules de PSII à différent pH (d'après Nénonné et Fragata 1990)

Poids moléculaire en kDa	pH		
	4.0	6.5	9.0
18	0.77	0.55	0.57
23	0.52	0.46	0.42
26 ^b	1.00	1.00	1.00
33	0.30	0.27	0.26

^a La concentration relative des polypeptides est donnée par rapport au peptide de 26kDa qui n'a pas subi de modification en fonction du pH.

^b Le polypeptide de 26 kDa n'est pas impliqué dans le complexe de dégagement d'oxygène. Il sert ici comme standard.

PSII traitées à des pH différents, révèle qu'il n'y a pratiquement pas de perte de peptides. Le tableau 3.3 nous montre la densité optique des polypeptides de 18, 23 et 33 kDa, normalisée par rapport à celle du peptide de 26 kDa. Il nous indiquerait qu'aucun changement structural significatif n'est apparu pendant la durée de l'expérience.

b) Réversibilité de l'effet inhibiteur du pH sur l'activité de dégagement d'oxygène du PSII.

Etant donné que nous n'avons pas observé de perte de peptides au cours du traitement à pH acide et basique dans l'intervalle de temps nécessaire pour notre expérimentation, la question se pose alors de déterminer quelle serait, d'une part la contribution des ions H^+ et OH^- , et, d'autre part, si l'effet du pH serait réversible dans le temps. Pour mieux comprendre et juger ce phénomène, l'expérience suivante fut réalisée: des particules de PSII sont incubées pendant 2 minutes à l'obscurité, dans du tampon A à pH 4.0, 6.5, et 9.0. Ensuite, de l'hydroxyde de sodium ou de l'acide chloridrique sont ajoutés pour ramener respectivement les pH 4.0 et 9.0 à pH 6.5. Les échantillons incubés à pH 6.5, subissent les mêmes traitements avec du tampon A pH 6.5, pour s'assurer que les conditions d'expérimentation sont identiques dans les trois cas différents. Immédiatement après la période d'incubation, l'activité des particules de PSII est mesurée et la

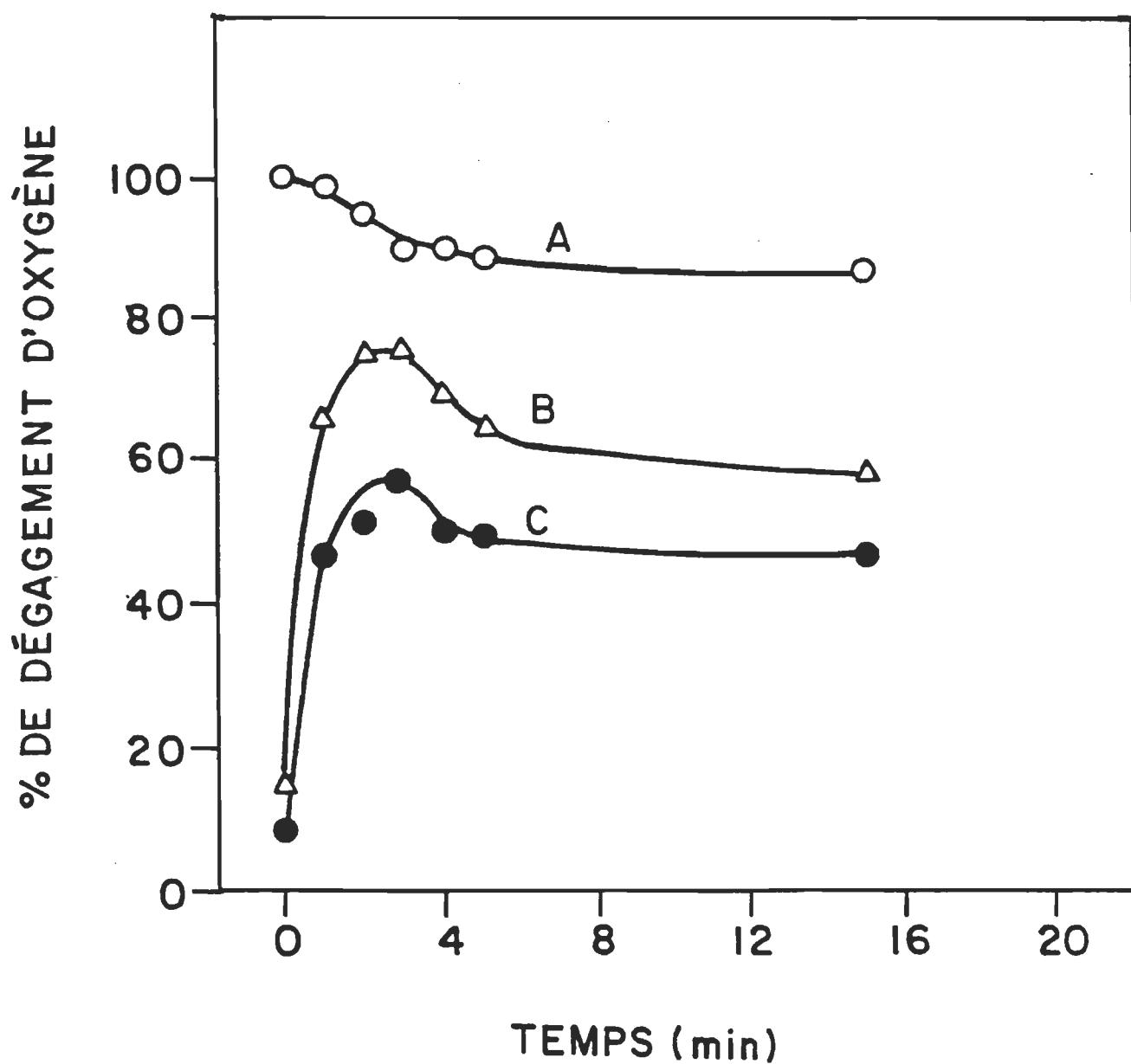


Figure 3.7. Variation de l'activité des particules de PSII en fonction du temps. Le temps d'incubation au pH approprié est de 2 minutes ($t = 0$). Ensuite les mesures de dégagement d'oxygène sont effectuées à pH 6.5 à différentes périodes. A) pH 6.5 (contrôle), B) Incubation à pH 4.0, C) Incubation à pH 9.0.

figure 3.7 nous montre que le PSII qui habituellement exhibe une très faible activité à pH 4.0 et 9.0, recouvre près de 55 à 70 % de son activité photosynthétique lorsque l'on passe de pH 9.0 et 4.0 à pH 6.5 respectivement (Nénonéné et Fragata 1990). Nos résultats montrent que l'effet inhibiteur des pH extrêmes (acide et basique) peut être renversé lorsque l'on ramène le pH du milieu au pH physiologique. Cet effet inhibiteur des pH extrêmes est probablement dû à l'excès d'ions H^+ ou OH^- qui peuvent induire respectivement une compétition avec les ions Cl^- ou Ca^{2+} et provoquer une baisse de l'activité des particules de PSII (voir discussion plus loin).

3.3.3 Effet de la phosphatidylcholine sur l'activité de dégagement d'oxygène du PSII.

Dans les travaux de Melis et Ow (1982), ainsi que Horváth et coll. (1989), on s'aperçoit que la diminution du taux de phospholipides par traitement des membranes de thylacoïdes avec la phospholipase A₂ provoquerait un désempilement des grana. D'autre part, la diminution de la concentration de Mg^{2+} , voire son absence, entraînerait la dissociation du complexe Chla/b LHC du centre réactionnel du PSII_a, avec pour conséquence la baisse de l'activité du PSII. Alors que le PG serait impliqué dans le contrôle du flux d'électrons au niveau du PSII, la PCh jouerait un important rôle dans la régulation de l'association du LHC périphérique avec le

Tableau 3.4 Effet du pH sur l'activité des particules de PSII incorporées dans des vésicules constituées d'un mélange de phospholipides

Composition lipidique (mM)			% Dégagement d'oxygène en fonction du pH ($\mu\text{mole d}'\text{O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{Chl} \cdot \text{h}^{-1}$) ^b		
PG ^a	PCh	mole PG/mole PCh	4.5	6.5	8.0
25.8			38	107	22
19.3	6.35	3	27	102	17
12.9	12.7	1	38	109	47
6.45	19.06	0.33	50	132	-
	25.4		56	143	49

^a PG, phosphatidylglycérol; PCh, phosphatidylcholine.

^b 100% de l'activité du PSII à pH 6.5 et en absence de lipide représente 480 $\mu\text{moles d}'\text{O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{Chl} \cdot \text{h}^{-1}$

centre réactionnel du PSII. Cette dualité de l'effet des phospholipides nous conduit à une investigation de la contribution de la PCh dans le dégagement d'oxygène des complexes du PSII.

Comme dans le cas du phosphatidylglycérol, des vésicules lipidiques sont préformées avec la phosphatidylcholine seule ou un mélange de PCh et PG. Ensuite, des particules de PSII y sont incorporées selon la même technique décrite précédemment. Des essais de dégagement d'oxygène à différents pH sont effectués dans un milieu contenant 20 mM MES-NaOH, 0.4 M sucre, 15 mM NaCl et 5 mM MgCl₂ (Tampon A). Comme l'indique le tableau 3.4 la PCh, lorsqu'elle est utilisée seule, augmente l'activité du PSII de manière beaucoup plus importante que le PG seul. En outre, dans les régions acide et basique, la PCh protège beaucoup mieux les particules de PSII contre l'effet inhibiteur des pH extrêmes (pH 4.5 et 8.0). Lorsque l'on est en présence d'un mélange de PG et PCh, on observe que de forts rapports molaires PG/PCh tendent à faire baisser légèrement le taux de dégagement d'oxygène (voir Fig. 3.8). L'activité de dégagement d'oxygène augmente de nouveau lorsque PG/PCh ≈ 1, pour atteindre son maximum lorsque la PCh est utilisée seule.

3.4 Discussion.

L'inhibition du dégagement d'oxygène dans un milieu alcalin

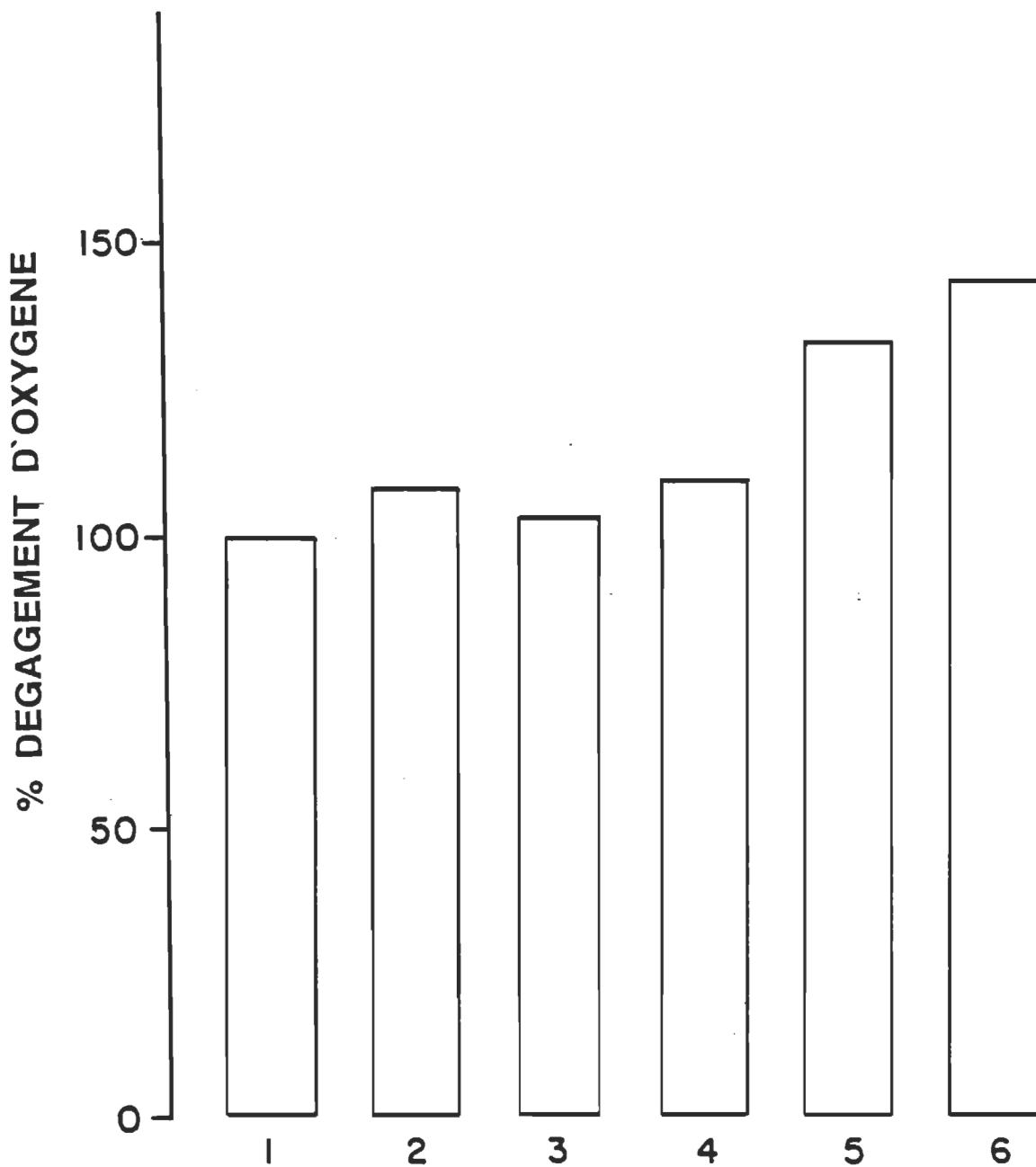


Figure 3.8. Diagramme représentant l'effet des phospholipides sur le dégagement d'oxygène des particules de PSII (1); PSII + PG (25.8 mM) (2); PSII + PG/PCh (25.8 mM/25.8 mM) (3); PSII + PG/PCh (1 mole/mole) (4); PSII + PG/PCh (0.33 mole/mole) (5); PSII + PCh (25.4 mM) (6). Le milieu d'expérimentation contient 20 mM MES-NaOH (pH 6.5), 0.4 M Sucrose, 15 mM NaCl et 5 mM MgCl₂.

a été observée par plusieurs auteurs (voir e.g. Kuwabara et Murata 1982, Tuquet et coll. 1984, Ghanotakis et Yocum 1985, Ghanotakis et coll. 1987). Tuquet et coll. (1984) ont mentionné une réduction de 70 % du dégagement d'oxygène à pH 9.0. Ces auteurs montrent une perte complète du polypeptide de 18 kDa et une diminution du contenu des polypeptides 24 et 32 kDa après un traitement de 15 minutes à pH 9.0, par contre, ce traitement à pH basique ne provoque pas de perte de lipides (Tuquet et coll. 1986).

N'ayant pas de perte de polypeptides dans notre cas présent (voir tableau 3.3), nous postulons que la diminution de l'activité photosynthétique observée, serait due aux changements de conformation partiellement irréversibles des polypeptides ou encore à un réarrangement inadéquat des peptides lorsque ceux-ci sont soumis au traitement acide ou alcalin (voir Fig. 3.7). Dans ce contexte, la diminution observée sous l'effet de l'alcalinité du milieu, entre pH 7.0 et 10.0 dans les complexes PSII-PGV (cf Fig. 3.5) pourrait être expliquée par un réarrangement structural des agrégats lipide-protéine capables de réduire l'effet du pH sur les polypeptides du PSII. Néanmoins, l'analyse des figures 3.5 et 3.6, permet de mettre en évidence que l'action protectrice de PG sur les peptides du PSII ne s'avère pas totalement efficace.

L'effet du pH élevé peut induire une compétition entre les ions OH^- et Cl^- , provoquant ainsi un déplacement de ces ions Cl^- de leur site de fixation au niveau du PSII (voir à ce

sujet, Critchley et coll. 1982, Casey et Sauer 1984, Homann 1985, Damoder et coll. 1986, Wydrzynski et coll. 1990). La déficience des ions chlorures peut ainsi affecter la fonction des polypeptides extrinsèques et par conséquent provoquer la baisse de dégradation de l'eau, étant donnée que ces ions participent directement dans le mécanisme d'acquisition des charges au niveau du complexe catalyseur de l'eau S_0-S_4 (voir, Sandusky et Yocum 1984, Damoder et coll. 1986, Homann 1987).

Dans la région de pH acide (voir Fig. 3.5), la diminution de l'activité du PSII est également observée par Homann (1988a), même sur des préparations de PSII ne comprenant pas les polypeptides de 18 et 23 kDa, montrant ainsi que la forme générale de la courbe est indépendante de la présence ou de l'absence des polypeptides extrinsèques. Nous savons aussi que les polypeptides extrinsèques ont une forte affinité pour les ions Cl^- et que ces ions sont susceptibles de se complexer à des protons qui deviennent plus abondants lorsque le milieu s'acidifie (voir le rôle catalytique et fonctionnel des ions chlorures dans Coleman et Govindjee 1987, Homann 1988b). Ces protons peuvent aussi déplacer les ions calcium de leur site de fixation, et provoquer la baisse de l'activité observée (Preston et Critchley 1985, Shen et coll. 1988, Ono et Inoue 1988, 1989, Lockett et coll. 1990, Yocum 1991). Néanmoins, on y remarque une bonne protection de l'activité du système photosynthétique par le PG.

Quant à l'effet de la PCh sur les particules de PSII, nos

résultats sont en accord avec ceux de Gounaris et coll. (1983) qui notent une stimulation de l'activité de dégagement d'oxygène lorsque les particules de PSII sont complexées avec la PCh. Siegenthaler et coll. (1987b et 1989) montrent que la réduction du contenu des membranes des thylacoïdes en PCh augmente l'ampleur de l'inhibition du flux d'électrons non cyclique. Par contre, Murata et coll. (1990), en utilisant des préparations de membranes de PSII ne contenant pas de PCh (méthode d'extraction similaire à la nôtre), notent une forte activité de dégagement d'oxygène. Nous pouvons préciser à ce point que certains lipides peuvent stimuler l'activité enzymatique beaucoup plus que d'autres et il n'est pas rare qu'un lipide absent dans la composition d'une membrane stimule de façon importante l'activité d'un enzyme qui s'y trouve (voir e.g. Gennis 1989). Ceci nous amène à ne pas exclure la possibilité que l'ajout de lipides exogènes pourrait provoquer des effets biologiques non spécifiques sur l'activité du PSII comme le feraient certains détergents.

Dans l'intervalle de pH étudié (3-10), les molécules de PG restent sous forme dissociée en raison du pKa très faible de ce phospholipide (pKa = 2.9, voir e.g. Watts et coll. 1978). On pourrait supposer que la dissociation du groupement POH de PG en PO^- et H^+ aurait pour conséquence, l'apparition d'interactions électrostatiques aux interfaces lipides-protéines pour moduler l'activité de dégagement d'oxygène dans les membranes de PSII. Néanmoins, l'utilisation de la

PCh qui protège encore mieux les polypeptides du PSII contre l'effet inhibiteur des pH extrêmes, vient minimiser cette hypothèse. Ces lipides se comportent donc comme des effecteurs allostériques pour stabiliser une certaine conformation des polypeptides et optimiser leur activité.

Il est aussi intéressant de mentionner l'importance de l'état de saturation des chaînes d'acides gras. Nos résultats préliminaires avec le dipalmitoylphosphatidylglycérol, ont montré que ce phospholipide saturé provoque une baisse de l'activité du PSII. A ce propos, Horváth et coll. (1987) démontrent que l'inhibition de l'activité du PSII par hydrogénéation est due à l'impossibilité d'interaction entre la quinone Q_A et son site de fixation sur la plastoquinone. Ces auteurs suggèrent que l'état de saturation des doubles liaisons des acides gras des lipides des membranes thylacoïdiennes joueraient un rôle important dans le contrôle de l'association du LHC périphérique avec le PSII_B et qu'un niveau d'insaturation est nécessaire pour maintenir l'efficacité du transfert d'électrons entre Q_A et le "pool" de plastoquinones.

CHAPITRE IV

EFFETS IONIQUES SUR L'ACTIVITE ET LA COMPOSITION PEPTIDIQUE DES MEMBRANES RECONSTITUEES.

4.1 Introduction.

Dans le chapitre précédent, nous avons mentionné l'importance des ions tels le Mn^{2+} , Cl^- et Ca^{2+} dans l'activité du PSII. Lorsque ces ions sont déplacés de leur site de fixation, il s'en suit une baisse de l'activité photosynthétique. D'autres ions peuvent aussi stimuler le dégagement d'oxygène, lorsqu'ils sont ajoutés au milieu réactionnel: c'est le cas des ions sodium et magnésium. Ces ions possèdent une concentration limite au-delà de laquelle un phénomène d'inhibition est observé, en raison de la rupture des liaisons électrostatiques qui peut se produire entre certains polypeptides. Par exemple, le traitement des particules de PSII avec une solution contenant 1 M de NaCl provoque la perte de deux polypeptides extrinsèques (18 et 24 kDa) qui, comme nous l'avons mentionné plus haut, sont directement impliqués dans le phénomène de la dégradation de

l'eau. Cette perte de polypeptiques a pour conséquence la baisse d'environ 50 % de l'activité de dégagement d'oxygène (voir, Ghanotakis et coll. 1985, Miyao et Murata 1983, 1985). La réactivation du système requiert la présence d'ions divalents. L'effet du Ca^{2+} est plus important que celui du Mg^{2+} bien que ces deux cations, à des concentrations comprises entre 0 et 100 mM, stimulent de façon similaire les particules de PSII natif (voir Fig. 4.2).

Dans l'effet des lipides des thylacoïdes sur l'activité du PSII nous avons montré aussi que le PG stimule le dégagement d'oxygène dans les particules de PSII. Cette augmentation d'activité est fonction du temps et strictement liée au rapport lipide/PSII, à la concentration des ions en solution et à l'état d'agrégation des vésicules lipidiques (voir Fragata et coll. 1991).

4.2 Effets des cations mono- et divalents sur l'activité du PSII.

La modification de l'activité de dégagement d'oxygène est étudiée au niveau des particules de PSII, par variation de la force ionique du milieu. Notons que le pH de la solution tampon est ajusté avec du NaOH, par conséquent, la concentration de départ des ions Na^+ dans le milieu est de 15 mM. L'effet de NaCl sur la dégradation de l'eau est ainsi mesuré à partir de cette valeur. Cette pratique est adoptée afin

d'éviter tout changement qui aurait pu intervenir dans la composition chimique du tampon utilisé, si nous employions une autre substance pour titrer le pH. Comme nous l'indique la figure 4.1, le dégagement d'oxygène par le PSII croît avec la concentration de NaCl pour atteindre un maximum autour de 25 et 35 mM (voir e.g., Fragata et coll. 1990b), puis décroît progressivement pour retrouver son niveau original de 100 % lorsque la concentration atteint 100 mM (cf fig.4.1 inset). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Critchley (1983), Andersson et coll. (1984) et Waggoner et coll. (1989). Dans les intervalles de forte concentration de NaCl, l'activité décroît jusqu'à 50 ou 40 % lorsque l'on se trouve en présence de 1 M de NaCl. Cette concentration ionique est certainement celle à partir de laquelle on a une libération partielle ou totale des polypeptides 18 et 24 kDa du complexe de PSII (voir Kuwabara et Murata 1983, Miyao et Murata 1983, Ghanotakis et coll. 1984b).

De la même façon, nous avons étudié l'effet de CaCl₂ sur la dégradation de l'eau, en maintenant une concentration initiale de Na⁺ à 15 mM. CaCl₂ provoque pratiquement le même phénomène, atteignant un maximum à une concentration de sel de 100 mM, puis diminuant progressivement pour arriver au niveau initial entre 200 et 250 mM de CaCl₂. Mais contrairement au NaCl, l'inhibition de l'activité de dégagement d'oxygène par le CaCl₂ est beaucoup plus prononcée et atteint 80 % par rapport à l'activité originale lorsque la concen-

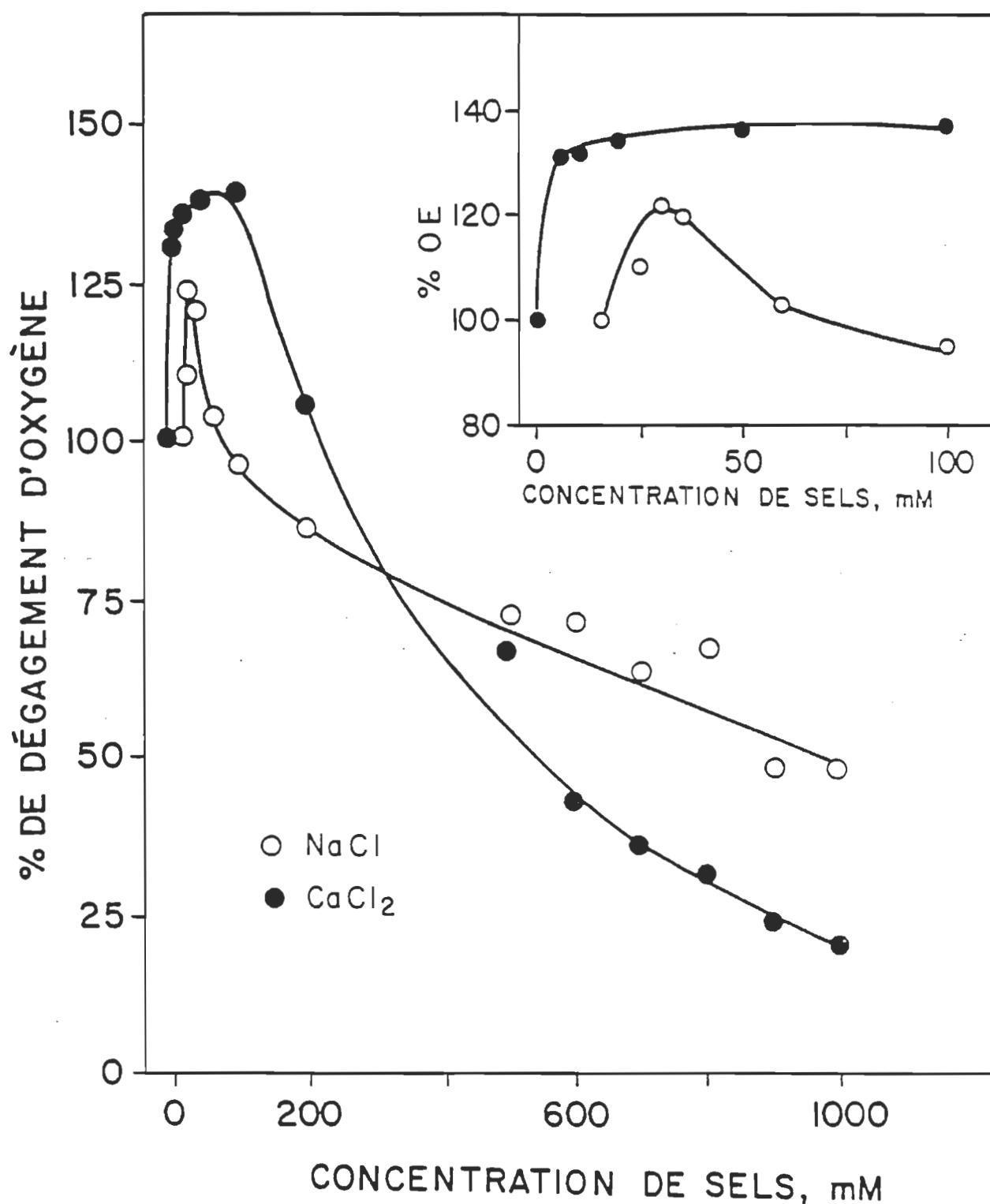


Figure 4.1. Effet de différentes concentrations de sels sur l'activité de dégagement d'oxygène des particules de PSII. (O.E.: dégagement d'oxygène).

tration de sel s'élève à 1 M (cf fig.4.1). Ceci serait la conséquence d'une perte partielle du polypeptide de 33 kDa, le plus important dans la dégradation de l'eau (Ono et Inoue 1983, Kuwabara et coll. 1986).

