

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC A TROIS-RIVIÈRES

THÈSE PRÉSENTÉE A

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC A TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE DU DOCTORAT EN  
BIOPHYSIQUE

PAR

MARC PURCELL

ÉTUDE COMPARATIVE DE LA LOCALISATION  
TRIDIMENSIONNELLE DES PIGMENTS  
PHOTOSYNTHÉTIQUES ET DE LA DISTRIBUTION DU FLUX  
DES EXCITONS AU SEIN DU PHOTOSYSTÈME I

DÉCEMBRE 1993

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.

A William, ce nouveau petit être qui vient remplir ma vie,

je te dédie ce présent travail

## RÉSUMÉ

Plusieurs principes fondamentaux de la photosynthèse sont extrêmement bien documentés comparativement aux effets des fluctuations environnementales sur la membrane thylacoïdienne et en particulier au niveau du photosystème I (PSI).

Le modèle de l'aspect structurel du photosystème I est très bien défini, en ce sens, un nombre impressionnant de polypeptides et leurs fonctions ont été cernés ces dernières années. Par contre, ce canevas manque de rigueur en ce qui a trait à la localisation et au rôle singulier des **pigments** lors des transferts énergétiques.

Sachant que le photosystème I est plus résistant que le photosystème II (PSII) face aux variations du milieu, il est intéressant de confronter les schèmes bien établis du PSII aux nouveaux concepts présentés dans cette étude.

L'impact de ce type de recherche est important non seulement par l'amélioration des connaissances fondamentales, mais pour une meilleure compréhension du flux des excitons au sein des antennes collectrices de lumière et du complexe du centre réactionnel.

La tactique employée consiste à préparer différents extraits membranaires contenant des antennes pigmentaires de différentes dimensions sans toutefois altérer les protéines présentes. De cette façon, cela nous assure la préservation de l'intégrité fonctionnelle du complexe (vérifiée par la réduction du P-700), tout en comparant le comportement des pigments seulement. Nous avons extrait dans un premier temps le PSI natif, contenant 200 Chl-a/P-700 (**PSI-200**), par la suite, nous l'avons dénué de son antenne, générant ainsi un complexe de 100 Chl-a/P-700 (**PSI-100**), et enfin, nous avons isolé un extrait de seulement 30 Chl-a/P-700 (**PSI-30**) qui nous permettra

d'approfondir les transferts énergétiques au cœur du centre réactionnel. A titre comparatif, nous avons aussi isolé l'antenne collectrice de lumière mobile du PSII (LHC-II).

Les traitements de dégradations sublétale utilisés sont principalement les **fortes illuminations**, et cela en comparant certains aspects des complexes traités à des **températures élevées**.

Ces extraits membranaires nous ont permis d'analyser, sans altérer la composition et l'intégrité fonctionnelle des complexes, la **variabilité des vitesses de photodégradation** des différents pigments photosynthétiques.

Lors du photoblanchiment, nous avons constaté des déplacements du maximum d'absorption de la Chl-a (dans le rouge) vers les plus faibles longueurs d'onde, caractéristique des particules de PSI-200 mais non des PSI-100. Ce constat permet de localiser une forme de Chl-a qui absorbe à des longueurs d'onde élevées (environ 705 nm) dans l'antenne collectrice de lumière du PSI (LHC-I). En utilisant ce même traitement, la photoréduction du centre réactionnel supporte l'idée d'un flux énergétique non-directionnel au sein du PSI. Ce mécanisme aurait un apport important dans la photoprotection du complexe en désengorgeant le P-700 lors de surexcitations.

La chromatographie liquide à haute performance permet de "suivre" la dégradation sélective des différents pigments suite au photoblanchiment, tout en déterminant la localisation des chlorophylles et des différents caroténoïdes, comblant ainsi certaines lacunes dans la littérature. Ces résultats nous ont conduits à spéculer sur le rôle dualiste (antenne et photoprotection) des pigments lors du flux énergétique à travers les différents complexes membranaires. En particulier, le rôle des xanthophylles dans les mécanismes de photoprotection a été mis en évidence.