Finalement pour confirmer l'effet des cations sur l'activité photosynthétique, nous avons étudié les modifications apportées par le $MgCl_2$ sur le PSII natif, dans des conditions similaires à celle du $CaCl_2$. La figure 4.2 nous montre qu'il n'existe pas de différence significative entre le $MgCl_2$ et le $CaCl_2$ dans l'intervalle de concentration de sels étudié (0-30 mM). Nous pouvons également conclure que l'augmentation de l'activité de dégagement d'oxygène observée entre 0 et 30 mM serait probablement due en majeure partie aux cations divalents qu'aux ions Cl^- , puisque nous avons noté que 0.1 mM de $LaCl_3$ inhibe totalement l'activité du PSII (voir figure 4.2 inset).

4.3 Action combinée de PG et de $MgCl_2$ sur l'activité photosynthétique.

La dégradation de l'eau dans les membranes de PSII de l'orge se trouve modifiée lorsque ces particules sont incorporées dans des vésicules lipidiques constituées de PG. Cette modification est strictement liée au rapport molaire entre le lipide et les polypeptides que nous dosons ici par leur taux de chlorophylle (voir Matériels et Méthodes). De

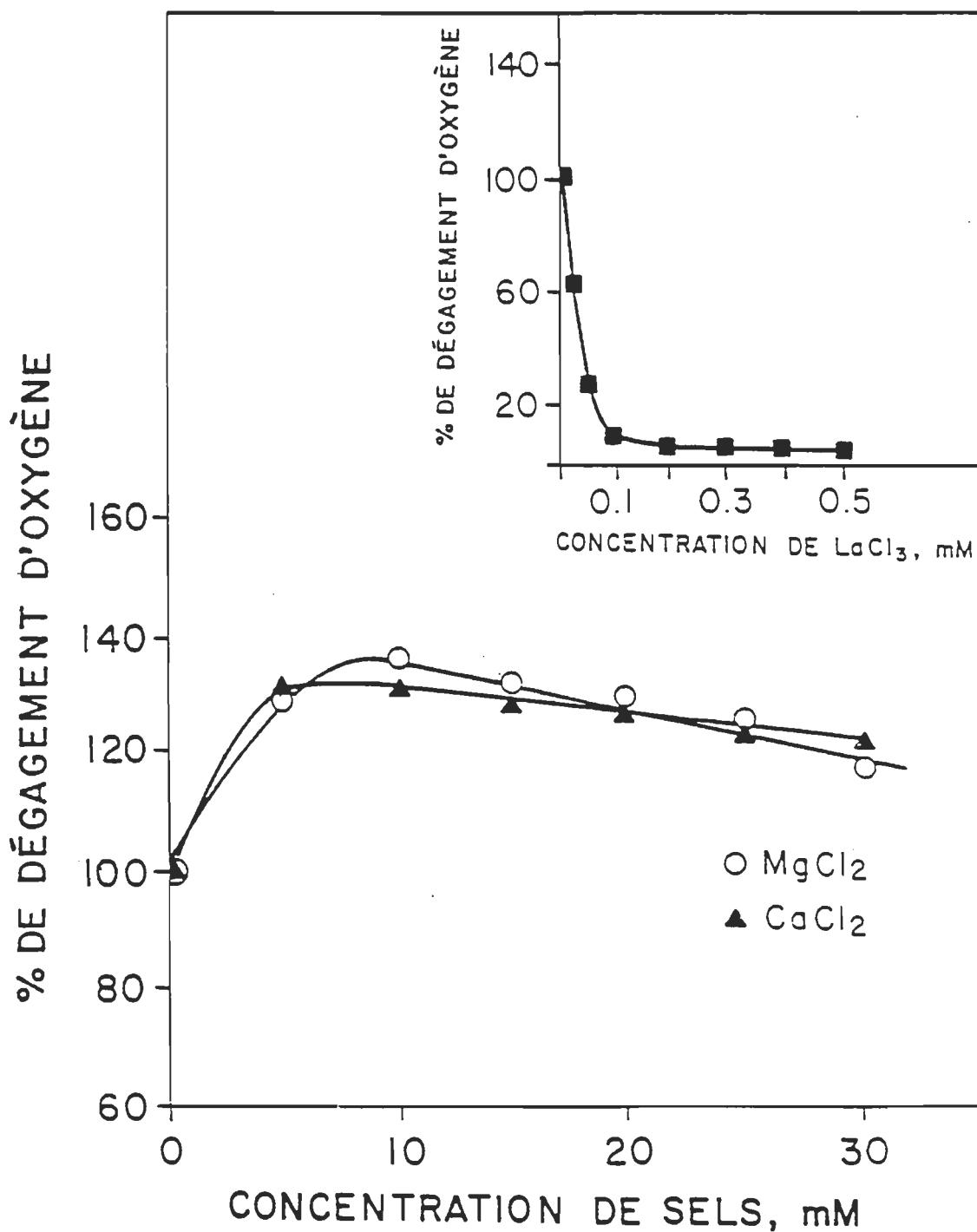


Figure 4.2. Comparaison entre les effets des cations divalents (Mg^{2+} et Ca^{2+}) et trivalents (La^{3+}) sur l'activité des membranes de PSII.

plus, le maximum de dégagement d'oxygène est observé dans les complexes PSII-PGV lorsque la concentration de $MgCl_2$ dans le milieu d'incubation est de 5 mM, valeur seuil à partir de laquelle on a une agrégation des membranes reconstituées.

4.3.1 Variation de l'activité du complexe PSII-PGV en fonction du temps.

Les échantillons de PSII sont incubés avec des vésicules de PG pendant 20 minutes à 273 K (voir Matériels et Méthodes) et la fin de cette période d'incubation est considérée comme temps $t=0$. Ensuite, les mesures de dégagement d'oxygène sont effectuées après une minute d'incubation dans le moniteur d'oxygène à 298 K (température à laquelle s'effectue les mesures de l'activité). La figure 4.3 montre que le dégagement d'oxygène dans les complexes PSII-PGV est très élevé juste après reconstitution et décroît avec le temps. Cette décroissance de l'activité en fonction du temps est aussi valable pour les particules de PSII non incorporées dans des vésicules lipidiques (voir Fig. 3.7). La baisse de l'activité est plus rapide dans les complexes de PSII-PGV ne contenant pas de $MgCl_2$. On remarque que les échantillons contenant 10 mM de $MgCl_2$ exhibe une activité qui atteint 120 à 140 % de celle de la préparation contrôle. Après 150 minutes d'incubation, alors que le PSII-PGV sans sel n'exhibe que 20 % de l'activité initiale, celui contenant 10 ou 15 mM de sel

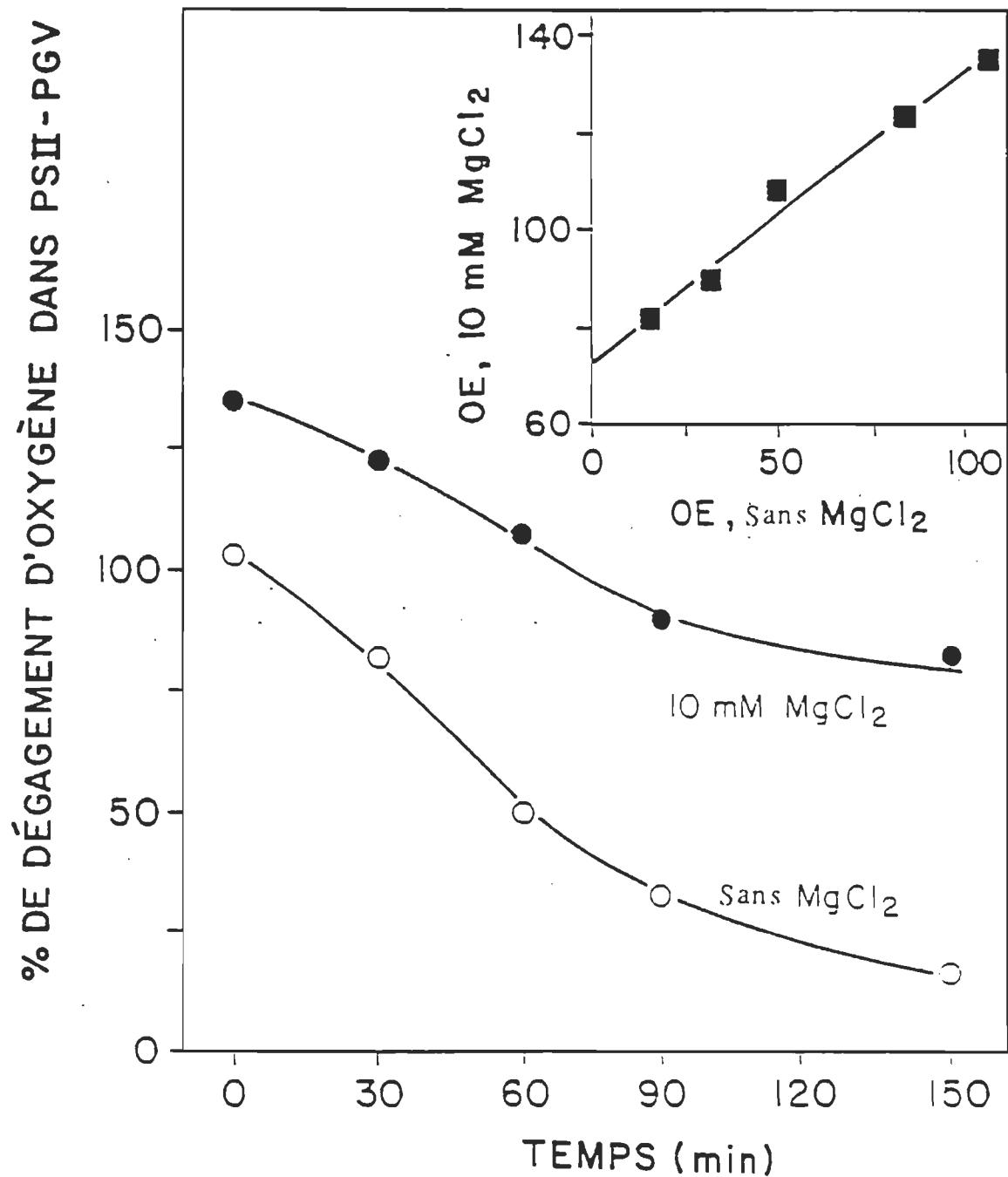


Figure 4.3. Décroissance de l'activité des complexes PSII-PGV en fonction du temps d'incubation: effet du $MgCl_2$ (O.E.: dégagement d'oxygène).

conserve 82 ou 90 % de son activité. La figure 4.3 inset, prouve l'existence d'une corrélation linéaire entre les préparations avec et sans $MgCl_2$, (Fragata et coll. 1991). Cette question sera discutée dans le paragraphe 4.6.1.

4.3.2 Variation de l'activité de dégagement d'oxygène en fonction du rapport PG/PSII.

La figure 4.4 montre qu'il existe une stimulation de l'activité photosynthétique pour de faible rapport PG/PSII, alors que cette activité diminue lorsque la quantité de lipide augmente.

En absence de $MgCl_2$, on observe une légère stimulation du dégagement d'oxygène lorsque le rapport PG/Chl augmente de 1.15 à 5.76 moles de PG/mole de Chl, c'est-à-dire, lorsque $Ln(PG/Chl)$ varie de 0.14 à 1.75. Une éventuelle augmentation du rapport PG/Chl donne lieu à une rapide décroissance de l'activité. Par exemple, lorsque le rapport PG/Chl est de 288, c'est à dire, $Ln(PG/Chl) \approx 5.7$, la baisse d'activité atteint 78 %. Cette diminution peut être exprimée sous la forme $Y = -0.246X + 1.662$, où Y représente le dégagement d'oxygène, et X le logarithme népérien (Ln) du rapport PG/Chl. Cette expression est obtenue par la droite des moindres carrés avec un coefficient de corrélation de 0.986.

En présence de 10 mM $MgCl_2$ dans le milieu d'incubation, deux phénomènes majeurs se dégagent. On observe d'abord une sti-

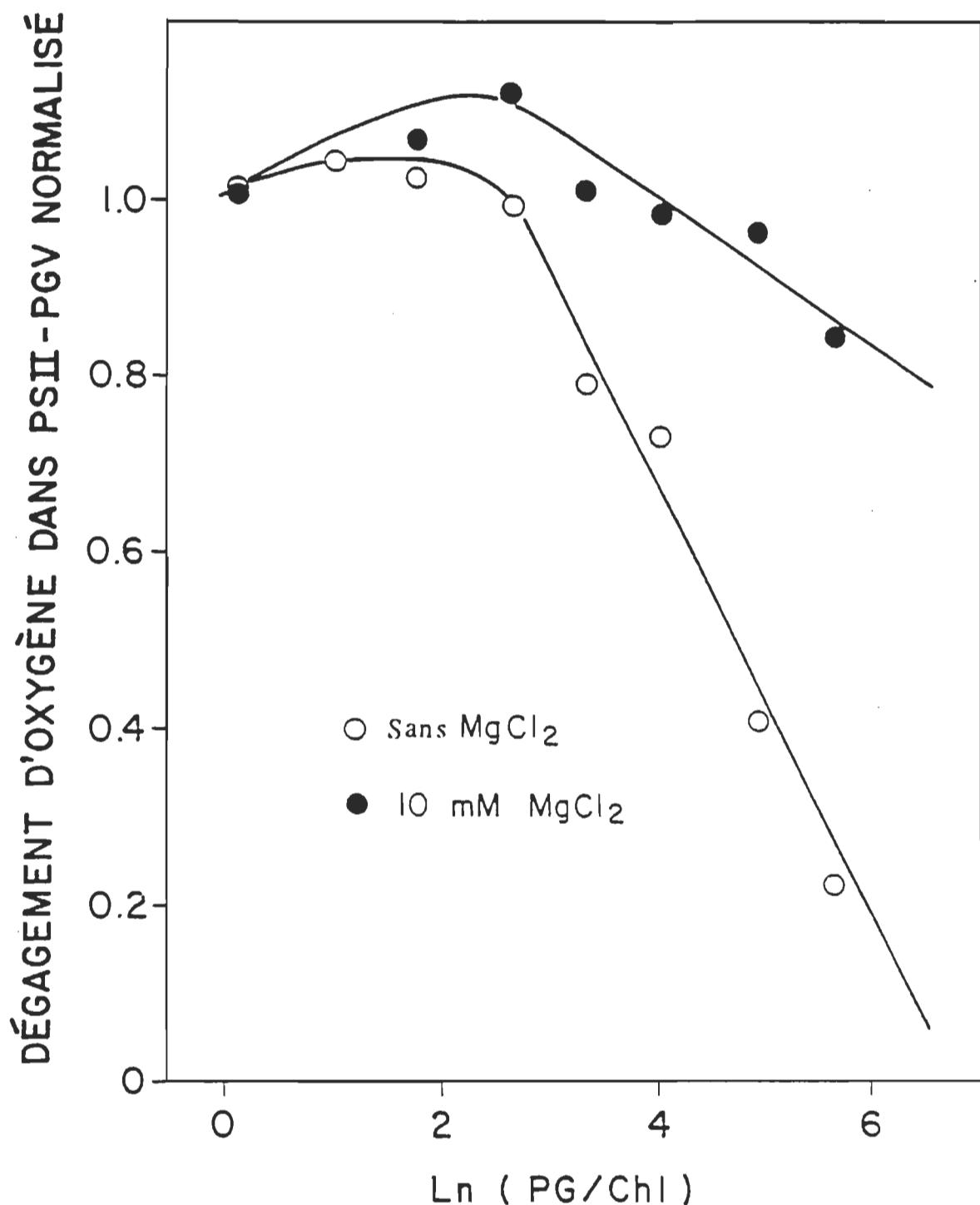


Figure 4.4. Dégagement d'oxygène des particules de PSII incorporées dans des vésicules de phosphatidylglycérol: effet du rapport lipide/protéine (en mole de PG/mole de Chl).

mulation beaucoup plus importante du dégagement d'oxygène, avec un point maximum autour de 14.5 moles de PG/mole de Chl, c'est-à-dire $\text{Ln}(\text{PG/Chl}) \approx 2.7$. Ensuite, pour de forte teneur en PG dans le complexe PSII-PGV, l'activité décroît de façon logarithmique comme précédemment, s'exprimant également sous la forme $Y = -0.079X + 1.312$ avec un coefficient de corrélation de 0.951, mais cette fois-ci, la décroissance est beaucoup plus atténuée, de l'ordre de 14 % (voir Fragata et coll. 1991).

Ce phénomène que nous venons de décrire est également observé dans des échantillons ayant le même rapport PG/Chl, mais avec des concentrations différentes de PG et de Chl afin d'éviter tout déplacement d'équilibre en fonction de la concentration, dans les interactions lipide-protéine.

4.4 Relation entre l'état d'agrégation des membranes reconstituées et le dégagement d'oxygène dans le complexe PSII-PGV.

Des études antérieures ont montré (voir e.g., Ohki et coll. 1982, Webb et coll. 1988, Eklund et coll. 1991) que l'agrégation des membranes constituées de lipides anioniques tels le PG, est promue par l'addition de cations divalents au milieu d'incubation. Le seuil de concentration ou encore la concentration critique (C_c) est spécifique pour chaque espèce ionique. A la suite des résultats expérimentaux obtenus pour le

complexe PSII-PGV, nous nous sommes posé la question de savoir si la concentration de $MgCl_2$ utilisée ici ne provoque pas des changements similaires dans l'activité de dégagement d'oxygène et dans la turbidité du milieu d'incubation (méthode utilisée pour mesurer l'état d'agrégation de la préparation). Dans ce contexte, des échantillons de PGV, PSII et PSII-PGV sont incubés avec des concentrations de $MgCl_2$, variant de 0 à 40 mM, intervalle ionique dans lequel apparaît le phénomène d'agrégation induite par le $MgCl_2$, et la turbidité du milieu est suivie dans un spectrophotomètre.

Nous remarquons sur la figure 4.5 que le $MgCl_2$ provoque, pour de faibles concentrations, une lente augmentation de la turbidité des solutions de PGV et PSII-PGV, suivie d'une croissance exponentielle avec une Cc de $MgCl_2$ comprise entre 5 et 6 mM. La courbe atteint son maximum pour des concentrations supérieures à 10 mM. Dans un second temps, la variation d'absorbance des particules de PSII est analysée afin de déterminer leur contribution dans le phénomène d'agrégation. Comme l'indique la figure 4.5, l'absorbance des préparations de PSII n'est pas affectée de façon significative par l'augmentation de la concentration de $MgCl_2$. Ce résultat prouve que les peptides impliqués dans l'emplacement des thylacoïdes (voir, e.g., Barber et coll. 1980, Staehelin 1986) ne sont pas présents ou du moins pas sous leur forme active, dans la préparation de PSII utilisée dans nos expériences (voir, e.g., Allen 1992).

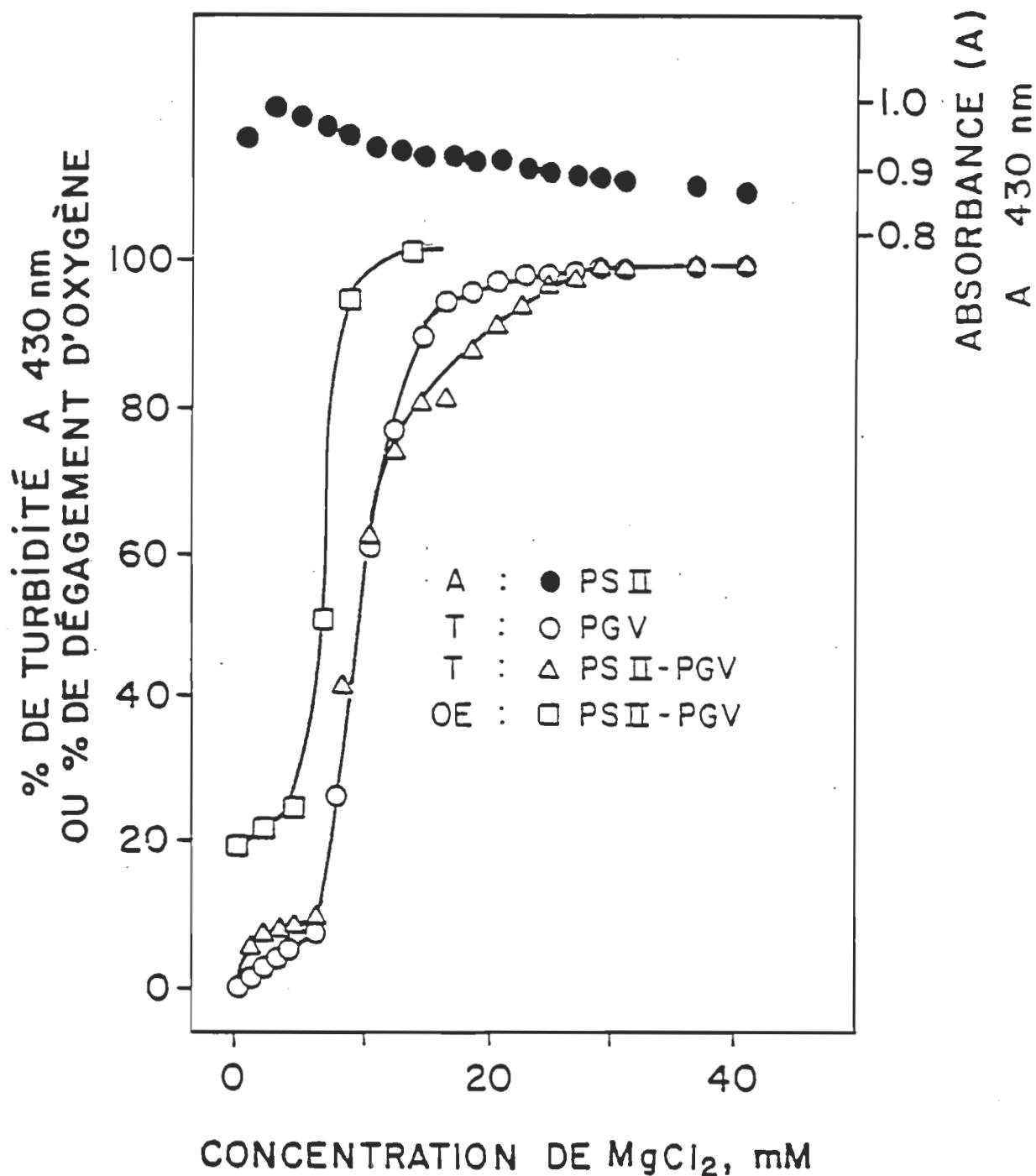


Figure 4.5. Effet de $MgCl_2$ sur la turbidité (T) des vésicules de PG, des membranes de PSII et des complexes PSII-PGV. Parallélisme entre la turbidité et l'activité de dégagement d'oxygène (OE) dans les particules de PSII incorporées dans les vésicules de PG.

Enfin, la figure 4.5 montre que le dégagement d'oxygène dans le complexe PSII-PGV (288 moles de PG/mole de Chl, cf. Fig. 4.4) varie avec la concentration de MgCl₂ dans le même ordre que la turbidité de PGV et PSII-PGV, avec une Cc de MgCl₂ d'environ 4 à 5 mM. Ceci reflète l'étroite relation entre le dégagement d'oxygène et l'état d'agrégation ou d'adhésion des membranes. Le léger décalage de la courbe d'activité du complexe PSII-PGV et de celles de la variation de turbidité des solutions de PGV et PSII-PGV, est un indice de la différence de sensibilité pendant l'agrégation du système.

4.5 Importance du polypeptide de 33 kDa dans le complexe de dégagement d'oxygène et dans l'activité du PSII.

Nous venons de voir que l'activité photosynthétique dépend de la concentration des ions dans le milieu, de la quantité de lipide utilisée, du niveau de saturation des chaînes d'acides gras et surtout de la présence des polypeptides du complexe de dégagement d'oxygène. Bien que certains auteurs tentent de démontrer actuellement que les polypeptides de 18 et 24 kDa seraient liés eux aussi à la membrane des thylacoïdes (voir Hansson et Wydrzynski 1990), le concept qui régit jusqu'alors la structure du système photosynthétique estime que le PSII est en majeure partie localisé dans la région granaire des thylacoïdes, et que le complexe de dégagement

d'oxygène au niveau du PSII se trouve bel et bien sur la face luménale de la membrane thylacoïdale (voir Murata et Miyao 1989, Anderson and Andersson 1988) mais seul le polypeptide de 33 kDa se trouve enroulé en partie dans la matrice lipidique.

4.5.1 Désintégration partielle du complexe de dégagement d'oxygène par action de forces ioniques élevées.

Les particules de PSII préalablement préparées (voir Matériels et Méthodes), sont décongelées pendant 15 minutes et incubées dans un tampon constitué de 20 mM MES-NaOH (pH 6.5), 0.4 M sucrose, et 15 mM NaCl, que nous désignerons comme tampon B, et centrifugées pendant 35 minutes à 277 K, à une vitesse de 29000 x g. Les particules de PSII ayant perdu partiellement leurs polypeptides 18 et 24 kDa sont préparées par incubation du culot précédemment obtenu dans du tampon B contenant du NaCl en excès, de façon à avoir d'une part, une concentration finale de NaCl de 1 M, et d'autre part, une concentration de Chl de 1 mg/mL (voir à ce sujet, Eaton-Rye et Murata 1989). Nous avons choisi ce sel puisque son effet est moins drastique que celui du CaCl₂ ou encore du MgCl₂ (voir figure 4.6). Après 30 minutes d'incubation à 273 K à l'obscurité, la suspension de membranes est centrifugée à 29000 x g pendant 35 minutes à 277 K. Le culot résultant est de nouveau incubé dans 10 mL de tampon B, pendant 3

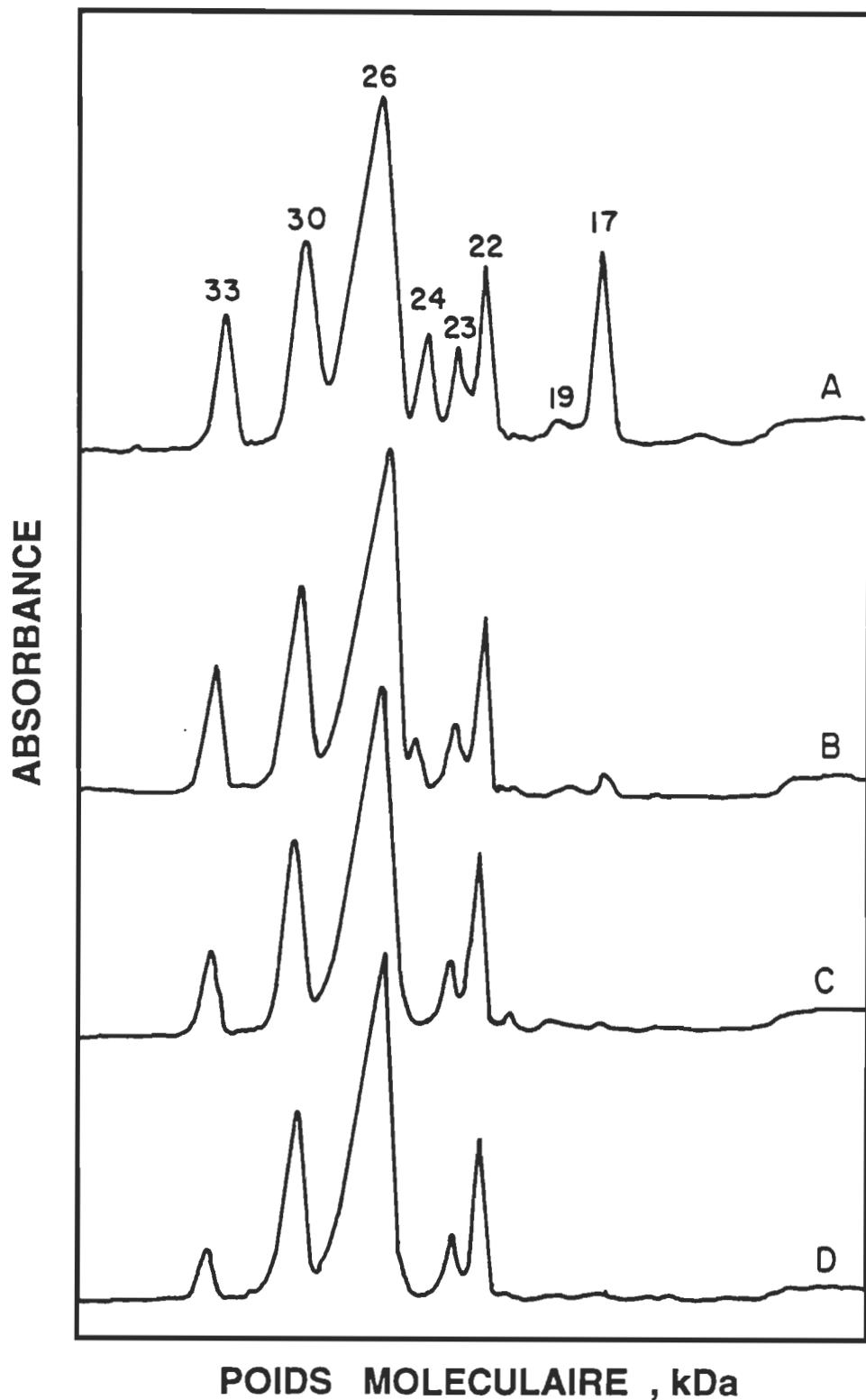


Figure 4.6. Densitogramme électrophorétique des particules de PSII (A) traitées avec 1 M NaCl (B), 1 M MgCl₂ (C) et 1 M CaCl₂ (D). Les valeurs portées sur les pics représentent le poids moléculaire des polypeptides.

minutes et recentrifugé de nouveau. Cette procédure est répétée une seconde fois, afin de ramener la concentration de NaCl à 15 mM. D'autres membranes de PSII subissent les mêmes traitements avec du tampon B uniquement et serviront de référence. Le culot final est suspendu dans du tampon B, à une concentration de Chl de 1 mg/mL.

La composition polypeptidique du PSII et du PSII traité est déterminée par électrophorèse sur SDS PAGE et révèle, comme l'indique la figure 4.6, pour le PSII-1 M NaCl, une perte complète de 18 kDa et partielle de 24 kDa, mais par contre le polypeptide de 33 kDa reste intact. Quant aux PSII-1 M MgCl₂ et PSII-1 M CaCl₂, on observe en plus d'une perte complète des polypeptides de 18 et 24 kDa, une baisse de l'intensité du polypeptide de 33 kDa.

4.5.2 Recouvrement de l'activité du PSII dépourvu des polypeptides 24 et 18 kDa: effet du phosphatidyl-glycérol.

La figure 4.7 montre l'effet de CaCl₂ sur les particules de PSII traitées avec 1 M NaCl. Nous pouvons remarquer que lorsque les membranes de PSII ont perdu leurs polypeptides extrinsèques (24 et 18 kDa), le taux de dégagement d'oxygène est réduit à 40 % de celui des particules intactes. Mais, malgré la perte de ces polypeptides, la presque totalité de l'activité initiale du PSII intact est récupérée pour une

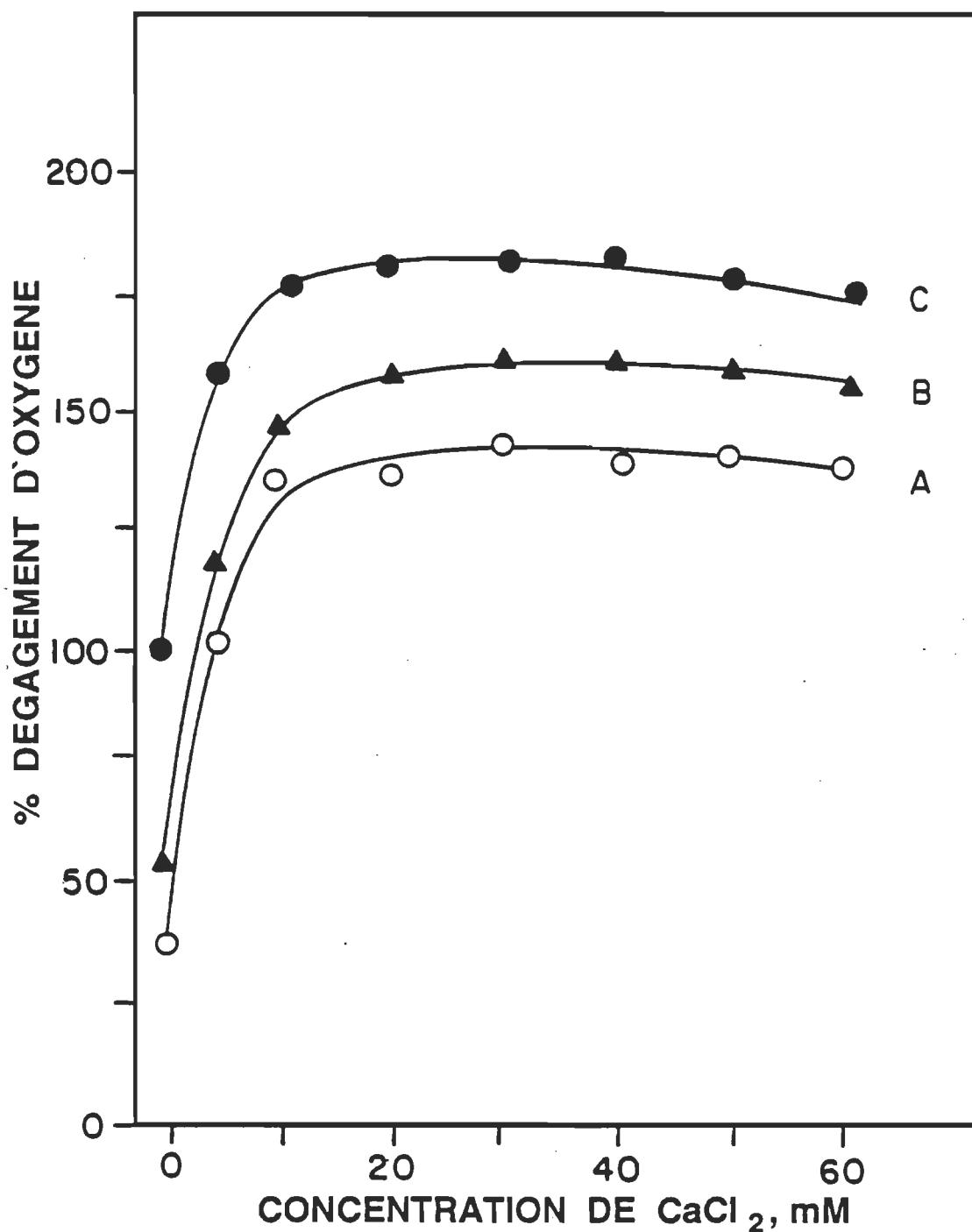


Figure 4.7. Effet du CaCl_2 sur l'activité des particules de PSII dépourvues des polypeptides de 24 et 18 kDa c'est-à-dire traitées avec 1 M de NaCl (A). Effet combiné de 5 mM MgCl_2 (B) et de 5 mM MgCl_2 + PGV (C).

concentration de CaCl_2 de 5 mM et ce regain d'activité atteint un plateau pour 10 mM de calcium (Fig. 4.7 A). L'addition supplémentaire de 5 mM de MgCl_2 au milieu réactionnel permet d'augmenter le taux de dégagement d'oxygène (Fig. 4.7 B). La complexation des vésicules de PG avec ces particules de PSII dépourvues des peptides 24 et 18 kDa, améliore l'activité de dégradation de l'eau. Le recouvrement de cette activité est presque total seulement avec 5 mM de MgCl_2 et en absence de CaCl_2 (Fig. 4.7 C). L'augmentation du dégagement d'oxygène atteint son maximum pour une concentration de chlorure de calcium de 10 mM. Ces résultats viennent appuyer ceux de Ghanotakis et coll. (1985) qui démontrèrent que les polypeptides de 24 et 18 kDa ne participeraient pas directement au mécanisme de dégradation de l'eau, ainsi que ceux de Andersson et coll. (1984), Ghanotakis et coll. (1984a et 1984b), Miyao et Murata (1985) qui prouvèrent que les polypeptides de 24 et 18 kDa seraient des régulateurs qui augmenteraient l'affinité du site d'oxydation de l'eau aux ions chlorures, et enfin que ces polypeptides extrinsèques pouvaient être remplacés par des ions chlorures et calcium (voir Ghanotakis et coll. 1984a, Miyao et Murata 1984, 1985). L'effet des cations divalents serait localisé du côté oxydant du PSII pour faciliter la dégradation de l'eau et le transfert d'électrons. Une conclusion majeure qui se dégage de nos résultats serait le rôle du polypeptide de 33 kDa qui est probablement le seul enzyme capable de dégrader la molécule

d'eau et d'initier le transfert d'électrons depuis le centre réactionnel P680 jusqu'à l'accepteur d'électrons artificiel et liposoluble qu'est le DCBQ. A propos du rôle du PG, une explication possible serait l'enroulement du polypeptide de 33 kDa dans un environnement phospholipidique qui favoriserait son activité enzymatique. Nous pouvons donc imaginer que le PG, en combinaison avec le MgCl₂ et le CaCl₂, comme cofacteurs complémentaires, peut se substituer aux polypeptides 24 et 18 kDa pour stimuler le dégagement d'oxygène dans les membranes de PSII.

4.6 Discussion.

4.6.1 Rôle relatif du rapport PG/PSII et du MgCl₂, dans le ralentissement de la décroissance de l'activité du complexe PSII-PGV.

Nous remarquerons que l'effet de sels mentionné ci-dessus résulte principalement des interactions de MgCl₂ avec le complexe PSII-PGV, et que l'effet direct de MgCl₂ sur les polypeptides du PSII serait presque négligeable. Les éléments de la figure 4.8 viennent appuyer cette remarque. Cette figure représente deux courbes expérimentales (A et B) et une courbe théorique (C) :

La courbe A représente le dégagement d'oxygène des particules de PSII incubées avec différentes concentrations

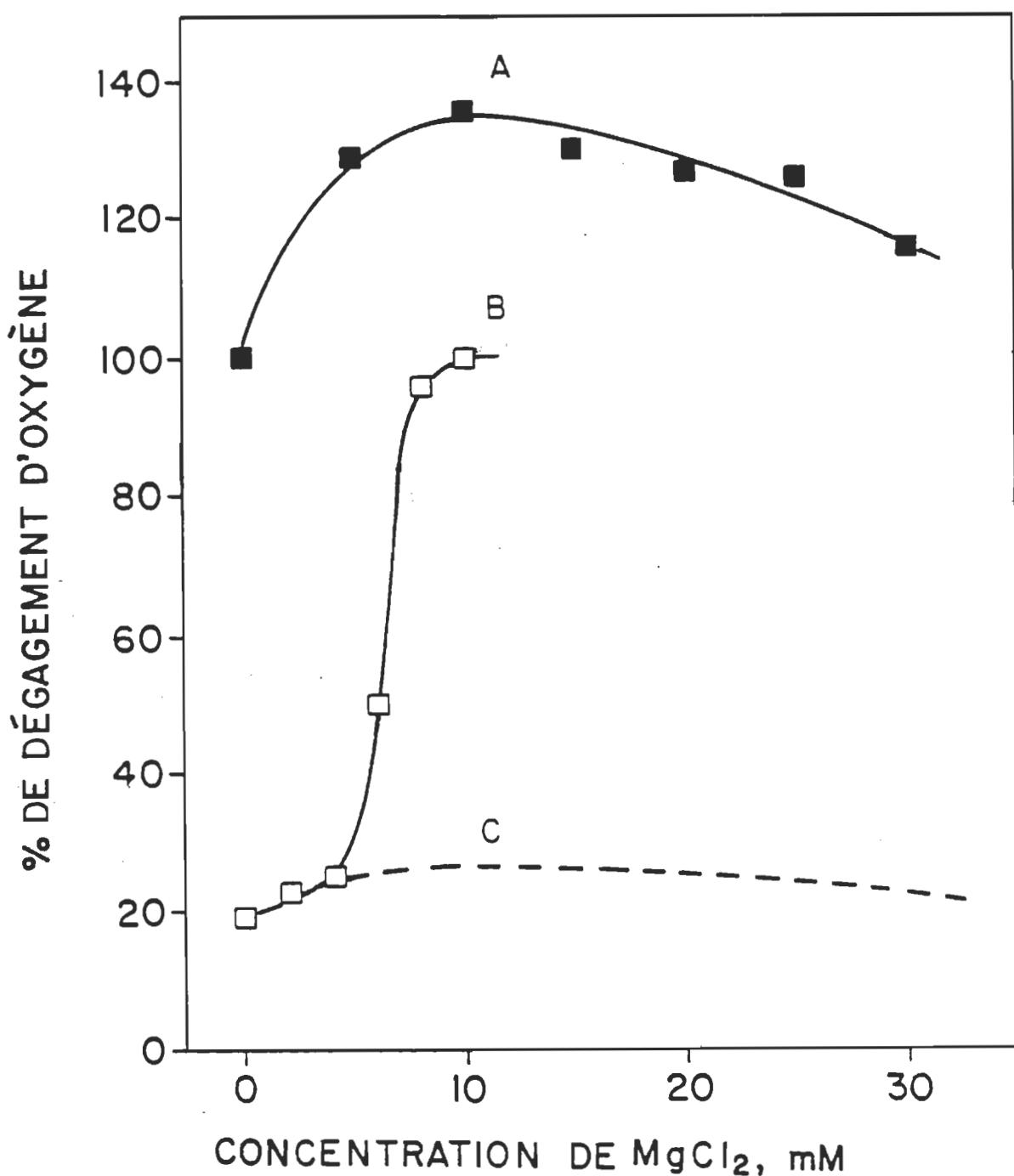


Figure 4.8. Dégagement d'oxygène dans les particules de PSII (A) et dans les complexes PSII-PGV (B) en fonction de la concentration de $MgCl_2$. La courbe C est une courbe théorique obtenue à partir de la courbe A en supposant qu'en absence de $MgCl_2$, l'activité du PSII-PGV (courbe B) résulte des particules de PSII libres (non incorporées dans les vésicules lipidiques).

de $MgCl_2$, en absence de PGV. On observe un maximum d'activité (136 %) autour de 10 mM de sel et ensuite cette activité décroît progressivement pour atteindre 115 % lorsque la concentration de $MgCl_2$ est de 30 mM.

La courbe B représente l'activation du complexe PSII-PGV par le $MgCl_2$, pour un rapport de 288 moles de PG/mole de Chl. Contrairement à la courbe A, on remarque qu'il existe une transition de phase dans l'activité de dégagement d'oxygène pour une concentration de $MgCl_2$ de 4 à 5 mM.

La courbe C est une représentation théorique tirée de la courbe A, en utilisant le pourcentage d'augmentation de l'activité de dégagement d'oxygène enrégistrée au niveau des particules de PSII, et en postulant que les 20 % d'activité observée en absence de $MgCl_2$, sur la courbe B, résultent des unités de PSII non liées au lipide. La courbe théorique obtenue ne montre pas une transition de phase telle que nous l'avions observée sur la courbe B et sur la figure 4.5. Ceci excluerait la participation d'une quantité significative de particules de PSII libres qui n'auraient pas été complexées avec le lipide (Fragata et coll. 1991).

Il est clair que nous avons une modification de l'activité de dégagement d'oxygène dans les particules de PSII lorsque celles-ci sont incubées avec des vésicules de PG et cet effet est fonction du rapport PG/Chl. Une stimulation d'activité est observée pour de faibles rapports PG/Chl alors qu'on est en présence d'une inhibition d'activité pour un rapport de

PG/Chl plus élevé. Cette observation corrobore partiellement les données de Gounaris et coll. (1983), à propos de l'effet des lipides chargés sur l'activité du PSII, bien que leurs expériences aient été faites avec un mélange de lipides anioniques (PG et SQDG). Ces auteurs ont observé une inhibition significative du dégagement d'oxygène avec des préparations de PSII incubées avec PG + SQDG (10 min, 298 K) pour un rapport lipide/Chl de 14/1 (p/p), en absence de cations divalents. Les données de la figure 4.4 montrent que dans des conditions expérimentales similaires à celles de Gounaris et coll. (1983), c'est-à-dire pour un rapport PG/Chl de 20/1 (p/p) ou 23/1 (mole/mole), 20 min d'incubation à 273 K et 1 min à 298 K (température à laquelle est effectué le dégagement d'oxygène), lorsque le milieu est dépourvu de $MgCl_2$, il y a une inhibition de 12 % de l'activité de dégagement d'oxygène. D'autre part, pour une incubation de 10 min, en présence de 5 mM $MgCl_2$ et à 298 K par exemple, température à laquelle les échanges lipidiques sont accrus entre deux couches membranaires en raison du phénomène de mobilité des molécules lipidiques (Siegenthaler et coll. 1989, Schechter 1990), l'inhibition de l'activité dépasse les 50 % de l'activité contrôle. Nous pouvons imaginer que cette inhibition serait encore plus importante en absence de sels. Nos résultats prouvent ainsi que la prévention de la perte d'activité dans les complexes PSII-PGV, pour des rapports de PG/Chl très élevés, est strictement liée à la présence de $MgCl_2$ à des

concentrations suffisantes (5-6 mM) pour promouvoir des interactions membrane-membrane. Lorsqu'on utilise les données mathématiques de la décroissance de l'activité, on s'aperçoit de l'importance de l'effet des sels, étant donné que l'activité du complexe PSII-PGV dans un milieu sans MgCl₂ est totalement inhibée pour Ln(PG/Chl) d'environ 6.75 c'est-à-dire 854 moles de PG/mole de Chl, alors qu'elle reste à 78 % lorsque le milieu contient 10 mM de MgCl₂. Une explication plausible de ce phénomène serait la neutralisation des charges de surface au niveau du complexe PSII-PGV ou la déshydratation des interfaces lipide-eau, éliminant de ce fait les forces de répulsion (forces d'hydratation) qui prévalent au niveau des têtes polaires des phospholipides (Rand 1981, McIntosh et coll. 1987, Wilshut 1991). Il s'en suit une augmentation des liaisons hydrogène entre les surfaces membranaires.

L'autre aspect de l'effet du MgCl₂ est mis en évidence dans la figure 4.3 inset, par la relation linéaire donnée par l'expression $Y = 0.61x + 72.65$ obtenue par la droite des moindres carrés avec un coefficient de corrélation de 0.990. En effet, la décroissance de l'activité de dégagement d'oxygène en fonction du temps lorsque le milieu contient 10 mM MgCl₂ (Y), est proportionnelle à la décroissance de l'activité en absence de sels (X). Le MgCl₂ affecte donc le site catalytique du complexe de dégagement d'oxygène, ou du moins son environnement. D'autre part, le lipide ne protège

pas complètement ce site au niveau des membranes de PSII, puisqu'on note une dénaturation du système en fonction du temps. Murata et coll. (1990) suggèrent que les molécules de PG sont certainement nécessaires dans le maintien de l'organisation structurale du centre réactionnel du PSII et comme nous l'avons montré plus haut (Nénonéné et Fragata 1990), ce lipide protège les membranes de PSII contre la détérioration du système pendant le cycle de congélation-décongélation. Ces observations confirment la participation de ce lipide dans le changement de conformation des polypeptides du PSII (voir chapitre suivant).

4.6.2 Modèle de coopérativité entre les unités de PSII.

A travers ce travail, nous avons démontré que dans un milieu de pH 6.5, un taux élevé de PG dans un complexe PSII-PGV abaisse l'activité de dégagement d'oxygène en absence de $MgCl_2$. Au contraire, la présence de sels à une concentration supérieure à 5 mM supprime l'effet nuisible d'un rapport élevé de PG/Chl. Nous avons mentionné dans le paragraphe précédent que cet effet peut être lié à la neutralisation des charges de surface par les hautes concentrations de sels, ce qui pourrait minimiser les interactions électrostatiques dans le complexe PSII-PGV. Ces remarques sont appuyées par les récents travaux de Graham et Williams (1991) sur l'effet de $MgCl_2$ sur l'activité de la phosphoglycérate

kinase (PK), et ceux de Tollin et Hazzard (1991) sur l'effet des interactions électrostatiques et hydrophobes dans le transfert d'électrons. Graham et Williams (1991) prouvent qu'en absence de Mg^{2+} , le site primaire de liaison de l'adénosine diphosphate dans la PK fait intervenir des interactions électrostatiques entre le diphosphate et la région basique N-terminale. Par contre, en présence de Mg^{2+} , les interactions hydrophobes entre l'adénosine et le site catalytique prévalent sur les effets électrostatiques. Quant à Tollin et Hazzard (1991), ils prouvent que dans le phénomène d'oxydo-réduction de paires de protéines, les plus importants taux de transfert d'électrons sont observés pour des valeurs intermédiaires de force ionique et ce taux décroît au-delà d'une concentration optimale de sels. Ils pensent que l'effet de faible force ionique est une conséquence de l'évolution des paires d'oxydo-réduction vers une conformation non optimale, qui se trouve caractérisée par une stabilisation de l'orientation moléculaire par des processus électrostatiques. Le maximum d'activité d'oxydo-réduction observé pour des valeurs intermédiaires de concentration de sels est attribuable aux interactions dues aux liaisons hydrogène et aux effets hydrophobes et par conséquent, à la formation de couple d'oxydo-réduction avec une géométrie favorable pour un transfert d'électrons. L'étude de ces phénomènes pourrait être faite par des méthodes dichroïques en utilisant la spectroscopie UV-VIS et

infrarouge avec la lumière polarisée.

Bien que les interprétations de Tollin et Hazzard (1991) soient plutôt de nature qualitative, elles viennent néanmoins appuyer nos travaux qui montrent une augmentation de l'activité de dégagement d'oxygène dans le complexe PSII-PGV pour des concentrations en $MgCl_2$, supérieures au seuil d'agrégation. Leurs travaux confirment ainsi que de fortes concentrations de sels minimisent les interactions électrostatiques dans le PSII-PGV et par là même abaisse l'énergie d'interaction. Dans ces conditions, la diffusion des unités de PSII dans la matrice de PGV n'est pas affectée par les charges négatives des groupes PO^- des molécules de PG qui seront présentes sous forme de paire d'ions du type $(PO^-)-(Mg^{2+})$ (voir les travaux de Northrup et coll. 1988). L'explication des données serait l'existance d'une coopération entre les unités de PSII dans les membranes de PGV, qui induirait une augmentation concomitante du dégagement d'oxygène. La figure 4.4 montre qu'en présence de 10 mM $MgCl_2$, le maximum d'activité (112 %) est atteint pour 10 moles de PG/mole de Chl c'est-à-dire $Ln(PG/Chl)$ d'environ 2.3, ce qui correspond à peu près à 50 molécules de PG par centre réactionnel II (P680), une moyenne de 5 molécules de Chl par P680 (voir Murata et coll. 1990, Murata et Miyao 1989). Par contre, pour 1440 molécules de PG par P680, l'activité de dégagement d'oxygène est réduit à 86 % environ. Le renforcement de l'activité serait dû à une augmentation de la probabilité de collision entre les unités

de PSII (voir Northrup et coll. 1988) dans les membranes de PGV qui favoriseraient des contacts transitoires ou plus ou moins permanents. La perte d'activité observée pour un rapport de PG/Chl élevé (Fragata et coll. 1991, Siegel et coll. 1981) pourrait s'expliquer par l'éloignement des unités de PSII les unes par rapport aux autres dû à leur grande dilution dans la bicouche de PG en raison du grand nombre de molécules de PG. Un modèle similaire a été proposé par McDonnel et Staehelin (1980), pour visualiser la reconstitution dans les vésicules ou liposomes de lécithine, du Chla/b LHC extrait des membranes de chloroplastes. Mais le modèle de McDonnel et Staehelin prévoit une organisation supramoléculaire beaucoup plus compacte des complexes LHC lors de l'agrégation des membranes de lécithine. Nous pouvons conclure que le $MgCl_2$, lorsqu'il est utilisé au-dessus de son seuil critique pour induire des interactions membrane-membrane, devient capable de contrer l'effet de dilution des particules de PSII provoqué par une quantité élevée de PG, par un mécanisme qui rend la coopérativité beaucoup plus efficace entre les unités de PSII. Ce modèle constitue une base nouvelle pour expliquer la fonction des polypeptides extrinsèques de 33, 24 et 18 kDa qui constituent le complexe de dégagement d'oxygène contenu dans l'espace restreint que présente le lumen du thylacoïde c'est-à-dire environ 60 à 80 Å d'épaisseur (voir Staehelin et Arntzen 1979) et qui correspond à la taille des trois polypeptides

pris ensemble. En raison des fluctuations de la pression osmotique du milieu aqueux du lumen (Murakami et Packer 1970), il devient raisonnable de prévoir une coopération transitoire ou permanente dans l'interaction des unités du PSII.