## REMERCIEMENTS

Durant cette période, "Intervention Spéciale" de l'Université du Québec à Trois-Rivières et le Conseil de la Recherche en Sciences Naturelles et en Génie (CRSNG), m'ont supporté financièrement et je tiens à leur livrer ma reconnaissance.

J'aimerais tout particulièrement remercier très simplement **M. Robert Carpentier** pour toutes ces années de confiance, et plus particulièrement pour m'avoir fait comprendre qu'une fois les outils en mains, David peut battre Goliath...

Ce séjour fut ponctué de périodes très intenses, que **Johannne, Nathalie B, Michelle, Wafaa, Ahmed, Aminata et Myriam** ont rendu très agréable.

**Nathalie**, ma compagne de vie, dont j'aimerais exprimer toute ma gratitude et mon affection pour son exemple de courage et d'ardeur.

## TABLE DES MATIÈRES

	page
RÉSUMÉ.....	iii
REMERCIEMENTS .....	v
TABLE DES MATIÈRES.....	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xi
LISTE DES FIGURES .....	xiii
LISTE DES TABLEAUX.....	xix
<b>CHAPITRES</b>	
1. INTRODUCTION.....	1
1.1 TRAVAUX ANTÉRIEURS .....	2
1.1.1 Introduction.....	3
1.1.2 Les polypeptides du photosystème I.....	7
1.1.3 Transport d'électrons chez le photosystème I.....	16
1.1.4 L'organisation des complexes photosynthétiques.....	22

1.1.5 Les complexes pigments/protéines et les pigments photosynthétiques .....	25
1.2 ADAPTATION DES TRAITEMENTS .....	37
1.2.1 Traitements calorifiques .....	37
1.2.2 Photodestruction des complexes photosynthétiques.....	40
1.3 BUT ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE .....	43
1.4 TECHNIQUES/THÉORIES .....	46
1.4.1 La spectroscopie infrarouge.....	47
1.4.2 Chromatographie liquide à haute performance (CLHP) .....	54
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	57
2.1 EXTRACTIONS MEMBRANAIRES.....	57
2.1.1 Extraction des PSI-30 .....	57
2.1.2 Extraction des LHC-II, PSI-200 et PSI-100 .....	59
2.2 SPECTROSCOPIE UV/VISIBLE.....	62
2.3 CALCUL DU RAPPORT Chl-a/P-700.....	63
2.4 ÉLECTROPHORÈSE ET DENSITOMÉTRIE.....	66

2.5 DÉGRADATION SUBLÉTALES .....	68
2.5.1 Photoblanchiment.....	68
2.5.2 Dégradation aux températures élevées.....	68
2.6 PHOTODÉGRADATION ET RÉDUCTION CHIMIQUE DU CENTRE RÉACTIONNEL DU PSI (P-700) .....	69
2.6.1 Réduction chimique.....	69
2.6.2 Photoréduction .....	69
2.7 CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE.....	70
2.8 CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE .....	75
2.9 SPECTROSCOPIE INFRAROUGE PAR TRANSFORMÉE DE FOURIER.....	80
2.9.1 L'instrumentation.....	80
2.9.2 Mesures/état membranaire.....	80
2.9.3 Atténuation totale de la réflexion (ATR).....	82
3. RÉSULTATS ET DISCUSSION .....	84

3.1	ÉVALUATION DE LA PHOTO-DÉGRADATION PIGMENTAIRE PAR SPECTROSCOPIE.....	85
3.2	RÉDUCTION DES CENTRES RÉACTIONNELS .....	108
3.3	EFFETS DE LA TEMPÉRATURE SUR LES DIFFÉRENTS COMPLEXES PROTÉIQUES.....	114
3.4	DÉGRADATION PIGMENTAIRE RÉVÉLÉE PAR LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE .....	122
3.4.1	Photoblanchiment des PSI-200.....	124
3.4.2	Photodégradation des PSI-100.....	131
3.4.3	Photodégradation des PSI-30 .....	138
3.4.4	Photodégradation des LHC-II .....	144
3.5	DUALISME PIGMENTAIRE: ANTENNE COLLECTRICE DE LUMIÈRE/ PHOTOPROTECTION ? .....	151
3.5.1	Flux photonique.....	151
3.5.1.1	La fonction de photoprotection des caroténoïdes.....	153
3.5.1.2	La fonction d'antenne collectrice de lumière.....	157