CHAPITRE V

ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE LIPIDE ET POLYPEPTIDES DU PSII PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE PAR TRANSFORMEE DE FOURIER.

5.1 Introduction.

Nous avons démontré que la présence d'ions divalents, en l'occurrence le Mg^{2+} , dans le milieu réactionnel permettait une augmentation de l'activité des particules de PSII incorporées dans des vésicules constituées de PG et que ces ions sont d'autre part, capables de promouvoir l'agrégation de ces vésicules. Les mécanismes qui sont à la base des effets du PG et des cations divalents sur l'activité photosynthétique ne sont pas très bien connus. L'investigation des éventuelles modifications structurales et conformationnelles qui interviennent au niveau des membranes photosynthétiques, peut être entreprise par des méthodes spectroscopiques qui nous permettent d'observer les vibrations internes des complexes moléculaires. Différentes techniques ont été utilisées dans l'étude des complexes Chl-protéines: diffraction des rayons X, résonance magnétique nucléaire, résonance Raman, infra-

rouge, etc... Dans le cas de la spectroscopie infrarouge des photons d'une énergie située entre 0.02 et 0.5 eV sont absorbés (Lutz et Mäntele 1991). La molécule absorbe la lumière infrarouge seulement si le moment dipolaire de la molécule change pendant la vibration (Tu 1982). L'infrarouge permet aussi d'éviter des réactions photochimiques ou de luminescence non désirées. Les radiations électromagnétiques dans la région infrarouge (10000 à 20 cm⁻¹) en provoquant un changement du niveau vibrationnel laissent néanmoins la molécule à son niveau électronique fondamental (Tu 1982, Lutz et Mäntele 1991).

Le phénomène de vibration atomique peut être visualisé comme l'interaction de deux particules reliées entre elles par un ressort (voir Tu 1982). Lorsqu'on tire sur ce ressort et qu'on le relâche, les deux particules entrent en mouvement d'étirement, et l'amplitude du mouvement est fonction de la masse des particules et aussi de la force du ressort (voir fig. 5.1a). Divers mouvements (fig. 5.1) peuvent être de ce fait décrits (étirements, repliements, torsions etc...). Dans les membranes biologiques, ces mouvements deviennent d'autant plus complexes que les structures chimiques des constituants membranaires sont plus élaborées. Les méthodes d'investigation de la membrane photosynthétique devraient surmonter trois barrières importantes (Lutz et Mäntele 1991):
(i) l'extrême complexité chimique de la membrane biologique,
(ii) la faiblesse des interactions moléculaires non covalen-

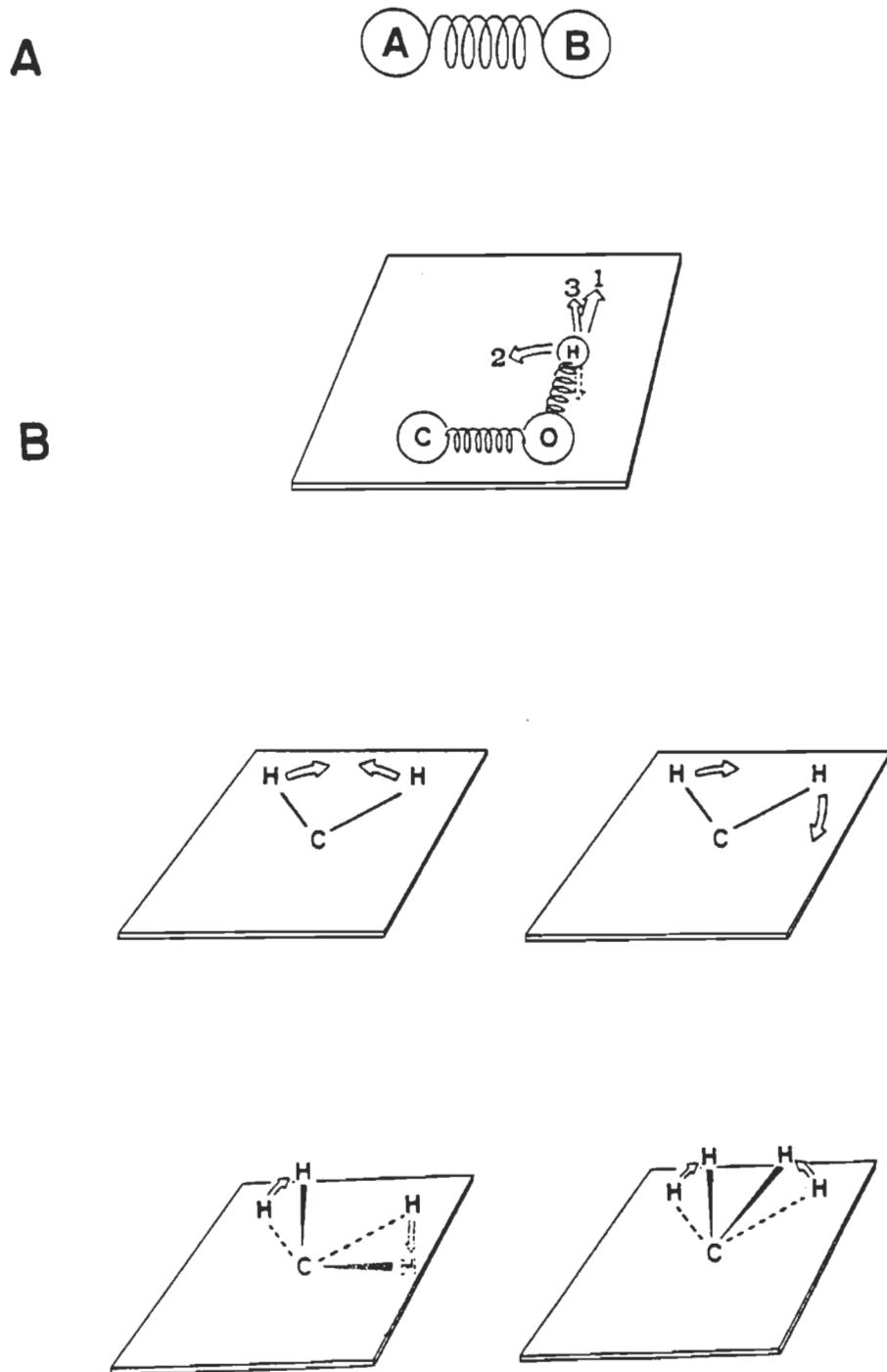


Figure 5.1. A) Vibration de deux atomes A et B représentée sous forme de vibration de deux balles reliées par un ressort. B) Représentation des différents mouvements (étirement, repliement, torsion etc...) dans la structure chimique d'une molécule (Tu, 1982).

tes qui maintiennent sa structure, et (iii) l'insolubilité de la plupart des composants membranaires en milieu aqueux. D'autre part ces structures membranaires en bicouche contiennent non seulement des lipides (galactolipides, phospholipides, sulfolipides) mais aussi des protéines, des glycoprotéines, des pigments (Chl et caroténoïdes) et d'autres espèces moléculaires.

Nous allons d'abord étudier les complexes Chl-protéines du PSII ensuite les vibrations des chaînes d'acides gras et des phospholipides, et enfin les interactions lipide-polypeptides du PSII.

5.2 Structure et modes de vibration des polypeptides du PSII.

5.2.1 Structure des chaînes polypeptidiques du PSII.

Les liaisons peptidiques (C-N) qui relient entre eux différents amino-acides pour former des polypeptides (structure primaire d'une protéine), possèdent les caractéristiques d'une double liaison et ne peuvent donc subir des mouvements libres de rotation. Les atomes impliqués dans cette liaison ainsi que les deux carbones asymétriques (C_α) restent alors dans un même plan. L'hydrogène de N-H et l'oxygène du carbone se situent en position trans l'un par rapport à l'autre (voir fig. 5.2a). Cette configuration est ainsi faite en

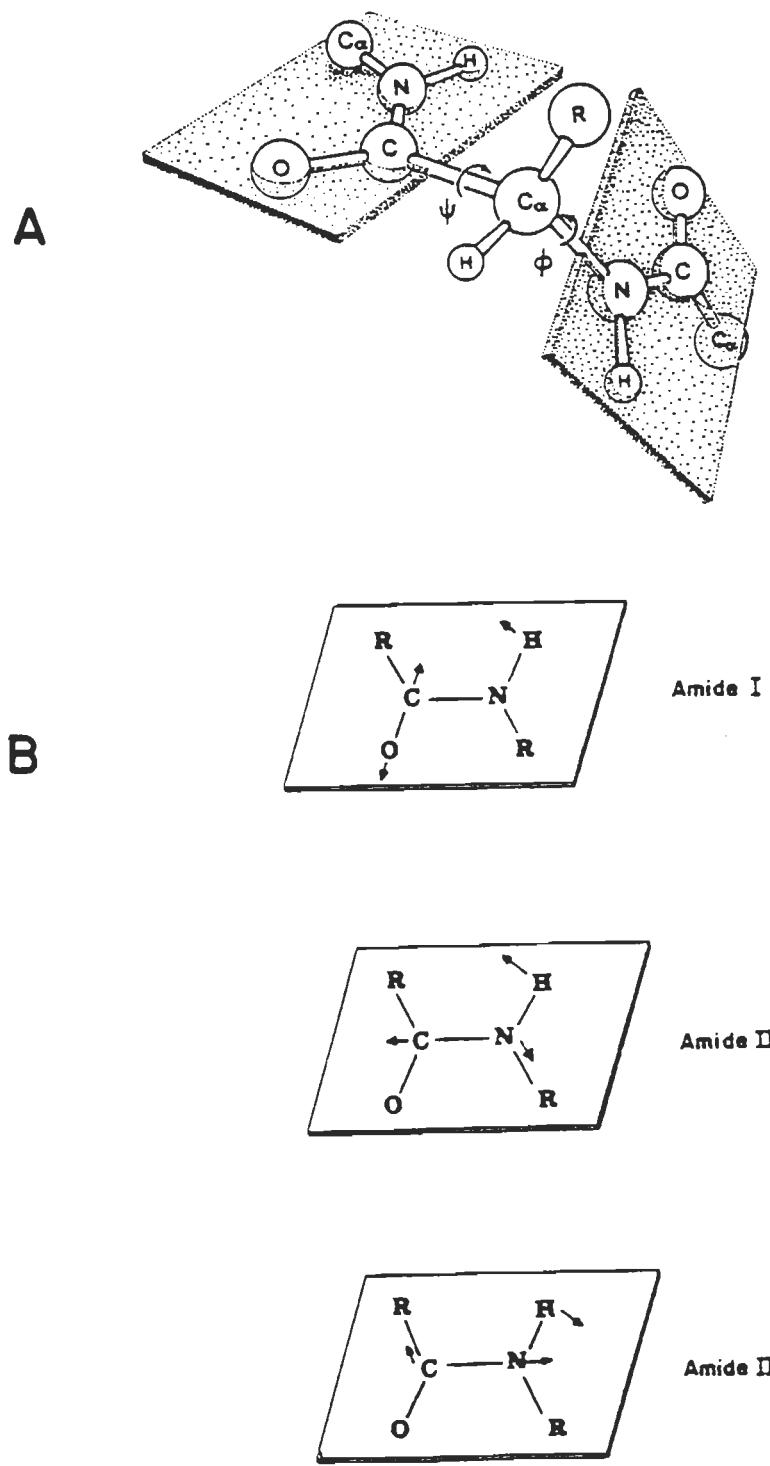


Figure 5.2. A) Structure et configuration de la liaison peptidique. B) Mode de vibration des fonctions amide (Tu, 1982).

raison de la stabilité par résonance de la liaison peptidique. L'orientation spatiale de la protéine sera alors déterminée uniquement par les angles de rotation ψ et ϕ au niveau du groupement méthylène CHR. Ces liaisons peptidiques donnent lieu à différents modes de vibration dont les plus importantes sont l'amide I, l'amide II et l'amide III. On peut noter aussi qu'il existe des harmoniques de l'amide II dans les hautes fréquences avec l'elongation N-H (amide A et B) en résonance Fermi (Doyle et coll. 1975, Tu 1982, Krimm et Bandekar 1986).

Dans les différents modes d'enroulement qui définissent la structure secondaire des protéines, la disposition hélicoïdale (formation de l'hélice α) est souvent favorisée car elle permet l'établissement de liaison hydrogène entre l'hydrogène de l'azote et l'oxygène du carbone du quatrième amino-acide (voir Richardson et Ridchardson 1989). Il existe également le feuillet β qui est une forme étirée de la protéine, la structure " β turn" ou coude β ou encore l'hélice 3_{10} qui forme une liaison hydrogène entre le premier et le troisième acide aminé (voir Lehninger 1981, Krimm et Bandekar 1986). Ces bandes de vibration des amides qui demeurent dans le même plan que les liaisons peptidiques (voir fig. 5.2) sont caractéristiques des propriétés structurales de la protéine.

5.2.2 Modes de vibration des amides.

L'amide A fait souvent partie du doublet de la résonance Fermi. C'est exclusivement un mode d'étirement du groupement N-H et il vibre autour de 3400 et 3200 cm^{-1} . En absence de groupement N-H, il n'existerait ni amide A, ni amide B, ni aucun autre mode de vibration comparable à l'amide II, et la composition des modes vibrationnels des autres amides serait différente (voir Doyle et coll. 1975).

L'autre composante de la résonance Fermi, l'amide B, se trouve généralement dans la région de 3100 à 3050 cm^{-1} (Krimm et Bandekar 1986).

L'amide I est définie comme étant, d'une part, un étirement du carbonyle C=O de la liaison peptidique, une élongation hors phase de la liaison C-N, une déformation de $\text{C}_\alpha\text{-C-N}$, avec d'autre part, une faible contribution du balancement de la liaison N-H. Lorsque Krimm et Bandekar (1986) utilisèrent une molécule simple, le N-méthylacétamide, pour étudier la nature générale des modes de vibration amide des protéines, ils démontrèrent que l'énergie potentielle distribuée à travers ces différentes liaisons est d'environ 83 % pour C=O, 15 % pour C-N et 11 % pour $\text{C}_\alpha\text{-C-N}$. La fréquence de l'amide I se situe entre 1675 et 1663 cm^{-1} (Krimm et Bandekar 1986) ou entre 1685 et 1630 cm^{-1} (Parker 1983). Certains auteurs (voir e.g., Tu 1982) pensent qu'en raison de la faible contribution du groupement N-H dans le mode de vibration de l'amide I

(voir Fig 5.2), la substitution de l'hydrogène par le deutérium n'affecte pas de façon significative sa fréquence. Par contre, Krimm et Bandekar (1986) situent l'amide I après deutériation entre 1668 et 1655 cm^{-1} . Notons ici que le carbonyle de la liaison peptidique mentionné plus haut, diffère de celui de l'acide carboxylique (-COOH) ou encore de l'ester de carbonyle (-COOR) que l'on rencontre dans la Chl, et sa fréquence de vibration est beaucoup plus faible (voir Bellamy 1975, Parker 1983, Lutz et Mäntele 1991).

Le mode de vibration de l'amide II est la combinaison d'une forte contribution du repliement hors phase de N-H dans le plan avec une énergie potentielle (EP) de 49 %, couplé à un étirement de la liaison C-N (33 % de EP), accompagnée d'une faible participation de repliement dans le plan de C-O (12 % de EP), ainsi que des étirements de $\text{C}_\alpha\text{-C}$ (10 % de EP) et N-C_α (9 % de EP) (voir Krimm et Bandekar 1986). En raison de la grande contribution du groupement N-H, la substitution de l'hydrogène par le deutérium modifie la fréquence de vibration de l'amide II (Tu 1982, Dong et coll. 1990) dont la valeur se situe normalement entre 1570 et 1515 cm^{-1} (Genzel et coll. 1984). La deutériation du groupement amide provoque une contribution plus importante de la liaison C-N et par conséquent, déplace la fréquence de l'amide II vers 1480 cm^{-1} (Krimm et Bandekar 1986).

Quant aux déplacements atomiques dans le mode de vibration de l'amide III, ils mettent en jeu un repliement de la

liaison N-H dans le plan avec 52 % de la distribution de l'énergie potentielle, et un étirement de C-N (18 % de EP). Il y a d'autre part, une contribution de l'étirement de la liaison C_α-C (18 % de EP) et du repliement dans le plan de C-O (11 % de EP). La bande de vibration de l'amide III est de très faible intensité en infrarouge (Tu 1982). Néanmoins sa fréquence de vibration se situerait entre 1300 et 1230 cm⁻¹ (Genzel et coll. 1984). Le mode de vibration de l'amide III est possible aussi d'un déplacement lorsque l'hydrogène est remplacé par le deutérium en raison de la grande contribution de la liaison N-H (Tu 1982, Krimm et Bandekar 1986).

Plusieurs travaux ont été effectués en spectroscopie infrarouge pour déterminer la conformation et la structure secondaire des protéines de l'appareil photosynthétique (Nabedryk et coll. 1984, Surewicz et Mantsch 1988, Chapados et coll. 1991, He et coll. 1991). Les trois bandes amides (I, II et III) que nous avons définies plus haut se trouvent dans l'intervalle souvent étudié lors des investigations de spectroscopie infrarouge de protéines, c'est-à-dire de 1900 à 900 cm⁻¹, et elles sont caractéristiques des vibrations propres à la structure secondaire des protéines.

5.3 Structure et modes de vibration des phospholipides.

Comme nous l'avions montré dans les figures 2.1 et 2.2, les phospholipides possèdent différentes régions qui ont des

caractéristiques différentes en spectroscopie infrarouge:

-La tête polaire hydrophile comporte le glycérol, l'acide phosphorique et la partie spécifique du phospholipide c'est-à-dire le glycérol pour le PG et la choline pour la PCh.

-La région interfaciale comporte les deux groupements carbonyles qui définissent les chaînes d'acides gras. Ces chaînes sont dénommées ns_1 et ns_2 (numérotation stéréospécifique) en fonction de la position de l'ester par rapport au glycérol de la tête polaire du phospholipide.

-La région hydrophobe des chaînes hydrocarbonées. La chaîne ns_1 reste perpendiculaire au plan de la membrane avec une conformation tout-trans au niveau des liaisons C-C. La chaîne ns_2 est d'abord parallèle au plan de la membrane et ensuite se replie pour devenir parallèle à ns_1 , ce qui donne une conformation particulière aux liaisons C-C (voir Hitchcock et coll. 1974, Pearson et Pascher 1979).

Des travaux récents sont effectués pour déterminer les modes de vibration des phospholipides et pour attribuer les différentes bandes à des structures spécifiques (Fookson et Wallach 1978, Dluhy et coll. 1983a et 1983b, Casal et coll. 1989, Chen et Cheng 1990, Lamba et coll. 1991). Ces travaux définissent les groupements carbonyles et méthylènes en comparant leurs spectres infrarouge avec ceux des esters d'acides gras. D'autres auteurs (Mushayakarara et coll. 1982, Arrondo et coll. 1984, Blume et coll. 1988, Pohle 1990) ont plutôt orienté leurs travaux sur les esters de carbonyle

et les groupements phosphate. La région d'étirement C-H se situe entre 3100 et 2800 cm^{-1} (voir Dluhy et coll. 1983a et 1983b, Lamba et coll. 1991). La région qui s'étale de 1900 à 900 cm^{-1} comporte le mode d'étirement des groupements carbonyles, les repliements des groupes CH_2 et CH_3 , et surtout les étirements du groupe phosphate. L'ester de carbonyle présente deux bandes entre 1780 et 1680 cm^{-1} (Dluhy et coll. 1983b) ou entre 1740 et 1727 cm^{-1} (voir Blume et coll. 1988). Ces deux bandes peuvent être superposées ou encore rester bien distinctes. La différence de fréquence de vibration des groupes esters reposeraient sur la différence de constante diélectrique dans l'environnement des deux groupes C=O ou encore dans la différence de conformation des chaînes ns_1 et ns_2 (Mushayakarara et coll. 1982, Blume et coll. 1988). Le mode de vibration du groupe phosphate présente également deux bandes localisées dans la région de 1300 à 1000 cm^{-1} (Arrondo et coll. 1984, Pohle 1990). Ces deux bandes bien distinctes, sont généralement d'intensité très importante. Leur fréquence de vibration respective se situe autour de 1230 et 1220 cm^{-1} pour le phosphate antisymétrique ($\nu_{\text{as}}\text{PO}_4^{3-}$) et autour de 1090 et 1080 cm^{-1} pour le phosphate symétrique ($\nu_{\text{s}}\text{PO}_4^{3-}$) (voir Dluhy et coll. 1983b, Pohle 1990). Alors que les variations de fréquence du phosphate symétrique sont beaucoup moins importantes, il est bien connu que le phosphate antisymétrique est le mode de vibration du groupe phosphate le plus sensible aux conditions expérimentales. Il est devenu

le paramètre le plus fiable pour déterminer les changements dans l'état chimique (électronique et géométrique) du groupement phospate, favorisant ainsi la spectroscopie infrarouge, car en spectroscopie Raman, la vibration du phosphate antisymétrique est un mode inactif (Pohle 1990). Enfin on peut noter aussi la fréquence de vibration du groupe C-O-P-O-C autour de 1060 cm^{-1} (voir Arrondo et coll. 1984).

5.4 Résultats et discussion.

5.4.1 Introduction.

Le but principal de notre étude des polypeptides du PSII par spectroscopie FTIR est d'aller chercher les informations dans leurs différentes structures à partir du paramètre spectral que sont les fréquences des différentes bandes vibrationnelles, ceci, lorsque nous ajoutons à notre préparation des sels (chlorure de magnésium) et des lipides.

Dans l'extraction de particules de PSII, les thylacoïdes ont été traités par du triton X-100, mais avant toute utilisation, ces préparations sont lavées (voir Matériels et Méthodes) afin d'éliminer le détergent. La figure 5.3 nous montre le spectre du triton X-100 (A), le spectre des thylacoïdes avant traitement au détergent (B) et enfin le spectre des particules de PSII (C). Nous pouvons remarquer d'une part que les thylacoïdes comportent une importante bande

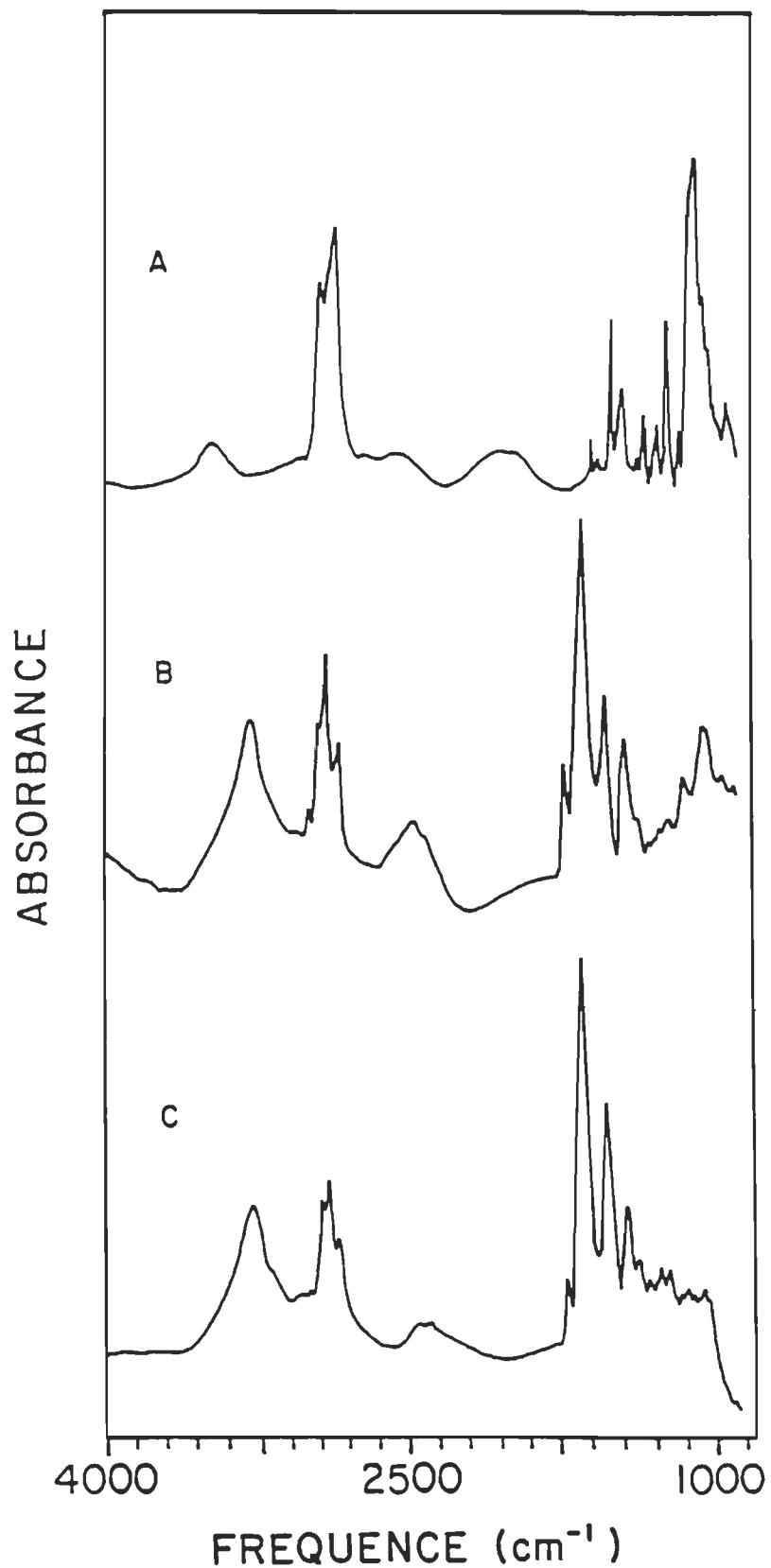


Figure 5.3. Spectre d'absorption FTIR du triton X-100 (A), des thylacoïdes (B) et des membranes de PSII (C).

située à 2479 cm^{-1} , avec un épaulement à 2412 cm^{-1} , et dont l'intensité diminue à la suite du traitement au détergent. Les thylacoïdes présentent d'autre part, une large bande dans la région 1070 cm^{-1} qui est constituée des pics à 1067 et 1047 cm^{-1} . Cette bande correspondrait à la bande de vibration du phosphate symétrique dans les phospholipides. On note la disparition de cette bande à la suite du traitement avec le triton X-100, indiquant ainsi l'élimination importante de phospholipides. Enfin, il existe un pic à 1518 cm^{-1} dans le spectre du triton X-100 qui est attribuable à la tyrosine et que l'on retrouve aussi bien dans les thylacoïdes que dans les particules du PSII. Ce pic dans le spectre des particules de PSII ne serait donc pas une contamination du détergent mais correspondrait plutôt au résidu tyrosine dans les polypeptides (voir Bendit 1967, Nabedryk et Breton 1981, Kennedy et coll. 1990).

Pour des raisons pratiques, nous avons choisi de travailler dans l'oxyde de deutérium (D_2O) car comme nous pouvons l'observer sur la figure 5.4, les bandes spectrales de l'oxyde de deutérium (B) chevauchent à peine celles des particules de PSII (C) ainsi que celles des phospholipides (D), alors que le spectre de l'eau (A) les recouvre de façon beaucoup plus importante. Dans le cadre de ce travail, nous avons aussi étudié l'activité des particules de PSII lorsque celles-ci sont incubées dans du tampon A constitué d'oxyde de deutérium. Cette activité représente 67.65 % de l'activité des

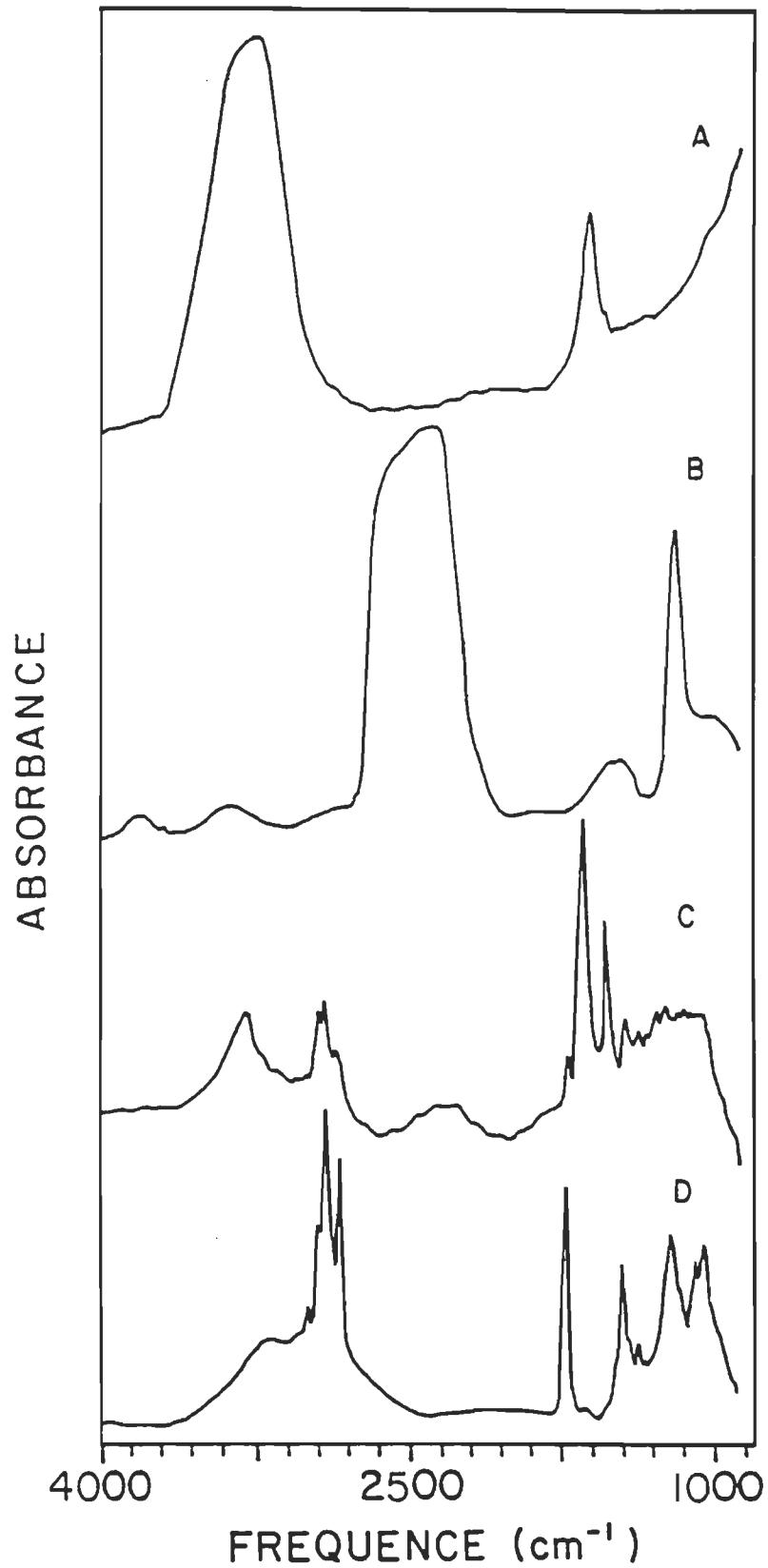


Figure 5.4. Spectre d'absorption FTIR de H_2O (A), D_2O (B), des membranes de PSII (C) et du phosphatidylglycérol (D).

particules dans un tampon constitué d'oxyde d'hydrogène (100 % = 439.67 μ moles d' O_2 /mg de Chl x h).

5.4.2 Analyse des spectres FTIR des polypeptides du PSII.

Etant donné que les modifications qui interviennent au niveau des modes de vibration des amides A, B, I et II réflètent des changements dans la structure secondaire des protéines, notre attention se portera plus particulièrement sur les variations de fréquence de ces bandes.

Dans la région d'étirement entre 3700 et 2100 cm^{-1} , on note l'amide A, bande très importante, symétrique, qui vibre à une fréquence de 3300 cm^{-1} dans les thylacoïdes entiers (cf. Fig. 5.3). Ce mode de vibration réflétant une structure hélicoïdale (Doyle et coll. 1975, Tu 1982, Parker 1983), apparaît à une fréquence légèrement plus basse c'est-à-dire à 3296 cm^{-1} dans les polypeptides du PSII (Fig. 5.5). La bande d'amide A comporte une élongation de N-H, et bien qu'elle soit un mode de vibration très localisé, donc très peu sensible à la conformation des chaînes polypeptidiques, elle présente une fréquence qui dépend étroitement de la liaison hydrogène N-H...O=C. Son déplacement peut être le résultat de changements structuraux (voir à ce sujet, tableau I de Doyle et coll. 1975), et plus cette liaison hydrogène est forte, plus la fréquence de vibration de cette bande d'amide A est faible (Doyle et coll. 1975). L'élongation d'un groupement N-H

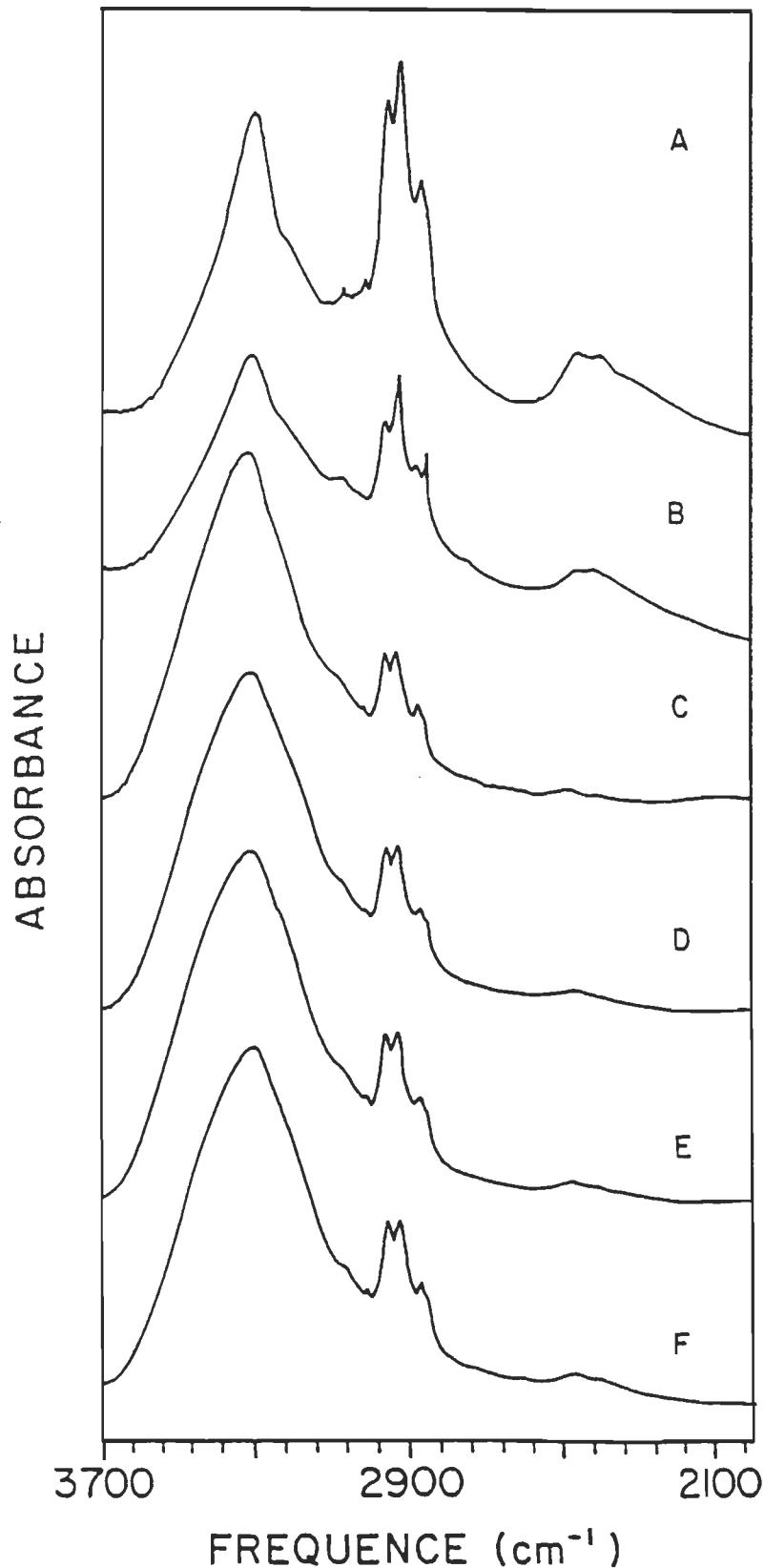


Figure 5.5. Spectre d'absorption FTIR des polypeptides du PSII dans la région des étirements C-H en fonction de différentes concentrations de MgCl_2 en mM: A (0), B (2), C (4), D (6), E (8) et F (10).

libre se situe dans l'intervalle de 3400 à 3440 cm^{-1} , mais lorsque ce groupement se trouve impliqué dans une liaison hydrogène, sa bande se déplace vers des fréquences plus faibles, généralement autour de 3300 cm^{-1} (Bellamy 1975). Néanmoins, il faut noter que la bande d'amide A observée dans les polypeptides et les protéines n'est pas une simple fréquence d'elongation mais provient de la résonance Fermi entre la fréquence d'elongation de N-H et la première harmonique de la bande d'amide II (Doyle et coll. 1975). Dans les particules de PSII (Fig. 5.5), la bande d'amide A va s'élargir et sa fréquence de vibration va augmenter en fonction de MgCl_2 pour atteindre 3306 cm^{-1} lorsque la concentration des ions divalents Mg^{2+} est comprise entre 4 et 10 mM (voir tableau 5.1). L'amide B va aussi augmenter de fréquence de vibration et passer de 3060 cm^{-1} à 3064 cm^{-1} avec l'ajout de Mg^{2+} . On peut également noter d'autres modes de vibration, tels que les étirements C-H dans la région allant de 2954 à 2848 cm^{-1} (voir tableau 5.1) qui ne présentent aucune modification significative de fréquence de vibration mais dont l'intensité baisse de façon importante avec la concentration de Mg^{2+} .

Dans la région communément utilisée pour l'analyse des polypeptides et qui s'étale de 1900 à 900 cm^{-1} (Fig. 5.6), nous avons une bande à 1735 cm^{-1} de faible intensité qui correspond au carbonyle de l'ester (-COOR) que l'on retrouve dans la molécule de Chl (voir Lutz et Mäntele 1991, Chapados

Tableau 5.1 Spectroscopie infrarouge par transformé de Fourier des polypeptides du PSII: effet de différentes concentrations de MgCl₂

Tentative d'attribution des bandes	Concentration de MgCl ₂ en mM					
	0	2	4	6	8	10
Région des étirements C-H		Fréquence en cm⁻¹				
Amide A	3296	3296	3306	3306	3306	3306
Amide B	3060	3064	3066	3064	3064	3064
Élongation = C-H	3007	3011	3014	3010	3010	3010
CH ₃ asymétrique	2954	2954	2957	2957	2957	2957
CH ₂ antisymétrique	2924	2927	2927	2927	2927	2927
CH ₃ symétrique	2871	2871	2871	2871	2871	2871
CH ₂ symétrique	2848	2848	2848	2851	2851	2851
a	2469	2465	2482	2475	2475	2475
a	2412	2412	-----	-----	2412	2408
Région de 1900 à 900 cm⁻¹						
Carbonyle de l'ester (-C=O)	1735	1735	1737	1737	1737	1735
Amide I (-C=O)	1650	1655	1655	1657	1657	1657
Amide II (repliement N-H)	1547	1547	1547	1549	1549	1549
Résidu tyrosine	1518	1520	1520	1520	1519	1520
Repliement de CH ₃	1451	1447	1451	1451	1451	1451
Repliement de CH ₂	1386	1388	1386	1386	1386	1386
Amide III	1288	1286	1286	1288	1288	1286
a	1245	1245	1245	1245	1247	1245
Étirement P-O-C	1069	1071	1071	1067	1067	1067
a	1047	1047	1047	1045	1046	1046

^a L'attribution de ces bandes n'a pas été possible malgré une étude approfondie de la littérature (cf., e.g., Bellamy 1975, Parker 1983, Genzel et coll. 1984, Krimm et Bandekar 1986).

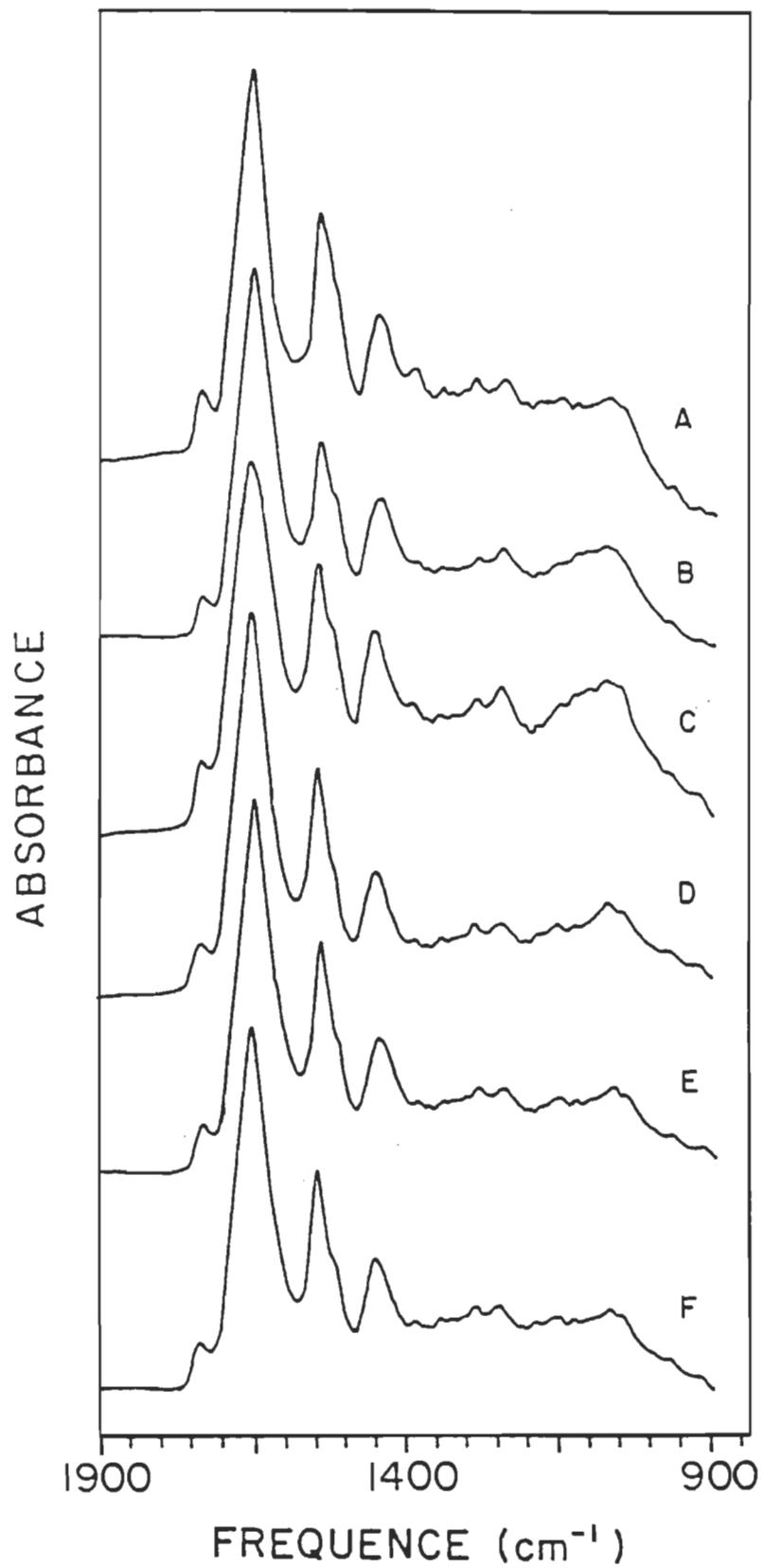


Figure 5.6. Spectre d'absorption FTIR des polypeptides du PSII dans la région de 1900 à 900 cm^{-1} en fonction de différentes concentrations de MgCl_2 en mM: A (0), B (2), C (4), D (6), E (8) et F (10).

et coll. 1991). Il existe une forte absorption de l'amide I dont la fréquence se situe à 1650 cm^{-1} (voir Fringeli et Günthard 1981) et dont la bande de vibration symétrique est caractéristique de la structure en hélice α . Il est suivie de l'amide II à 1547 cm^{-1} (voir Doyle et coll. 1975, Parker 1983, Nabedryk et coll. 1984). Ce sont des fréquences observées lorsque l'on travaille à l'état solide (voir Parker 1971, 1983). On note aussi le résidu tyrosine, qui se situe à 1518 cm^{-1} (Bendit 1967, Nabedryk et Breton 1981, Kennedy et coll. 1990). L'amide III qui est un mode de vibration importante en spectroscopie Raman (voir Tu 1982), est pratiquement inexisteante en infrarouge, on peut néanmoins deviner une bande à 1288 et à 1245 cm^{-1} (voir Genzel et coll. 1984). Les bandes d'amide I et d'amide II subissent des déplacements vers les hautes fréquences en fonction des différentes concentrations de MgCl_2 utilisées, et passent respectivement de 1650 à 1657 cm^{-1} , et de 1547 à 1549 cm^{-1} (voir tableau 5.1), ce qui dénote une modification de la structure hélicoïdale des polypeptides du PSII.

5.4.3 Etude par spectroscopie FTIR des interactions du Mg^{2+} avec le phosphatidylglycérol.

Dans le spectre du phosphatidylglycérol, les modifications les plus importantes qui vont nous intéresser ont lieu dans la région interfaciale au niveau du carbonyle de l'ester et

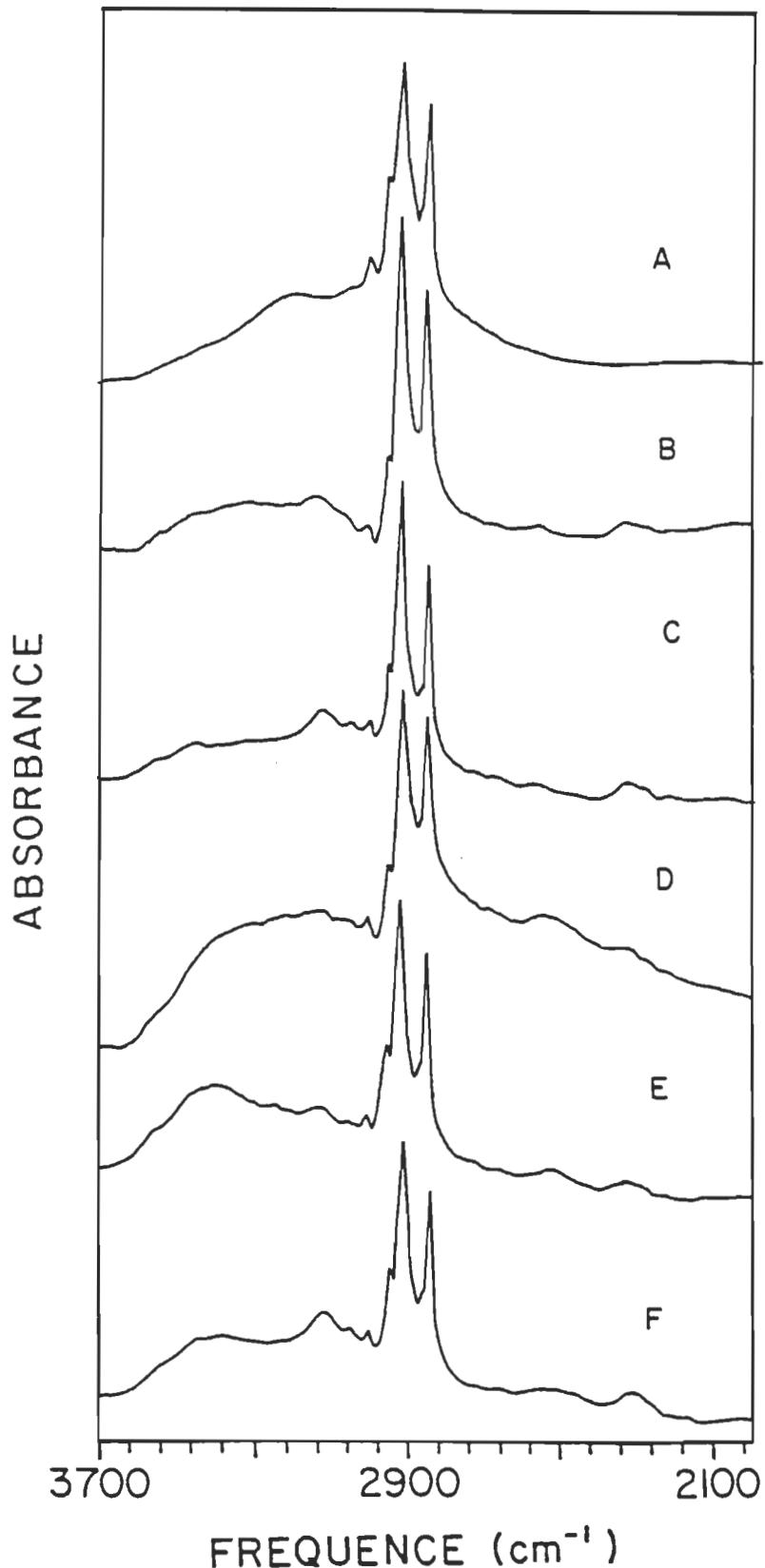


Figure 5.7. Spectre d'absorption infrarouge dans la région des étirements C-H du phosphatidylglycérol en présence de MgCl₂: A (0 mM), B (2 mM), C (4 mM), D (6 mM), E (8 mM) et F (10 mM).

du groupement phosphate.

Dans la région d'étirement des chaînes d'acides gras allant de 3700 à 2100 cm^{-1} , les bandes sont relativement difficiles à attribuer (Fig. 5.7) en raison de la résonance Fermi. Néanmoins l'on a l'elongation =C-H qui est visible à 3009 cm^{-1} , le mode d'étirement du groupement CH_3 asymétrique qui se situe à 2954 cm^{-1} , celui du groupement CH_2 antisymétrique qui est identifiable à 2923 cm^{-1} , CH_3 symétrique à 2872 cm^{-1} et enfin CH_2 symétrique à 2849 cm^{-1} (voir Fringeli et Günthard 1981, Dluhy et coll. 1983a, 1983b, Lamba et coll. 1991). A l'exception des bandes de CH_2 antisymétrique et CH_3 symétrique qui baissent de fréquence lorsque l'on augmente la concentration de Mg^{2+} en raison probablement de la cristallisation des lipides (voir Choi et coll. 1991), les autres modes de vibration dans cette région restent stables quelque soit la concentration de sel ajouté (voir tableau 5.2a).