3.5.2 Interactions entre les pigments .....	164
3.6 ÉVALUATION DES COMPLEXES PIGMENTS/PROTÉINES EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE PAR LA SPEC- TROSCOPIE INFRAROUGE PAR TRANS- FORMÉE DE FOURIER.....	170
3.6.1 Introduction.....	170
3.6.2 Changements conformationnels des protéines en fonction de la température.....	173
3.6.3 Interaction entre les structures secondaires des protéines et la chlorophylle-a .....	176
3.6.4 Influence de la lumière sur les structures secondaires des protéines .....	178
4. CONCLUSION .....	180
BIBLIOGRAPHIE .....	188

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADMR	absorption de la résonance magnétique (double)
Car	caroténoïde
CCM	chromatographie sur couche mince
Chl	chlorophylle
<sup>1</sup> Chl	chlorophylle dans l'état singulet
<sup>3</sup> Chl	chlorophylle dans l'état triplet
CLHP	chromatographie liquide à haute performance
ENDOR	double résonance nucléaire des électrons (electron nuclear double resonance)
EPR	résonance paramagnétique des électrons (electron paramagnetic resonance)
ESR	résonance du spin des électrons (electron spin resonance)
FNR	ferrédoxine NADP <sup>+</sup> réductase
IRTF	infrarouge par transformée de Fourier
LDS	lauryl sulfate
LHC-I	antenne collectrice de lumière du photosystème I (light-harvesting complex I)

LHC-II	antenne collectrice de lumière du photosystème II (light-harvesting complex II)
min	minute
NMR	résonance magnétique nucléaire (nuclear magnetic resonance)
PC	plastocyanine
PMSF	phenyl methyl sulfonyl fluoride
P-700	centre réactionnel du photosystème I
PSI	photosystème I
PSII	photosystème II
sec	seconde
TEMED	N,N,N'N'-tétraméthyl-éthylène diamine
TRIS	[Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride]

## LISTE DES FIGURES

	page
1. Schématisation du transport d'électron dans la membrane thylacoïdienne, et la membrane thylacoïdienne démontrant les régions empilées et non-empilées.....	6
2. Modèle de la membrane thylacoïdienne .....	7
3. Modèle des sous-unités du photosystème I.....	8
4. Modèle démontrant la distribution relative de la Chl-a et -b parmi les différents complexes Chl-protéines .....	10
5. Séquence des accepteurs d'électrons au niveau du photosystème I .....	17
6. Représentation schématique du PSI des plantes supérieures basées sur la composition polypeptidique et les accepteurs d'électrons .....	22
7. Modèle hypothétique du transfert d'énergie au niveau du PSII.....	27
8. Schéma d'une section transversale de la membrane thylacoïdienne démontrant des molécules de Chl attachées sur une protéine intrinsèque .....	30
9. Spectre d'absorption de la Chl-a et de la Chl-b .....	31

10. Structures chimiques et spectres d'absorption des principaux caroténoïdes.....	33
11. Visualisation de certaines vibrations correspondant à la région de la spectroscopie IR et illustration des vibrations élastiques et de flexion par le modèle des "balles et des ressorts".....	48
12. Exemple de spectres afin de calculer le rapport Chl-a/P-700 .....	65
13. Représentation schématique de l'appareil à CLHP.....	72
14. Exemple d'un chromatogramme en couche mince sur gel de silice, d'un extrait de pigment.....	75
15. Spectres IRTF des complexes de PSI-30 par la méthodes d'ATR et de BaF <sub>2</sub> .....	81
16. Représentation schématique de la cellule à prisme à neuf réflections et à une réflexion .....	83
17. Analyse de la composition polypeptidiques par densitométrie laser du PSI-30 et du LHC-II.....	86
18. Spectres d'absorption des PSI-30 en fonction du temps d'illumination .....	88
19. Dégradation des pics à 410 nm et 678 nm chez des particules de PSI-30.....	90
20. Spectres d'absorption du PSI-100 en fonction du temps d'illumination .....	93