Dans la région s'étalant entre 1900 et 900 cm^{-1} (voir Fig. 5.8), on note:

- Au niveau de la région interfaciale une importante bande due au groupement carbonyle 1739 cm^{-1} (voir Dluhy et coll. 1983b, Blume et coll. 1988), provenant des liaisons hydrogène qui se font avec le groupement carbonyle des chaînes d'acides gras (ns_1 et ns_2). On note ici une seule bande pour ces deux groupements carbonyles (Fig. 5.8A) en raison de leur vibration à la même fréquence. Lorsque l'on ajoute du MgCl_2 dans

Tableau 5.2a Étude des fréquences de vibration du phosphatidylglycérol par spectroscopie FTIR: effet du MgCl₂

Tentative d'attribution des bandes	Concentration de MgCl ₂ en mM					
	0	2	4	6	8	10
Région des étirements C-H		Fréquence en cm⁻¹				
νO-H	----	----	3127	----	3135	3127
a	----	----	3064	----	3060	3060
Élongation = C-H	3009	3009	3009	3009	3009	3009
CH ₃ asymétrique	2954	2955	2955	2955	2955	2955
CH ₂ antisymétrique	2923	2919	2919	2916	2919	2919
CH ₃ symétrique	2872	2870	2868	2868	2868	2868
CH ₂ symétrique	2849	2849	2849	2849	2849	2849
a	----	2340	2332	2360	2332	2329

^a Voir note (a) dans tableau 5.1.

Tableau 5.2b Étude des fréquences de vibration du phosphatidylglycérol par spectroscopie FTIR: effet du MgCl₂

Tentative d'attribution des bandes	Concentration de MgCl ₂ en mM						
	0	2	4	6	8	10	
Région de 1900 à 900 cm⁻¹		Fréquence en cm⁻¹					
Étirement de C=O	1739 ---- ----	1735 1725 1702	1735 1727 1702	1735 1725 1700	1737 1727 1702	1735 1727 1702	
Élongation C=C a	1653 ----	----	----	1639 1614	1639 1614	1641 1619	
Cisaillement du groupe CH ₂	1467	1467	1467	1467	1467	1468	
Déformation asymétrique du groupe CH ₃	1455	1457	1457	1457	1457	1457	
Déformation du groupe CH ₂	1422	1416	1418	1416	1418	1416	
Déformation symétrique du groupe CH ₃	1377	1378	1378	1378	1378	1378	
Balancement des CH ₂	1343	1343	1343	1343	1343	1343	
Étirement du phosphate antisymétrique (ν_{as} PO ₂ ⁻)	1259 1216	1260 1249	1252 1252	1259 1249	1261 1251	1261 1252	
Élongation antisymétrique C-O-C a a	1174 1144 1116	1177 1139 1117	1179 1140 1115	1176 1139 1115	1176 1141 1114	1176 1141 1114	
Étirement du phosphate symétrique (ν_s PO ₂ ⁻)	1093	1108	1110	1106	1108	1108	
C-O-P-O-C	1063	1058	1062	1056	1060	1058	
Élongation O-H du phosphate	1049	1039	1040	1039	1041	1041	
Élongation P-O du phosphate- ester							

^a Voir note (a) dans tableau 5.1.

le milieu, cette bande baisse légèrement de fréquence et surtout se subdivise en trois (1735 , 1725 et 1702 cm^{-1}). Cette scission de bande est attribuable aux groupements carbonyles lorsqu'ils ont différents degrés d'hydratation (Blume et coll. 1988). Et la baisse de fréquence indique qu'il y a formation de liaison d'hydrogène intermoléculaire entre le carbonyle et les molécules d'eau ou encore intramoléculaire entre le carbonyle et les groupements OH du glycérol du PG. Le pic à haute fréquence situé 1735 cm^{-1} dans notre cas, serait attribuable au groupement carbonyle (ns_1) le plus éloigné de la tête polaire car ce groupement est situé plus profondément dans la région hydrocarbonée avec un environnement plus hydrophobe. Celui de fréquence intermédiaire, 1725 cm^{-1} , représenterait le groupement carbonyle ns_2 situé plus près de la tête polaire et dont l'environnement est beaucoup plus polaire; il serait lié à une molécule d'eau (voir à ce sujet, Mushayakarara et coll. 1982, Blume et coll. 1988). Enfin celui à plus faible fréquence, 1702 cm^{-1} , est attribuable à une dihydratation du carbonyle de l'ester (Blume et coll. 1988, Choi et coll. 1991). La différence de fréquence de vibration observée pour ce groupement carbonyle serait donc due aux différents degrés d'hydratation.

- Au niveau du glycérol, l'elongation du groupe $C=C$ observée à 1653 cm^{-1} baisse de fréquence en présence de $MgCl_2$, pour se stabiliser autour de 1640 cm^{-1} . Quant à la déformation du groupe CH_2 , on note une variation de fréquence qui passe de

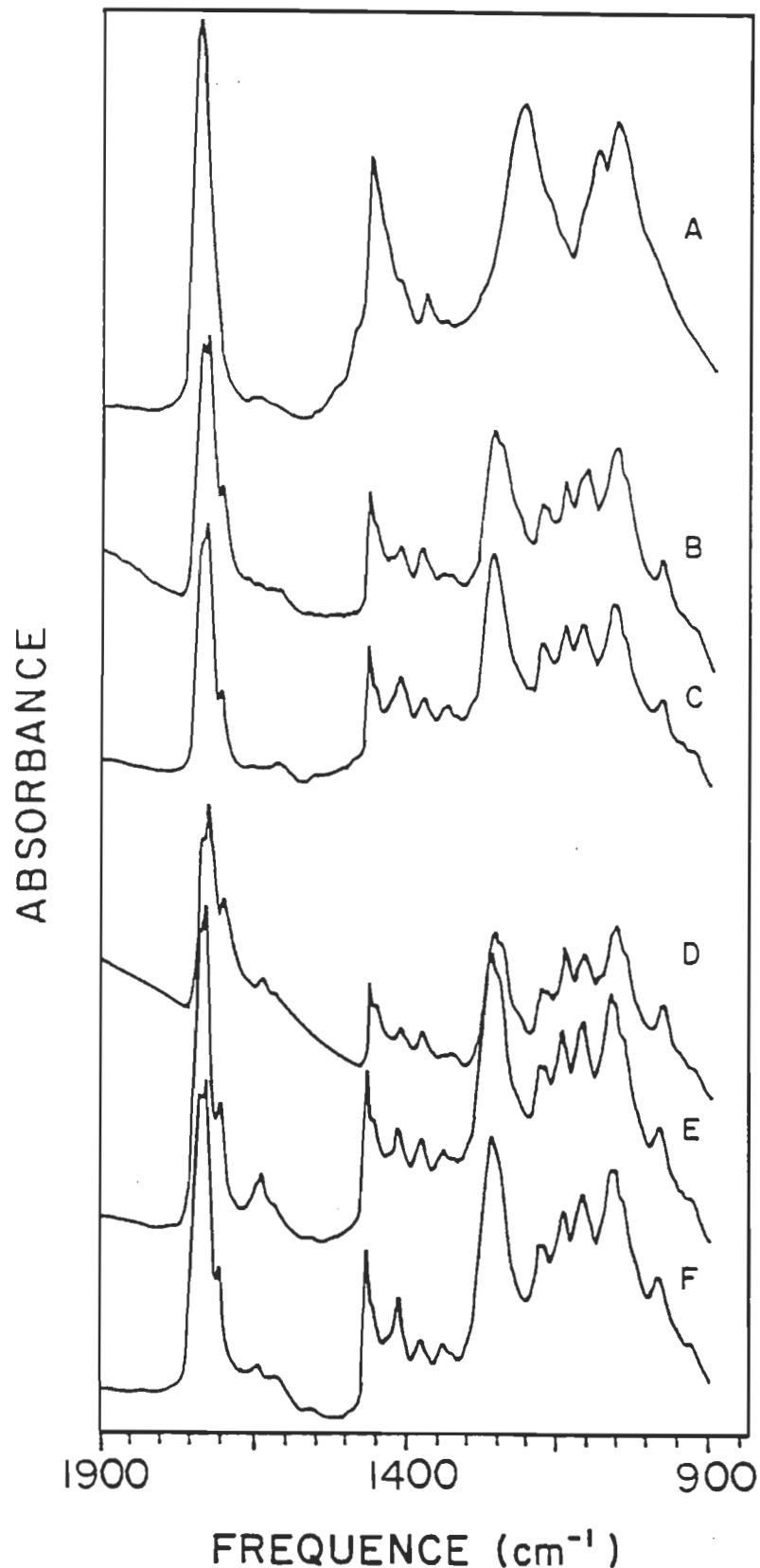


Figure 5.8. Spectre d'absorption infrarouge dans la région de 1900 à 900 cm⁻¹ du phosphatidylglycérol en présence de $MgCl_2$: A (0 mM), B (2 mM), C (4 mM), D (6 mM), E (8 mM) et F (10 mM).

1422 à 1418-1416 cm^{-1} en présence de Mg^{2+} (voir tableau 5.2b).

- Dans la région polaire, les vibrations les plus importantes proviennent du groupement phosphate. Lorsque le milieu ne contient pas de MgCl_2 (Fig. 5.8A) la bande qui apparaît à 1216 cm^{-1} représente le mode de vibration du phosphate antisymétrique ($\nu_{as}\text{PO}_2^-$) et son enveloppe comporte dans sa partie descendante des pics perceptibles à 1174 et 1144 cm^{-1} . Par contre les bandes qui se situent à 1093 et 1062 cm^{-1} avec un épaulement à 1116 cm^{-1} sont attribuables au phosphate symétrique ($\nu_s\text{PO}_2^-$) (voir Mushayakarara et coll. 1982, Arrondo et coll. 1984, Blume et coll. 1988, Pohle 1990). Nous pouvons remarquer que lorsqu'on ajoute 2 mM de MgCl_2 au milieu, la fréquence de la bande $\nu_{as}\text{PO}_2^-$ augmente à 1259 cm^{-1} avec un épaulement dans sa partie descendante qui se situe à 1249 cm^{-1} . Ces valeurs vont progresser pour atteindre respectivement 1261 et 1252 cm^{-1} quand la concentration de MgCl_2 arrive à 10 mM, ceci serait probablement dû à la liaison du cation divalent (Mg^{2+}) et son effet de déshydratation sur le groupement phosphate-ester ou encore à la modification de l'environnement de ce groupement. D'autre part, on note un rétrécissement de cette bande à la suite de l'ajout de sel et un déplacement des épaulements qui deviennent des pics bien identifiables à 1176 et 1141 cm^{-1} , ce qui pourrait suggérer l'immobilisation du groupement phosphate par le cation divalent et montrer que la quantité de lipide lié au cation augmente (Choi et coll.

1991). Egalement pour le $\nu_s \text{PO}_2^-$, on constate une parfaite séparation des bandes localisées à 1093 et 1063 cm^{-1} avec un déplacement respectif à 1108 et 1058 cm^{-1} en fonction de MgCl_2 .

5.4.4 Application de la spectroscopie FTIR dans l'étude des complexes PSII-PGV.

Dans les membranes reconstituées suite à l'incubation des polypeptides du PSII avec des liposomes de phosphatidylglycérol, nous avons observé des changements dans les spectres FTIR qui indiquent l'incorporation des polypeptides dans les vésicules de PG (voir Fig. 5.9 et 5.10).

Dans la région des étirements C-H entre 3700 et 2100 cm^{-1} (Fig. 5.9), le complexe lipide-protéine présente un mode de vibration de l'amide A qui apparaît à 3280 cm^{-1} , c'est-à-dire à une fréquence beaucoup plus faible que dans les particules de PSII seules. Ceci serait un signe de la formation de fortes liaisons hydrogène (voir Doyle et coll. 1975) dans le complexe lipide-protéine. Cette fréquence de vibration augmente avec la concentration des cations divalents dans le milieu pour atteindre 3295 cm^{-1} . On note donc un déplacement important de ce mode de vibration vers les hautes fréquences en fonction de la force ionique du milieu et également une baisse considérable de son intensité lorsqu'on compare ses caractéristiques avec celles obtenues dans les particules de

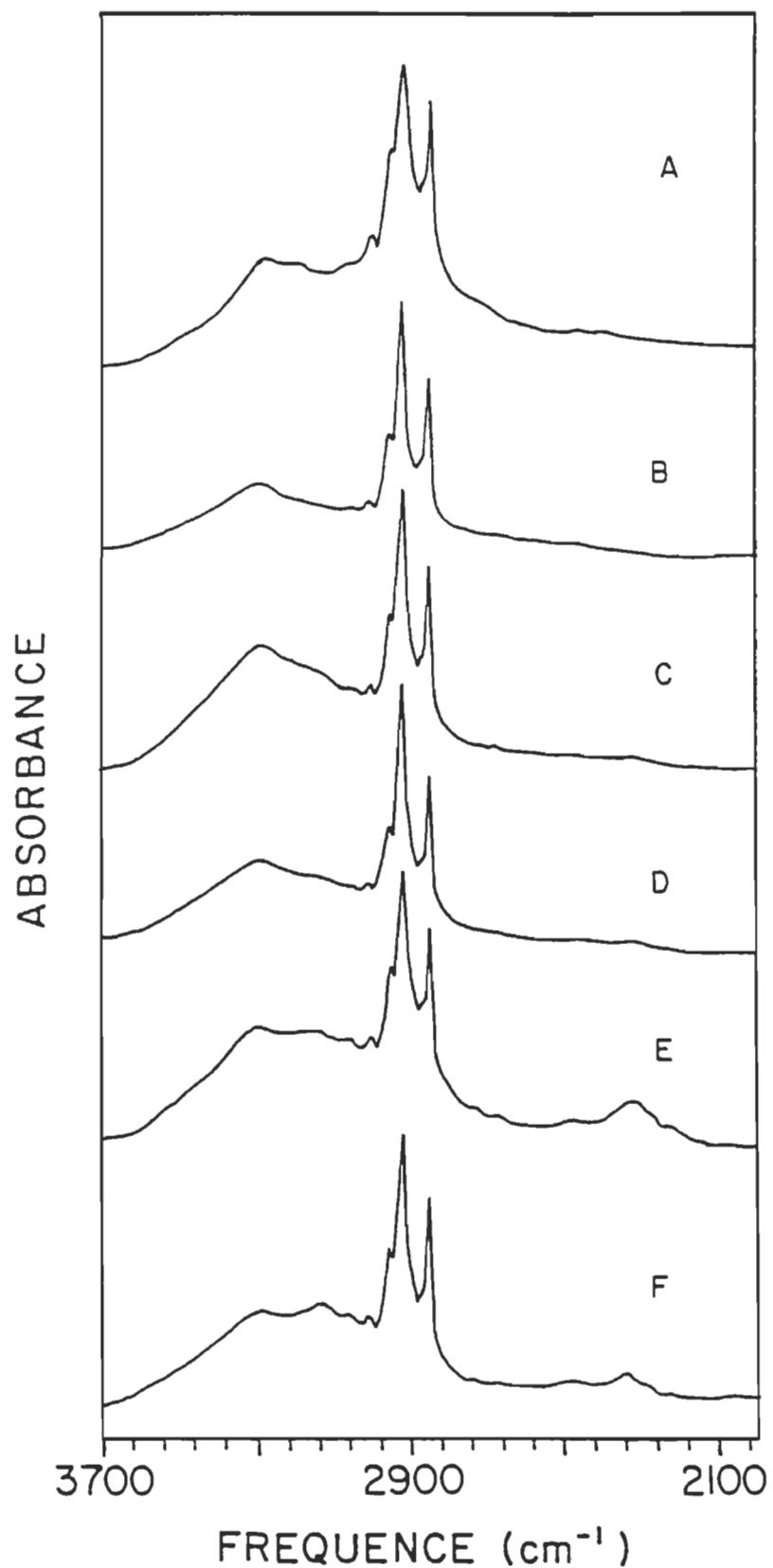


Figure 5.9. Spectre d'absorption infrarouge dans la région des étirements C-H du complexe PSII-PGV en présence de MgCl₂: A (0 mM), B (2 mM), C (4 mM), D (6 mM), E (8 mM) et F (10 mM).

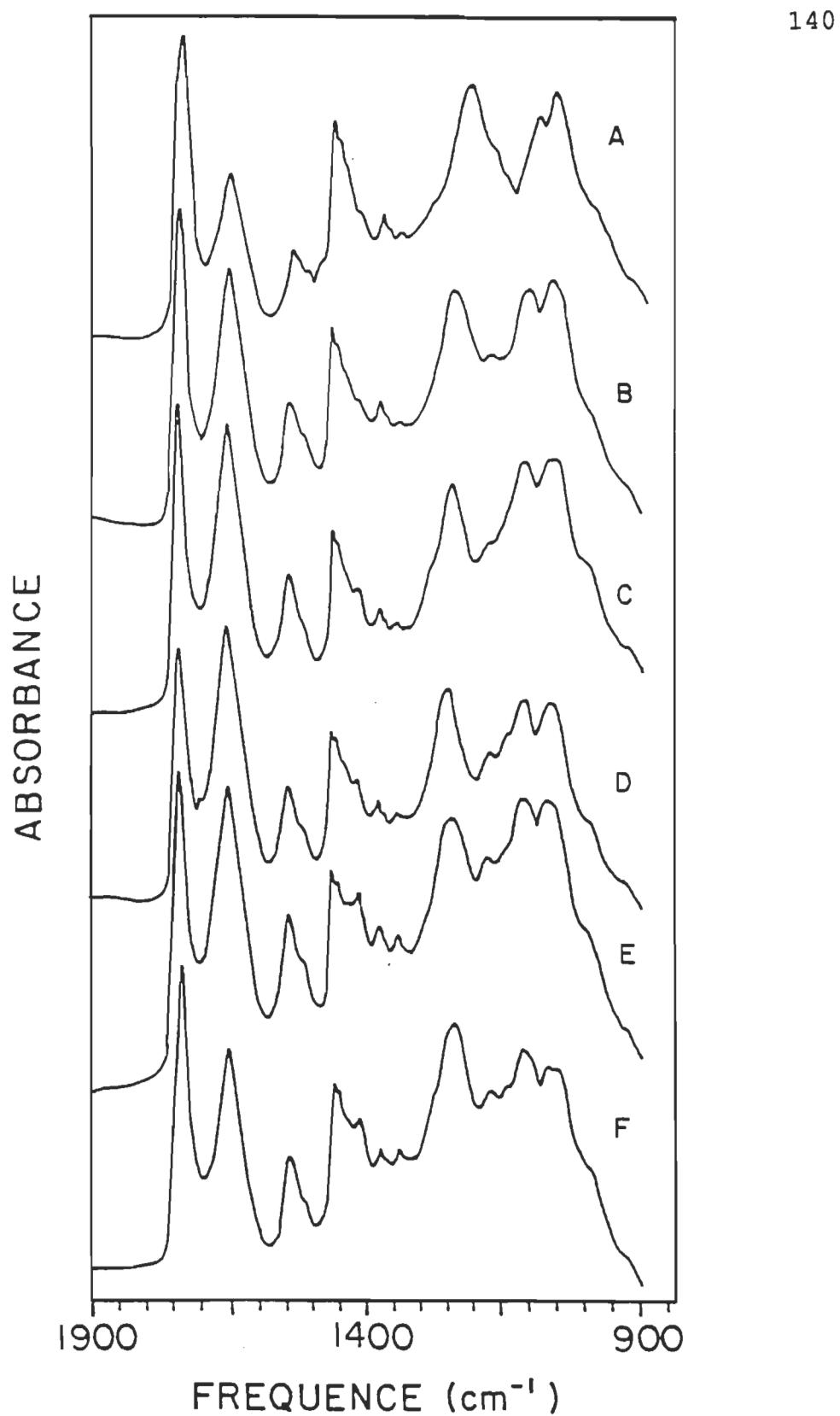


Figure 5.10. Spectre d'absorption infrarouge dans la région de 1900 à 900 cm^{-1} du complexe PSII-PGV en présence de MgCl_2 : A (0 mM), B (2 mM), C (4 mM), D (6 mM), E (8 mM) et F (10 mM).

PSII prises séparément. D'autre part, à force ionique égale, la complexation des polypeptides du PSII avec le PG fait baisser la fréquence de vibration de l'amide A. Ceci correspondrait à un changement de la structure hélicoïdale des polypeptides (voir Doyle et coll. 1975) lorsqu'ils sont en présence du phospholipide. Quant aux autres modes de vibration, l'elongation =C-H reste très stable à 3009 cm^{-1} , de même que le CH_3 asymétrique qui ne varie pas dans les différentes préparations que ce soit dans les particules de PSII ou dans les phospholipides, ni même dans le complexe lipide-protéine. Par contre l'étirement du groupement méthylène CH_2 antisymétrique présente une fréquence de vibration qui oscille entre 2923 et 2919 cm^{-1} , alors que le CH_2 symétrique ne subit aucune modification en fonction de la concentration de MgCl_2 , (voir tableau 5.3a).

Dans la région de 1900 à 900 cm^{-1} (voir Fig. 5.10), le carbonyle de l'ester de la chlorophylle des particules de PSII vibre approximativement à la même fréquence (1735 cm^{-1}) que celui du phospholipide (1739 cm^{-1}). Mais ce dernier étant plus important en intensité et présentant une bande beaucoup plus large, englobe celui de la Chl et impose sa fréquence de vibration. Contrairement à ce qui se produit dans le phospholipide seul, cette bande reste très stable en fréquence quelque soit la concentration de Mg^{2+} , et on ne remarque aucune séparation de pic nous permettant de distinguer les

Tableau 5.3a Bandes d'absorption FTIR (cm^{-1}) des polypeptides du PSII incorporés dans des vésicules de phosphatidylglycérol: effet du MgCl_2

Tentative d'attribution des bandes	Concentration de MgCl_2 en mM					
	0	2	4	6	8	10
Région des étirements C-H		Fréquence en cm^{-1}				
Amide A	3280	3291	3291	3291	3291	3295
Amide B	3060	3060	3063	3064	3064	3064
Élongation = C-H	3009	3009	3009	3009	3009	3009
CH ₃ asymétrique	2955	2955	2955	2955	2955	2955
CH ₂ antisymétrique	2923	2919	2923	2919	2923	2923
CH ₃ symétrique	2868	2868	2872	2870	2870	2870
CH ₂ symétrique a	2849 2422	2849 -----	2849 2332	2849 2332	2849 2329	2849 2329

^a Voir note (a) dans tableau 5.1.

Tableau 5.3b Bandes d'absorption FTIR (cm^{-1}) des polypeptides du PSII incorporés dans des vésicules de phosphatidylglycérol: effet du MgCl_2

Tentative d'attribution des bandes	Concentration de MgCl_2 en mM					
	0	2	4	6	8	10
Région de 1900 à 900 cm^{-1}		Fréquence en cm^{-1}				
Étirement de C=O	1739	1739	1739	1737	1739	1739
Amide I (C=O)	1657	1657	1657	1655	1655	1657
Amide II repliement (N-H)	1547	1547	1547	1547	1549	1547
Résidu tyrosine	1521	1520	1521	1520	1521	1520
a	1490	1490	1491	1491	1490	1490
Cisaillement du groupe CH_2	1467	1467	1465	1465	1465	1465
Déformation asymétrique du groupe CH_3	1457	1457	1459	1459	1459	1459
a	1441	1441	1441	1441	1441	1441
Déformation du groupe CH_2	1422	1420	1418	1418	1418	1418
Déformation asymétrique du groupe CH_3	1378	1377	1378	1378	1378	1378
a	1367	1368	1367	1367	1368	1367
Balancement des CH_2	1343	1343	1343	1343	1343	1343
a	1283	1284	1284	1284	1284	1284
Étirement du phosphate antisymétrique ($\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$)	1216	1241	1243	1248	1245	1249
Élongation antisymétrique C-O-C	1172	1171	1173	1173	1174	1174
a	1151	----	1144	1139	1143	1144
Étirement du phosphate symétrique ($\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$)	1093	1106	1109	1110	1117	1117
C-O-P-O-C	1063	1063	1068	1064	1071	1070
Élongation O-H du phosphate	----	----	1058	1055	1059	1051
Élongation P-O du phosphate-ester						

^a Voir note (a) dans tableau 5.1.

chaînes ns_1 et ns_2 . Tout se passe comme si la liaison avec les polypeptides empêcherait toute intervention des cations divalents au niveau de cette région interfaciale et que la formation de liaison hydrogène avec les groupements carbonylés ne peut s'effectuer. Ceci pourrait être l'indication d'une liaison lipide-protéine au niveau du carbonyle de l'ester $-C=O$ du phospholipide. Le mode de vibration de l'amide I subit un déplacement de 7 cm^{-1} lorsque les polypeptides sont complexés avec le phospholipide en absence de $MgCl_2$, (voir tableau 5.1 et 5.3b). Il n'y aura plus aucune modification de fréquence de vibration de cet amide I sous l'action de $MgCl_2$. Il en est de même pour l'amide II qui reste stable quelque soit la concentration de $MgCl_2$ ajouté. Au niveau de la déformation du groupement CH_3 , on s'aperçoit de l'apparition d'une bande à 1441 cm^{-1} inexistante dans le phospholipide seul et la disparition du pic à 1386 cm^{-1} présent dans les polypeptides pris séparément. Ces bandes n'ont pas pu être attribuées (voir note (a) dans tableau 5.1). La région de la tête polaire du complexe PSII-PGV comportant le phosphate antisymétrique à 1216 cm^{-1} et le phosphate symétrique à 1093 cm^{-1} reste identique à celle du phospholipide lorsque le milieu ne contient pas de chlorure de magnésium (voir tableau 5.3b). Cette région phosphate subira d'importantes modifications de la forme des bandes qui s'y trouvent. Alors que le $\nu_{as}PO_2^-$ dans le phospholipide seul présente une subdivision du pic 1216 cm^{-1} en 1261 et 1252 cm^{-1} en présence de 10 mM de

MgCl_2 , le complexe PSII-PGV montre une seule et unique bande qui augmente de fréquence pour atteindre un maximum de 1249 cm^{-1} lorsque la concentration de MgCl_2 est de 10 mM . On n'atteint pas la valeur maximum de 1261 ou 1252 cm^{-1} que l'on obtient avec le phospholipide seul (voir tableau 5.3b). Quant au $\nu_s \text{PO}_2^-$ à 1093 cm^{-1} , il y a une augmentation de sa fréquence de vibration qui va atteindre 1117 cm^{-1} lorsque la concentration de Mg^{2+} est de 10 mM . Dans ce cas, on a un déplacement supérieur à celui obtenu dans le PG seul mais cette bande apparaît beaucoup moins nette dans le complexe PSII-PGV. Les pics intermédiaires entre $\nu_{as} \text{PO}_2^-$ et $\nu_s \text{PO}_2^-$ qui sont très identifiables dans le PG en présence de Mg^{2+} , restent passablement définis dans le cas de PSII-PGV.

5.5 Conclusion.

Dans l'étude des polypeptides du PSII, les spectres FTIR présentent une variation de fréquence de vibration des amides A et B sous l'effet de Mg^{2+} . Ce qui laisse supposer une modification de la structure hélicoïdale des polypeptides (voir Doyle et coll. 1975, Tu 1982, Parker 1983). Ces cations divalents provoquent également des variations de fréquence de l'amide I et de l'amide II, ce qui suggère qu'ils seraient probablement liés au groupement carbonyle de la protéine en affaiblissant les liaisons hydrogène existantes, et par conséquent, les polypeptides subiraient une modification de

la conformation d'hélice α . Ce résultat confirme les travaux de Glaeser et coll. (1991) qui démontrent que les changements des bandes d'amide I et II indiquent une modification de la conformation hélicoïdale. D'autre part, l'utilisation de l'oxyde de deutérium devrait provoquer un déplacement de bandes vers les basses fréquences (voir Mantsch 1984) et une réduction importante de l'intensité de l'amide II (voir Jackson et coll. 1991). Mais le fait que ces bandes ne diffèrent pas significativement de celles obtenues dans l'oxyde d'hydrogène (voir, Parker 1983, He et coll. 1991), nous amène à supposer un effet minimum du milieu d'incubation. Ceci serait alors une bonne indication d'une déshydration incomplète de nos échantillons, c'est-à-dire un échange hydrogène-deutérium relativement limité (voir Jackson et coll. 1991), évitant ainsi une modification structurale de notre préparation.

Dans le cas des phospholipides, nous avons observé d'importantes modifications spectrales surtout au niveau des modes d'étirement du carbonyle de l'ester et du groupement phosphate. Le carbonyle de l'ester présente en fonction de la concentration de $MgCl_2$ un déplacement relativement faible de fréquence mais un dédoublement de bande qui suggèrent une interaction entre $MgCl_2$ et $-C=O$ par l'intermédiaire de molécules d'eau ou de groupements OH du glycérol du PG qui permettent la formation de liaisons hydrogène (voir Mushayakarara et coll. 1982, Blume et coll. 1988, Choi et coll. 1991). Les

changements les plus drastiques s'observent au niveau du groupement phosphate qui présente un important déplacement vers les hautes fréquences, un dédoublement et un rétrécissement de bandes. Ces importants changements nous laisse supposer une interaction des cations dans l'environnement des phosphates antisymétrique et symétrique, interaction qui tend à immobiliser le groupement phosphate (voir Choi et coll. 1991) et qui nécessite une énergie de vibration plus importante.

Le complexe PSII-PGV présente quant à lui, une variation vers les hautes fréquences pour l'amide A ainsi qu'une diminution importante de son intensité, ce qui signifierait une modification de la structure hélicoïdale. Par contre, la vibration du carbonyle du phospholipide ne change pas sous l'effet du sel, ce qui suggère une liaison des polypeptides au niveau de l'ester de carbonyle du PG. Quant aux vibrations de l'amide I, la complexation des polypeptides avec le phospholipide provoque déjà ce déplacement de pics vers les hautes fréquences (1650 cm^{-1} pour le PSII seul et 1657 cm^{-1} pour le PSII-PGV) et par conséquent, l'effet de sel ne s'observe plus. Enfin, nous pouvons noter que les polypeptides du PSII auraient également un effet sur les groupements phosphates et que l'action des cations sur ces derniers se ferait à travers les polypeptides.

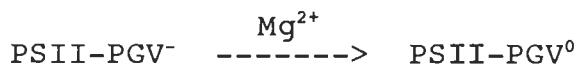
CHAPITRE VI

CONCLUSION GENERALE.

Dans notre travail concernant l'effet des lipides sur l'activité de dégagement d'oxygène dans les particules de PSII, nous avons montré que le phosphatidylglycérol est un lipide qui participe à la stimulation de l'activité et à la cryoprotection des membranes de PSII. Ce lipide protège également les particules de PSII contre l'effet inhibiteur des milieux acide et alcalin (voir Nénonéné et Fragata 1990). Dans leurs investigations en 1984, Akabori et coll. démontrent une augmentation du dégagement d'oxygène dans les particules de PSII reconstituées dans des membranes composées de lipides totaux des thylacoïdes. Nos travaux viennent confirmer ces résultats et prouvent que parmi les lipides des thylacoïdes, le PG joue un rôle fonctionnel très important dans l'activité de dégagement d'oxygène (Fragata et coll. 1990b, Nénonéné et Fragata 1990). Il est important de mentionner que la réduction du taux de phospholipides (Siegenthaler et coll. 1987b, Horváth et coll. 1989) ou encore son excès dans les membranes des thylacoïdes (Siegel

et coll. 1981, Millner et coll. 1983) peuvent avoir un effet néfaste sur le transport d'électrons. Le contenu des thylacoïdes en phospholipides devrait donc se situer dans un intervalle restreint pour optimiser l'effet du flux d'électrons sur le dégagement d'oxygène. L'activité des particules de PSII se trouve ainsi étroitement liée au rapport lipide/protéine (voir Fragata et coll. 1991). Il est à noter que l'addition de lipides exogènes en excès provoque une séparation spatiale des complexes polypeptidiques de la membrane et une diminution de la concentration des composés de faible poids moléculaire solubles dans les membranes. Cet excès de phospholipides a pour effet fonctionnel une importante inhibition du transport d'électrons entre les deux photosystèmes (Millner et coll. 1983) et provoque par conséquent une diminution de l'activité de dégagement d'oxygène dans les particules de PSII (Fragata et coll. 1991). D'autre part, l'activité optimale des membranes de PSII est liée à la formation des grana (Duval et coll. 1979, Dubacq et Trémolières 1983, Farineau et coll. 1984) et le PG grâce à sa chaîne spéciale (l'acide trans-3-hexadécanoïque) est capable de promouvoir l'empilement des thylacoïdes qui s'observe par l'agrégation des vésicules lipidiques de PG lorsque l'on ajoute des cations divalents (Mg^{2+}) au milieu réactionnel. Les résultats de Siegenthaler et coll. 1987a qui prouvent que 70 % de la composition de PG des thylacoïdes se trouve dans la membrane externe alors que seulement 30 % se situerait

dans le feuillet interne (voir tableau 1.1), seraient un outil important dans l'interprétation de l'empilement des thylacoïdes. Bien que l'on peut remarquer une proportion importante de PCh dans le feuillet externe de la membrane (60 %) par rapport au feuillet interne (40 %), les vésicules constituées uniquement de PCh ne s'agrègent pas dans la limite de concentration des cations divalents (Mg^{2+}) utilisés, en raison de la répulsion stérique entre les membranes (McIntosh et coll. 1987). Par contre, celles formées par un mélange de PG et PCh s'agrègent (voir Fig. 6.1). Le rôle du PG dans la formation de grana et dans l'activité de dégagement d'oxygène dépend alors de la présence de cations divalents (Mg^{2+}) qui viennent neutraliser les charges de surface des vésicules de PG et provoquent le rapprochement des membranes des thylacoïdes. Le phénomène d'agrégation est donc à l'origine de l'augmentation de l'activité des particules de PSII (voir Fragata et coll. 1991) et il devient évident que l'activité optimale nécessite une surface membranaire neutre. Nos résultats en spectroscopie FTIR viennent appuyer cette affirmation de neutralisation de charges de surface effectuée par les cations Mg^{2+} qui peut se résumer à l'équilibre par l'équation suivante:



dans laquelle $PSII-PGV^-$ est la forme la moins active (charge

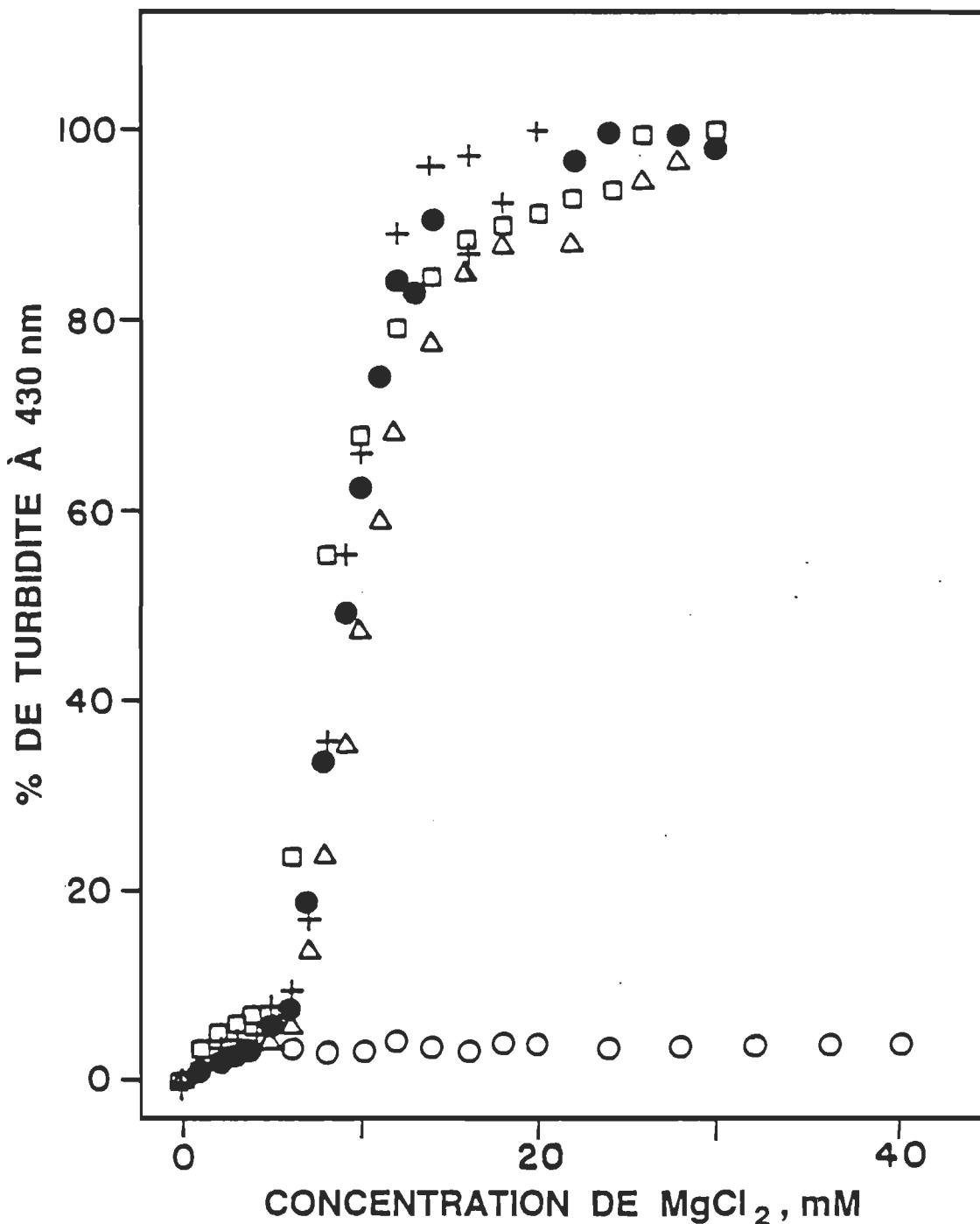


Figure 6.1. Effet de $MgCl_2$ sur la turbidité des vésicules lipidiques constituées de: (◻) PG seul; (+) PG/PCh (3 mole/mole); (●) PG/PCh (1 mole/mole); (Δ) PG/PCh (0.33 mole/mole) et (○) PCh seul.

nette négative) et PSII-PGV⁰, la forme la plus active (charge neutre) des complexes lipide-protéine du PSII. La spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier s'avère un outil très important pour élucider les changements d'hélicité qui se produisent au niveau des polypeptides des thylacoïdes. Au cours de leur complexation avec des cations divalents, et/ou avec le phosphatidylglycérol, les complexes Chl-protéines de l'appareil photosynthétique subissent des changements de conformation qui sont détectables par la variation des fréquences de vibration des bandes amide. L'infrarouge nous permet aussi de déceler les points d'interaction entre le PG et le PSII et les résultats obtenus montrent que le site actif du complexe de dégagement d'oxygène du PSII est localisé au niveau de la surface des vésicules lipidiques formées avec le phosphatidylglycérol.

BIBLIOGRAPHIE.

- Akabori, K., Imaoka, A. & Toyoshima, Y. The role of lipids and 17-kDa protein in enhancing the recovery of O₂ evolution in cholate-treated thylakoid membranes. FEBS Lett. 1984, 173, 36-40.
- Albertsson, P-Å., Andreasson, E., Svensson, P. & Yu, S-G. Localization of cytochrome f in thylakoid membrane: evidence for multiple domains. Biochim. Biophys. Acta 1991, 1098, 90-94.
- Allen, J.F. How does protein phosphorylation regulate photosynthesis? Trends Biochem. Sci. 1992, 17, 12-17
- Anderson, J.M. & Melis, A. Heterogeneity of photosystem II in spinach thylakoids. Dans: The oxygen evolving system of photosynthetics, Inoue Y., Crofts A.R., Govindjee, Murata N., Renger G., Satoh K. (eds), Academic Press, London, New York, 1983, pp. 273-280.
- Anderson, J.M. & Andersson, B. The dynamic photosynthetic membrane and regulation of solar energy conversion. Trends Biochem. Sci. 1988, 13, 351-355.
- Andersson, B., Critchley, C., Ryrie, I.J., Jansson, C., Larsson, C. & Anderson, J.M. Modification of the chloride requirement for photosynthetic O₂ evolution. The role of the 23 kDa polypeptide. FEBS Lett. 1984, 168, 113-117.
- Andersson, B. Proteins participating in photosynthetic water oxidation. Dans: Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Edité par L.A. Staehelin et C.J. Arntzen, Springer-Verlag, Berlin, vol. 19, 1986, 447-456.
- Arnon, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts: Polyphenyloxidase in beta vulgaris. Plant Physiol. 1949, 14, 1-15.
- Arnon, D.I. Photosynthetic CO₂ assimilation by chloroplasts: assertion, refutation, discovery. Trends Biochem. Sci. 1987, 12, 39-42.

- Arntzen, C.J. & Pakrasi, H.B. Photosystem II reaction center: polypeptide subunits and functional cofactors. Dans: Encyclopedia of Plant Physiology, New series, Edité par L.A. Staehelin et C.J. Arntzen, Springer-Verlag, Berlin, vol. 19, 1986, pp. 457-467.
- Arrondo, J.L.R., Goñi, F.M. & Macarulla, J.M. Infrared spectroscopy of phosphatidylcholines in aqueous suspension: a study of phosphate group vibrations. Biochim. Biophys. Acta 1984, 794, 165-168.
- Barber, J., Chow, W.S., Scoufflaire, S. & Lannerye, R. Relationship between thylakoid stacking and salt induced chlorophyll fluorescence changes. Biochim. Biophys. Acta 1980, 591, 92-103.
- Barber, J. Surface electrical charges and protein phosphorylation. Dans: Encyclopedia of Plant Physiology, New series, Edité par L.A. Staehelin et C.J. Arntzen, Springer-Verlag, Berlin, vol. 19, 1986, pp. 653-664.
- Barber, J. Photosynthetic reaction centres: a common link. Trends Biochem. Sci. 1987, 12, 321-326.
- Beauregard, M. & Popovic, R. Removal of 23 and 18 kDa extrinsic polypeptides by sulfate in photosystem II particles. J. Plant Physiol. 1988, 133, 615-619.
- Bellamy, L.J. The infrared spectra of complex molecules. Troisième édition, Publié par Chapman et Hall Ltd, Halsted Press, New York, 1975.
- Bendit, E.G. Infrared absorption of tyrosine side chains in proteins. Biopolymers 1967, 5, 525-533.
- Berthold, D.A., Babcock, G.T. & Yocum, C.F. A highly resolved oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes. FEBS Lett. 1981, 134, 231-234.
- Blume, A., Hübner, W. & Messner, G. Fourier transform infrared spectroscopy of $^{13}\text{C}=\text{O}$ -labeled phospholipids hydrogen bonding to carbonyl groups. Biochemistry 1988, 27, 8239-8249.
- Butler, W.L. & Matsuda, H. Possible role of cytochrome b_{559} in photosystem II. Dans: The oxygen evolving system of photosynthesis, Inoue Y., Crofts A.R., Govindjee, Murata N., Renger G., Satoh K. (eds), Academic Press, London, New York, 1983, pp. 113-122.

- Camefort, H. Morphologie des végétaux vasculaires, Paris, Dorin Editeurs, 1972.
- Camm, E.L. & Green, B.R. Fractionation of thylakoid membranes with the nonionic detergent octyl- β -D-glucopyranoside. Plant Physiol. 1980, 66, 428-432.
- Camm, E.L. & Green B.R. Isolation of PSII reaction centre and its relationship to the minor chlorophyll-protein complexes. J. Cell. Biochem. 1983, 23, 171-179.
- Camm, E.L. & Green, B.R. Evidence that CP47 (CPa-1) is the reaction centre of photosystem II. Dans: Advances in Photosynthesis Research, Sybesma, C. (ed), M. Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, The Hague/Boston/Lancaster, vol. 2, 1984, pp. 95-98.
- Carpentier, R. & Nakatani, H.Y. Inhibitors affecting the oxidizing side of photosystem II at the Ca^{2+} - and Cl^- -sensitive sites. Biochim. Biophys. Acta 1985, 808, 288-292.
- Casal, H.L., Mantsch, H.H. & Hauser, H. Infrared and ^{31}P -NMR studies of the interaction of Mg^{2+} with phosphatidylserines: effect of hydrocarbon chain unsaturation. Biochim. Biophys. Acta 1989, 982, 228-236.
- Casey, L.J. & Sauer, K. EPR detection of a cryogenically photogenerated intermediate in photosynthetic oxygen evolution. Biochim. Biophys. Acta 1984, 767, 21-28.
- Chapados, C., Lemieux, S. & Carpentier, R. Protein and chlorophyll in photosystem II probed by infrared spectroscopy. Biophys. Chem. 1991, 39, 225-239.
- Chen, S-Y & Cheng, K.H. Infrared and time-resolved fluorescence spectroscopic studies of the polymorphic phase behavior of phosphatidylethanolamine/diacylglycerol lipid mixtures. Chem. Phys. Lipids 1990, 56, 149-158.
- Choi, S., Ware Jr., W., Lauterbach, S.R. & Phillips, W.M. Infrared spectroscopic studies on the phosphatidylserine bilayer interacting with calcium ion: effect of cholesterol. Biochemistry 1991, 30, 8563-8568.
- Chow, W.S., Miller, C. & Anderson, J.M. Surface charges, the heterogeneous lateral distribution of the two photosystems, and thylakoid stacking. Biochim. Biophys. Acta, 1991, 1057, 69-77.

- Chua, N-H. Electrophoretic analysis of chloroplast proteins. Methods in Enzymology 1980, 69, 434-446.
- Coleman, W.J. & Govindjee. A model for the mechanism of chloride activation of oxygen evolution in photosystem II. Photosynth. Res. 1987, 13, 199-223.
- Critchley, C., Baianu, I.C., Govindjee, & Gutowsky, H.S. The role of chloride in O_2 evolution by thylakoids from salt-tolerant higher plants. Biochim. Biophys. Acta 1982, 682, 436-445.
- Critchley, C. Further studies on the role of chloride in photosynthetic O_2 evolution in higher plants. Biochim. Biophys. Acta 1983, 724, 1-5.
- Critchley, C. The role of chloride in photosystem II. Biochim. Biophys. Acta 1985, 811, 33-46.
- Damoder, R., Klimov, V.V. & Dismukes G.C. The effect of Cl^- depletion and X^- reconstitution on oxygen-evolution rate, the yield of the multiline manganese EPR signal and EPR Signal II in the isolated photosystem-II complex. Biochim. Biophys. Acta 1986, 848, 378-391.
- Day, E.P., Kwok, A.Y.W., Hark, S.K., Ho, J.T., Vail, W.J., Bentz, J. & Nir, S. Reversibility of sodium-induced aggregation of sonicated phosphatidylserine vesicles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1980, 77, 4026-4029.
- Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R. & Michel, H. X-Ray structure analysis of a membrane protein complex. J. Mol. Biol. 1984, 180, 385-398.
- Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R. & Michel, H. Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction center of *Rhodopseudomonas Viridis* at 3 Å resolution. Nature 1985, 318, 618-624.
- Delieu, T. & Walker, D.A. An improved cathode for the measurement of photosynthetic oxygen evolution by isolated chloroplasts. New Phytol. 1972, 71, 201-225.
- Diner, B. The reaction center of photosystem II. Dans: Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Edité par L.A. Staehelin et C.J. Arntzen, Springer-Verlag, Berlin, vol. 19, 1986, 422-436.

Dluhy, R.A., Cameron, D.G. Mantsch, H.H. & Mendelsohn, R. Fourier transform infrared spectroscopic studies of the effect of calcium ions on phosphatidylserine. Biochemistry 1983a, 22, 6318-6325.

Dluhy, R.A., Mendelsohn, R., Casal, H.L. & Mantsch, H.H. Interaction of dipalmitoylphosphatidylcholine and dimyristoylphosphatidylcholine-d₅₄ mixtures with glycophorin. A Fourier transform infrared investigation. Biochemistry 1983b, 22, 1170-1177.

Dong, A., Huang, P. & Caughey, W.S. Protein secondary structures in water from second-derivative amide I infrared spectra. Biochemistry 1990, 29, 3303-3308.

Doyle, B.B., Bendit, E.G. & Blout, E.R. Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides. Biopolymers 1975, 14, 937-957.

Dubacq, J.P. & Trémolières, A. Occurrence and function of phosphatidylglycerol containing Δ_5 -trans-hexadecenoic acid in photosynthetic lamellae. Physiol. Vég. 1983, 21, 293-312.

Duval, J.C., Trémolières, A. & Dubacq, J.P. The possible role of transhexadecenoic acid and phosphatidylglycerol in light reactions of photosynthesis. FEBS Lett. 1979, 106, 414-418.

Eaton-Rye, J.J. & Murata, N. Evidence that amino-terminus of the 33 kDa extrinsic protein is required for binding to the photosystem II complex. Biochim. Biophys. Acta 1989, 977, 219-226.

Eklund, K.K., Takkunen, J.E. & Kinnunen, P.K.J. Cation-induced aggregation of acidic phospholipid vesicles: the role of fatty acid unsaturation and cholesterol. Chemistry and Physics of lipids 1991, 57, 59-66.

Farineau, N., Guillot-Salomon, T., Tuquet, C. & Farineau, J. Association of polar lipids to spinach subchloroplast fractions evolving oxygen. Photochem. Photobiol. 1984, 40, 387-390.

Fookson J.E. & Wallach, D.F.H. Structural differences among phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, and mixed phosphatidylcholine/phosphatidylethanolamine multilayers: an infrared absorption study. Arch. Biochem. Biophys. 1978, 189, 195-204.

- Ford, R.C. & Evans, M.C.W. Isolation of a photosystem II preparation from higher plants with highly enriched oxygen evolution activity. FEBS Lett. 1983, 160, 159-164.
- Fragata, M., Popovic, R., Camm, E.L. & Leblanc, R.M. Pheophytin-mediated energy storage of photosystem II particles detected by photoacoustic spectroscopy. Photosynth. Res. 1987, 14, 71-80.
- Fragata, M., Nénonéné, E.K., Bellemare, F., Champagne, N. & Dupont, I. Characterization of oxygen evolution activity of low molecular mass photosystem II preparation from barley and spinach isolated by gel chromatography. Photosynthetica 1990a, 24, 249-256.
- Fragata, M., Nénonéné, E.K. & Bernier, F. Phosphatidylglycerol effect on oxygen evolution of photosystem II particles from barley chloroplasts. Dans: Current Research in Photosynthesis, M. Baltscheffsky (ed.), Kluwer, Dordrecht, vol. 1, 1990b, 945-948.
- Fragata, M., Strzalka, K. & Nénonéné, E.K. MgCl₂-induced reversal of oxygen evolution decay in photosystem II particles incubated with phosphatidylglycerol vesicles at high lipid/PSII ratio. J. Photochem. Photobiol., 1991, 11, 329-342.
- Fringeli, U.P. & Günthard, Hs.H. Infrared membrane spectreoscopy. Dans: Membrane spectroscopy, Edité par E. Grell, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, vol. 31, 1981, pp. 270-332.
- Gennis, R.B. Biomembranes: molecular structure and function. Edité par C.R. Cantor, Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidleberg, 1989.
- Genzel, L., Santo, L. & Shen, S.C. Far-infrared spectroscopy of biomolecules. Dans: Spectroscopy of biological molecules, C. Sandorfy et T. Theophanides (eds), D. Reidel Publishing Company, 1984, pp. 609-619.
- Ghanotakis, D.F., Babcock, G.T. & Yocum, C.F. Calcium reconstitutes high rates of oxygen evolution in polypeptide depleted photosystem II preparations. FEBS Lett. 1984a, 167, 127-130.
- Ghanotakis, D.F., Topper, J.N., Babcock, G.T. & Yocum, C.F. Water-soluble 17 and 23 kDa polypeptides restore oxygen evolution activity by creating a high-affinity binding site for Ca²⁺ on the oxidizing side of photosystem II. FEBS Lett. 1984b, 170, 169-173.

Ghanotakis, D.F., Babcock, G.T. & Yocum, C.F. On the role of water-soluble polypeptides (17, 23 kDa), calcium and chloride in photosynthetic oxygen evolution. FEBS Lett. 1985, 192, 1-3.

Ghanotakis, D.F. & Yocum, C.F. Polypeptides of photosystem II and their role in oxygen evolution. Photosynthesis Res. 1985, 7, 97-114.

Ghanotakis, D.F., Demetriou, D.M. & Yocum, C.F. Isolation and characterization of an oxygen-evolving photosystem II reaction center core preparation and a 28 kDa Chla-binding protein. Biochim. Biophys. Acta 1987, 891, 15-21.

Ghanotakis, D.F. & Yocum, C.F. Photosystem II and the oxygen-evolving complex. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1990, 41, 255-276.

Glaeser, R.M., Downing, K.H. & Jap, B.K. What spectroscopy can still tell us about the secondary structure of bacteriorhodopsin. Biophys. J. 1991, 59, 934-938.

Golbeck, J.H. Structure, function and organization of photosystem I reaction center complex. Biochim. Biophys. Acta 1987, 895, 167-204.

Gounaris, K., Whitford, D., & Barber, J. The effect of thylakoid lipids on an oxygen-evolving photosystem II preparation. FEBS Lett. 1983, 163, 230-234.

Gounaris, K., Pick, U. & Barber, J. The effect of thylakoid lipids on enzymatic activity and ultrastructure of membrane protein complexes. Dans: Structure, Function and Metabolism of Plant Lipids, P-A Siegenthaler et W. Eichenberger, éditeurs, Elsevier Science Publishers B.V., 1984, 451-455.

Gounaris, K. & Barber, J. Isolation and characterization of a photosystem II reaction centre lipoprotein complex. FEBS Lett. 1985, 188, 68-72.

Graham, H.C. & Williams, R.J.P. The roles of ADP²⁻ and Mg²⁺ in control steps of phosphoglycerate kinase. Eur. J. Biochem. 1991, 197, 81-91.

Gregory, R.P.F. Biochemistry of Photosynthesis, Troisième édition, A. Wiley Inter Science Publication, John Wiley et Sons, 1989, pp. 98-121.

Hames, B.D. An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. Dans: Gel electrophoresis of proteins; A practical approach, Edité par B.D. Hames et D. Rickwood, Publié dans Practical Approach Series, IRL Press, Oxford, Washington DC, 1981, 1-91.

Hansson, Ö. & Wydrzynski, T. Current perceptions of photosystem II. Photosynthesis Res. 1990, 23, 131-162.

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

Hitchcock, P.B., Mason, R., Thomas, K.M. & Shipley, G.G. Structural chemistry of 1,2 dilauroyl-DL phosphatidyl-ethanolamine: molecular conformation and intermolecular packing of phospholipids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1974, 71, 3036-3040.

Holden, M. Chlorophylls. Dans: Chemistry and Biochemistry of Plant pigments, T. Goodwin ed., vol 2, Seconde éd., Academic Press, London, New York, 1976, pp. 1-37.

Homann, P.H. The association of functional anions with the oxygen-evolving center of chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 1985, 809, 311-319.

Homann, P.H. The relation between the chloride, calcium and polypeptide requirement of photosynthetic water oxidation. J. Bioenerg. Biomembr. 1987, 19, 105-123.

Homann, P.H. The chloride and calcium requirement of photosynthetic water oxidation: effects of pH. Biochim. Biophys. Acta 1988a, 934, 1-13.

Homann, P.H. Structural effects of Cl⁻ and other anions on the water oxidizing complex of chloroplast photosystem II. Plant Physiol. 1988b, 88, 194-199.

Horváth, G., Melis, A., Hideg, E., Droppa, M. & Vigh, L. Role of lipids in the organization and function of photosystem II studied by homogeneous catalytic hydrogenation of thylacoid membranes in situ. Biochim. Biophys. Acta 1987, 891, 68-74.

- Horváth, G., Droppa, M., Hideg, E., Rózsa, Z. & Farkas, T. The role of phospholipids in regulating photosynthetic electron transport activities: treatment of chloroplasts with phospholipase A₂. J. Photochem. Photobiol. 1989, 3, 515-527.
- Huang, C. Studies on phosphatidylcholine vesicles: Formation and physical characteristics. Biochemistry 1969, 8, 44-352.
- Huner, N.P.A., Krol, M., Williams, J.P., Maissan, E., Low, P.S., Roberts, D. & Thomson, J.E. Low temperature development induces a specific decrease in trans-3-hexadecenoic acid content which influences LHCII organization. Plant Physiol. 1987, 84, 12-18.
- Ikegami, I. & Itoh, S. Chlorophyll organization in P700-enriched particles isolated from spinach chloroplasts. CD and absorption spectroscopy. Biochim. Biophys. Acta 1986, 851, 75-85.
- Ikegami, I. & Itoh, S. Absorption spectroscopy of P700-enriched particles isolated from spinach. Is P700 a dimer or a monomer? Biochim. Biophys. Acta 1988, 934, 39-46.
- Ikeuchi, M., Yuasa, M. & Inoue, Y. Simple and discrete isolation of an O₂-evolving PSII reaction center complex retaining Mn and the extrinsic 33 kDa protein. FEBS Lett. 1985, 185, 316-322.
- Ikeuchi, M. & Inoue, Y. Characterization of O₂ evolution by a wheat photosystem II reaction center complex isolated by a simplified method: Disjunction of secondary acceptor quinone and enhanced Ca²⁺ demand. Arch. Biochem. Biophys. 1986, 247, 97-107.
- Iordanov, I.T. & Goltsev, V.N. Regulation of photosynthesis at the level of phosphorylation of the light-harvesting complex and photophosphorylation. Photosynthetica 1987, 21, 236-250.
- Jackson, M., Haris, P.I. & Chapman, D. Fourier transform infrared spectroscopic studies of Ca²⁺-binding proteins. Biochemistry 1991, 30, 9681-9686.
- Jansson, C. Proteins involved in photosynthetic oxygen evolution: Isolation and characterization. Dans: Advances in Photosynthetic Research, Sybesma, C., (ed), M. Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, The Hague/Boston/Lancaster, vol. 1, 1984, pp. 375-378.

Jordan, B.R. The function of acyl-lipids in chloroplast thylakoid membranes. Dans: Structure, Function and Metabolism of Plant Lipids, Siegenthaler, P-A, et W. Eichenberger (eds.), Elsevier Science Publishers, 1984, pp. 443-450.

Kennedy, D.F., Slotboom, A.J., de Haas, G.H. & Chapman, D. A Fourier transform infrared spectroscopic (FTIR) study of porcine and bovine pancreatic phospholipase A₂ and their interaction with substrate analogues and a transition-state inhibitor. Biochim. Biophys. Acta 1990, 1040, 317-326.

Krimm, S. & Bandekar, J. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. Dans: Advances in Protein Chemistry, Edité par C.B. Anfinsen, J.T. Edsall et F.M. Richards. Academic Press Inc., Orlando, San Diego, New York, vol. 38, 1986, pp. 181-364.

Kuwabara, T. & Murata, N. Inactivation of photosynthetic oxygen evolution and concomitant release of three polypeptides in the photosystem II particles of spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiol. 1982, 23, 533-539.

Kuwabara, T. & Murata, N. Quantitative analysis of the inactivation of photosynthetic oxygen evolution and the release of polypeptides and manganese in the photosystem II particles of spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiol. 1983, 24, 741-747.

Kuwabara, T. & Murata, N. Chemical and physicochemical characterization of proteins involved in the oxygen evolution system. Dans: Advances in Photosynthetic Research, Sybesma, C., (ed), M. Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, The Hague/Boston/Lancaster, vol. 1, 1984, pp. 371-374.

Kuwabara, T., Murata, T., Miyao, M. & Murata, N. Partial degradation of 18-kDa protein of the photosynthetic oxygen-evolving complex: a study of a binding site. Biochim. Biophys. Acta 1986, 850, 146-155.

Kyle, D.J., Kuang, T-Y., Watson, J.L. & Arntzen C.J. Movement of a sub-population of light harvesting complex (LHC_{II}) from grana to stroma lamellae as a consequence of its phosphorylation. Biochim. Biophys. Acta 1984, 765, 89-96.

Lagoutte, B. & Mathis, P. The photosystem I reaction center: Structure and photochemistry. Photochem. Photobiol. 1989, 49, 833-844.

- Lam, E., Baltimore, B., Ortiz, W., Chollar, S., Melis, A. & Malkin, R. Characterization of a resolved oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoids. Biochim. Biophys. Acta 1983, 724, 201-211.
- Lamba, O.M., Lal, S., Yappert, C.M., Lou, M.F. & Borchman, D. Spectroscopic detection of lipid peroxidation products and structural changes in sphingomyelin model system. Biochim. Biophys. Acta 1991, 1081, 181-187.
- Lehninger, A.L. Biochimie: Bases moléculaires de la structure et des fonctions cellulaires. Worth Publishers, Inc., Flammarion Medecine Sciences, 1981.
- Lockett, C.J., Demetriou, C., Bowden, S.J. & Nugent, J.H.A. Studies on calcium depletion of PSII by pH 8.3 treatment. Biochim. Biophys. Acta 1990, 1016, 213-218.
- Lowry, O.H., Roseborough, N.J., Farr, L. & Randall, R.J. Protein measurement with the folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951, 193, 265-275.
- Lutz, M. & Mäntele, W. Vibrational spectroscopy of chlorophylls. Dans: Chlorophylls, Edité par Hugo Scheer, CRC Press Inc., Boca Raton, Ann Arbor, Boston, London, 1991, 855-902.
- Mantsch, H.H. Fourier transform infrared spectroscopy as probe of biomembrane structure. Dans: Spectroscopy of biological molecules, C. Sandorfy et T. Theophanides (eds), D. Reidel Publishing Company, 1984, pp. 547-561.
- Massicotte, G., Kessler, M., Lynch, G. & Baudry, M. N-methyl-D-aspartate and quisqualate/DL- α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors: Differential regulation by phospholipase C treatment. Molecular Pharmacology, 1989, 37, 278-285.
- McCarthy, R.E. & Nalin, C.M. Structure, mechanism, and regulation of the chloroplast H⁺-ATPase (CF₁-CF₀). Dans: Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Edité par L.A. Staehelin et C.J. Arntzen, Springer-Verlag, Berlin, vol. 19, 1986, 576-583.
- McDonnel, A. & Staehelin, L.A. Adhesion between liposomes mediated by the chlorophyll a/b light-harvesting complex isolated from chloroplast membranes. J. Cell Biol. 1980, 84, 40-56.

McIntosh, T.J., Magid, A.D. & Simon, S.A. Steric repulsion between phosphatidylcholine bilayers. Biochemistry 1987, 26, 7325-7332.

Melis, A. & Ow, R.A. Photoconversion kinetics of chloroplast photosystem I and II. Effect of Mg^{2+} . Biochim. Biophys. Acta 1982, 682, 1-10.

Michel, H. & Deisenhofer, J. X-Ray diffraction studies on a crystalline bacterial photosynthetic reaction center: a progress report and conclusions on the structure of photosystem II reaction centers. Dans: Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Edité par L.A. Staehelin et C.J. Arntzen, Springer-Verlag, Berlin, vol 19, 1986, 371-381.

Millner, P.A., Grouzis, J.P., Chapman, D.J. & Barber, J. Lipid enrichment of thylakoid membranes. I. Using soybean phospholipids. Biochim. Biophys. Acta 1983, 722, 331-340.

Miyao, M. & Murata, N. Partial disintegration and reconstitution of the photosynthetic oxygen evolution system. Binding of 24 kDa and 18 kDa polypeptides. Biochim. Biophys. Acta 1983, 725, 87-93.

Miyao, M. & Murata, N. Calcium ions can be substituted for the 24 kDa polypeptide in photosynthetic oxygen evolution. FEBS Lett. 1984, 168, 118-120.

Miyao, M. & Murata, N. The Cl^- effect on photosynthetic oxygen evolution: interaction of Cl^- with 18-kDa, 24-kDa and 33kDa proteins. FEBS Lett. 1985, 180, 303-308.

Miyao, M. & Murata, N. Photoinactivation of the oxygen-evolving complex of photosystem II. Dans: Photoinhibition, édité par D.J. Kyle, C.B. Osmond et C.J. Arntzen, Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division), 1987, 289-307.

Miyao, M., Murata, N., Lavorel, J., Maison-Peteri, B., Boussac, A. & Etienne, A-L. Effect of the 33-kDa protein on the state transitions in photosynthetic oxygen evolution. Biochim. Biophys. Acta 1987, 890, 151-159.

Miyao, M. & Murata, N. The mode of binding of three extrinsic proteins of 33 kDa, 23 kDa, and 18 kDa in the photosystem II complex of spinach. Biochim. Biophys. Acta 1989, 977, 315-321.

- Murakami, S. & Packer, L. Protonation and chloroplast membrane structure. J. Cell Biol. 1970, 47, 332-351.
- Murata, N., Miyao, M., Omata, T., Matsunami, H. & Kuwabara, T. Stoichiometry of components in the photosynthetic oxygen evolution system of photosystem II particles prepared with Triton X-100 from spinach chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 1984, 765, 363-369.
- Murata, N. & Miyao, M. Extrinsic membrane proteins in the photosynthetic oxygen-evolving complex. Trends Biochem. Sci. 1985, 10, 122-124.
- Murata, N. & Miyao, M. Oxygen-evolving complex of photosystem II in higher plants. Dans: Progress in Photosynthesis Research, Biggens, J. (ed.), Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, vol. 1, 1987, pp. 453-462.
- Murata, N. & Miyao, M. Photosystem II and oxygen evolution. Dans: Photosynthesis, Plant Biology, W.R. Briggs ed., Alan R. Liss Inc., New York, vol. 8, 1989, pp. 59-70.
- Murata, N., Higashi, S-I & Fujimura, Y. Glycerolipids in various preparations of photosystem II from spinach chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 1990, 1019, 261-268.
- Murphy, D.J. & Woodrow, I.E. The lateral segregation model. Dans: Biosynthesis and Function of Plant Lipids. Edité par W.W. Thomson, J.B. Mudd et M. Gibbs. American Society of Plant Physiologists, 1983, pp 104-125.
- Murphy, D.J. The molecular organization of the photosynthetic membranes of higher plants. Biochim. Biophys. Acta 1986a, 864, 33-94.
- Murphy, D.J. Structural properties and molecular organization of the acyl lipids of photosynthetic membranes. Dans: Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Edité par L.A. Staehelin et C.J. Arntzen, Springer-Verlag, Berlin, vol. 19, 1986b, 713-725.
- Mushayakarara, E., Albon, N. & Levin, I.W. Effect of water on the molecular structure of a phosphatidylcholine hydrate. Biochim. Biophys. Acta 1982, 686, 153-159.
- Nabedryk, E. & Breton, J. Orientation of intrinsic proteins in photosynthetic membranes. Polarized infrared spectroscopy of chloroplasts and chromophores. Biochim. Biophys. Acta 1981, 635, 515-524.

- Nabedryk, E., Biaudet, P., Darr, S., Arntzen, C.J. & Breton, J. Conformation and orientation of chlorophyll-proteins in photosystem I by circular dichroism and polarized infrared spectroscopies. Biochim. Biophys. Acta 1984, 767, 640-647.
- Nakatani, H.Y., Arntzen, C.J. & Inoue, Y. Characterization of the photosystem II reaction center polypeptide (CP47). Dans: Advance in Photosynthetic Research, Sybesma C. (ed.), M. Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, The Hague/Boston/Lancaster, vol. 2, 1984, pp. 99-102.
- Nanba, O. & Satoh, K. Isolation of a PSII reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome b-559. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987, 84, 109-112.
- Nelson, N. Structure, function and evolution of proton-ATPases. Plant Physiol. 1988, 86, 1-3.
- Nénonéné, E.K. & Fragata, M. Effect of pH and freeze-thaw on photosynthetic oxygen evolution of photosystem II particles incorporated into phosphatidylglycerol bilayers. J. Plant Physiol. 1990, 136, 615-620.
- Northrup, S.H., Boles, J.O. & Reynolds, J.C.L. Brownian dynamics of cytochrome c and cytochrome c peroxidase association. Science 1988, 241, 67-70.
- Ohki, S., Düzgünes, N. & Leonards, K. Phospholipid vesicle aggregation: effect of monovalent and divalent ions. Biochemistry 1982, 21, 2127-2133.
- O'Malley, P.J. & Babcock, G.T. EPR properties of immobilized quinone cation radicals and the molecular origin of signal II in spinach chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 1984, 765, 370-379.
- Ono, T. & Inoue, Y. Mn-preserving extraction of 33-, 24- and 16-kDa proteins from O₂-evolving PSII particles by divalent salt-washing. FEBS Lett. 1983, 164, 255-260.
- Ono, T. & Inoue, Y. Discrete extraction of the Ca atom functional for O₂ evolution in higher plant photosystem II by a simple low pH treatment. FEBS Lett. 1988, 227, 147-152.
- Ono, T. & Inoue, Y. Removal of Ca by pH 3.0 treatment inhibits S₂ to S₃ transition in photosynthetic oxygen evolution system. Biochim. Biophys. Acta 1989, 973, 443-449.

Ort, D.R. Energy transduction in oxygenic photosynthesis: An overview of structure and mechanism. Dans: Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Edité par L.A. Staehelin et C.J. Arntzen, Springer-Verlag, Berlin, vol 19, 1986, pp. 143-196.

Pachler, K.G.R., Matlok, F. & Gremlich, H-U. Merck FTIR atlas, A collection of FTIR spectra. Edité par Merck, Darmstadt, 1988.

Parker, F.S. Applications of infrared spectroscopy in biochemistry, biology and medecine, 1971, Plenum Press, New York.

Parker, F.S. Applications of infrared, raman and resonance raman spectroscopy in biochemistry, 1983, Plenum Press, New York.

Pearson, R.H. & Pasher, I. The molecular structure of lecithin dihydrate. Nature 1979, 281, 499-501.

Pick, U., Weiss, M., Gounaris, K. & Barber, J. The role of different thylakoid glycolipids in the function of reconstituted chloroplast ATP synthetase. Biochim. Biophys. Acta 1987, 891, 28-39.

Pohle, W. The PO_2^- moiety- a hydrogen bonding acceptor in biological molecules. J. Molecular Structure 1990, 219, 281-286.

Preston, C. & Critchley, C. Ca^{2+} requirement for photosynthetic oxygen evolution of spinach and mangrove photosystem II membrane preparations. FEBS Lett. 1985, 184, 318-322.

Pschorn, R., Rühle, W. & Wild, A. Structure and function of ferrodoxin-NADP $^+$ -oxidoreductase. Photosynthesis Res. 1988, 17, 217-229.

Quinn, P.J. & Williams, W.P. The structural role of lipids in photosynthetic membranes. Biochim. Biophys. Acta 1983, 737, 223-266.

Rand, R.P. Interacting phospholipids bilayers: measured forces and induced structural changes. Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 1981, 10, 277-314.

Rawyler, A. & Siegenthaler, P-A. Role of lipids in function of photosynthetic membranes revealed by treatment with lipolytic acyl hydrolase. Eur. J. Biochem. 1980, 110, 179-187.

Rawyler, A. & Siegenthaler, P-A. Regulation of photosystem I electron flow activity by phosphatidylglycerol in thylakoid membranes as revealed by phospholipase treatment. Biochim. Biophys. Acta 1981, 638, 30-39.

Richardson, J.S. & Richardson, D.C. Principles and patterns of protein conformation. Dans: Prediction of protein structure and the principles of protein conformation, Fasman, G.D. (ed), Plenum Press, New York, London, 1989, 1-98.

Rutherford, A.W. Photosystem II, water-splitting enzyme. Trends Biochem. Sci. 1989, 14, 227-232.

Sandmann, G. & Böger, P. Sites of herbicide inhibition at the photosynthetic apparatus. Dans: Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Edité par L.A. Staehelin et C.J. Arntzen, Springer-Verlag, Berlin, vol. 19, 1986, pp. 95-602.

Sandusky, P.O. & Yocom, C.F. The chloride requirement for photosynthetic oxygen evolution. Analysis of the effects of chloride and other anions on amine inhibition of the oxygen-evolving complex. Biochim. Biophys. Acta 1984, 766, 603-611.

Schechter, E. Biochimie et biophysique des membranes, Masson 1990, Paris, Milan.

Shen, J-R., Satoh, K. & Katoh, S. Calcium content of oxygen-evolving photosystem II preparations from higher plants. Effects of NaCl treatment. Biochim. Biophys. Acta 1988, 933, 358-364.

Siefermann-Harms, D., Ross, J.W., Kaneshiro, K.H. & Yamamoto, H.Y. Reconstitution by monogalactosyldiacylglycerol of energy transfer from light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex to the photosystems in triton X-100 solubilized thylakoids. FEBS Lett. 1982, 149, 191-196.

Siegel, C.O., Jordan, A.E. & Miller, K.R. Addition of lipid to the photosynthetic membrane: effects on membrane structure and energy transfer. J. Cell biol. 1981, 91, 113-125.

Siegenthaler, P-A. & Giroud, C. Transversal distribution of phospholipids in prothylakoid and thylakoid membranes from oat. FEBS Lett. 1986, 201, 215-220.

Siegenthaler, P-A., Rawyler, A. & Giroud, C. Spatial organization and functional roles of acyl lipids in thylakoid membranes. Dans: Metabolism, Structure and Function of plant Lipids, édité par P.K. Stumpf, J.B. Mudd et W.D. Nes, Plenum Publishing corporation, 1987a, pp. 161-168.

Siegenthaler, P-A., Smutny, J. & Rawyler, A. Involvement of distinct populations of phosphatidylglycerol and phosphatidylcholine molecules in photosynthetic electron-flow activities. Biochim. Biophys. Acta. 1987b, 891, 85-93.

Siegenthaler, P-A., Sutter, J. & Rawyler, A. The transmembrane distribution of galactolipids in spinach thylakoid inside-out vesicles is opposite to that found in intact thylakoids. FEBS Lett. 1988, 228, 94-98.

Siegenthaler, P-A., Rawyler, A. & Smutny, J. The phospholipid population which sustains the uncoupled non-cyclic electron flow activity is localized in the inner monolayer of the thylakoid membrane. Biochim. Biophys. Acta 1989, 975, 104-111.

Simpson D.J. & von Wettstein, D. The structure and function of the thylakoid membrane. Carlsberg Res. Commun. 1989, 54, 55-65.

Singleton, W.S., Gray, M., Brown, M.L. & White, J.L. Chromatographically homogeneous lecithin from egg phospholipids. J. Am. Oil Chem. Soc. 1965, 42, 53-56.

Sprague, S.G. & Staehelin, A. Effects of reconstitution method on the structural organization of isolated chloroplast membrane lipids. Biochim. Biophys. Acta 1984, 777, 306-322.

Sprague, S.G., Camm, E.L., Green, B.R. & Staehelin, L.A. Reconstitution of light-harvesting complexes and photosystem II cores into galactolipid and phospholipid liposomes. J. Cell Biol. 1985, 100, 552-557.

Sprague, S.G. Structural and functional consequences of galactolipids on thylakoid membrane organization. J. Bioenerg. Biomemb. 1987, 19, 691-703.

Staehelin, L.A. & Arntzen, C.J. Effects of ions and gravity forces on the supramolecular organization and excitation energy distribution in chloroplast membranes. Dans: Chlorophyll organization and energy transfer in photosynthesis. Ciba Foundation Symposium 61, Excerpta Medica, Amsterdam, 1979, pp.147-175.

- Staehelin, L.A. & Arntzen, C.J. Regulation of chloroplast membrane function: protein phosphorylation changes the spatial organization of membrane components. J. Cell. Biol. 1983, 97, 1327-1337.
- Staehelin, L.A. Chloroplast structure and supramolecular organization of photosynthetic membranes. Dans: Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Edité par L.A. Staehelin et C.J. Arntzen, Springer-Verlag, Berlin, vol. 19, 1986, pp. 1-84.
- Strotman, H. & Bickel-Sandkötter, S. Structure, function and regulation of chloroplast ATPase. Annu. Rev. Plant Physiol. 1984, 35, 97-120.
- Surewicz, W.K. & Mantsch, H.H. New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra. Biochim. Biophys. Acta 1988, 952, 115-130.
- Svensson, P., Andreasson, E. & Albertsson, P-A. Heterogeneity among photosystem I. Biochim. Biophys. Acta 1991, 1060, 45-50.
- Takahashi, Y., Takahashi, M-A. & Satoh, K. Identification of the site of iodide photooxidation in the photosystem II reaction center complex. FEBS Lett. 1986, 208, 347-351.
- Takahashi, M., Mano, J. & Asada, K. Functional structure of oxygen-evolving unit of photosystem II as determined by radiation inactivation. Plant Cell Physiol. 1990, 31, 1191-1198.
- Thornber, J.P. Biochemical characterization and structure of pigment-proteins of photosynthetic organism. Dans: Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Edité par L.A. Staehelin et C.J. Arntzen, Springer-Verlag, Berlin, vol. 19, 1986, pp. 98-142.
- Tollin, G. & Hazzard, J.T. Intra- and intermolecular electron transfer processes in redox proteins. Arch. Biochem. Biophys. 1991, 287, 1-7.
- Tredgold, R.H. The use of synthetic membrane in biophysical research. Advances in Physics, 1977, 26, 79-128.
- Tu, A.T. Raman spectroscopy in biology: Principles and applications. Wiley-Interscience Publication, John Wiley et Sons Inc., New York, Toronto, Singapore, 1982.

Tuquet, C., Guillot-Salomon, T. & Farineau, N. Involvement of phosphatidylglycerol containing trans-3-hexadecenoic acid in photosystem II activity in spinach chloroplasts. Dans: Structure, Function and Metabolism of Plant Lipids, Siegenthaler, P-A. et W. Eichenberger (eds.), Elsevier Science Publishers, 1984, pp 471-474.

Tuquet, C., Guillot-Salomon, T. & Farineau, N. Effects of phospholipase A₂ and alkaline pH on photosystem II particles isolated from spinach chloroplasts. Physiol. Plant. 1986, 67, 620-625.

Waggoner, C.M., Pecoraro, V. & Yocom C.F. Monovalent cations (Na⁺, K⁺, Cs⁺) inhibit calcium activation of photosynthetic oxygen evolution. FEBS Lett. 1989, 244, 237-240.

Watts, A., Harlos, K., Maschke, W. & Marsh, D. Control of the structure and fluidity of phosphatidylglycerol bilayers by pH titration. Biochim. Biophys. Acta 1978, 510, 63-74.

Webb, M.S., Tilcock, C.P.S. & Green B.R. Salt-mediated interactions between vesicles of thylakoid lipid digalatosyldiacylglycerol. Biochim. Biophys. Acta 1988, 938, 323-333.

Webb, M.S. & Green, B.R. Biochemical and biophysical properties of thylakoid acyl lipids. Biochim. Biophys. Acta 1991, 1060, 133-158.

Widger, W.R., Cramer, W.A., Hermodson, M. & Herrmann, R.G. Evidence for a hetero-oligomeric structure of the chloroplast cytochrome b-559. FEBS Lett. 1985, 191, 186-190.

Wilshut, J. Membrane fusion in lipid vesicle systems, an overview. Dans: Membrane Fusion, Edité par Jan Wilshut et Dick Hoekstra, Marcel Dekker Inc., 1991, pp 89-126, New York, Basel, Hong Kong.

Wydrzynski, T., Baumgart, F., MacMillan, F. & Renger, G. Is there a direct chloride cofactor requirement in the oxygen-evolving reactions of photosystem II? Photosynth. Res. 1990, 25, 59-72.

Yamagishi, A. & Katoh, S. A photoactive photosystem II reaction center complex lacking a chlorophyll-binding 40 kilodalton subunit from the thermophilic Cyanobacterium *Synechococcus* SP. Biochim. Biophys. Acta 1984, 765, 118-124.

Yocum, C.F. Calcium activation of photosynthetic water
oxidation. Biochim. Biophys. Acta 1991, 1059, 1-15.