21. Spectres d'absorption du PSI-200 en fonction du temps d'illumination .....	94
22. Spectres d'absorption du LHC-II en fonction du temps d'illumination .....	95
23. Spectres de la dérivée première des particules de PSI-100 en présence d'illuminations variables.....	97
24. Spectres de la dérivée première des particules de PSI-200 en présence d'illuminations variables.....	98
25. Spectres de la dérivée première des particules de LHC-II en présence d'illuminations variables .....	99
26. Déplacements des maxima d'absorption basés sur la dérivée première .....	102
27. Spectres d'absorption des PSI-200 contrôles et spectre de différence.....	104
28. Spectres d'absorption des PSI-100 contrôles et spectre de différence.....	105
29. Spectres d'absorption des LHC-II contrôles et spectre de différence.....	106
30. Réduction chimique et photoréduction des PSI-30 en fonction du temps d'illumination .....	108
31. Comparaison de la dégradation des Chl-a à 678 nm et de la réduction chimique et photoréduction des P-700, des complexes de PSI-30 .....	110

32. Résumé de la dégradation relative de la réduction chimique de P-700 des PSI-200, PSI-100 et des PSI-30 en fonction du temps d'illumination .....	111
33. Spectres d'absorption des particules de PSI-30 en fonction de la température .....	115
34. Spectres d'absorption des particules de PSI-200 en fonction de la température .....	116
35. Spectres d'absorption des particules de LHC-II en fonction de la température .....	117
36. Dégradation relative des pigments totaux du PSI-200 en fonction de l'illumination, détectée par CLHP .....	125
37. Chromatogramme par CLHP de la séparation des pigments des PSI-200 contrôle.....	126
38. Dégradation relative par groupes de pigments des PSI-200 en fonction de l'illumination, détectée par CLHP .....	127
39. Dégradation relative des pigments totaux du PSI-100 en fonction de l'illumination, détectée par CLHP .....	132
40. Chromatogramme par CLHP de la séparation des pigments des PSI-100 contrôles .....	133
41. Dégradation relative par groupes de pigments des PSI-100 en fonction de l'illumination, détectée par CLHP .....	134

42. Dégradation relative des pigments totaux du PSI-30 en fonction de l'illumination, détectée par CLHP .....	139
43. Chromatogramme par CLHP de la séparation des pigments des PSI-30 contrôle .....	140
44. Dégradation relative par groupe de pigments des PSI-30 en fonction de l'illumination, détectée par CLHP .....	141
45. Dégradation relative des pigments totaux du LHC-II en fonction de l'illumination, détectée par CLHP .....	146
46. Chromatogramme par CLHP de la séparation des pigments des LHC-II contrôle.....	147
47. Dégradation relative par groupe de pigments des LHC-II en fonction de l'illumination, détectée par CLHP .....	148
48. Modèle simplifié du transfert énergétique.....	152
49. Configurations de différents isomères de $\beta$ -carotène ainsi que les spectres d'absorption et spectres Raman.....	161
50. Corrélation fonctionnelle entre la Chl-a et la Chl-b en fonction de l'illumination chez les PSI-200 et LHC-II .....	165

51. Corrélation fonctionnelle entre la Chl-a et la lutéine en fonction de l'illumination chez les PSI-100 et PSI-30.....	167
52. Corrélation fonctionnelle entre la néoxanthine et la violaxanthine en fonction de l'illumination chez les LHC-II et PSI-30 .....	168
53. Spectre IRTF du Triton X-100, et sa structure chimique.....	172
54. Spectres IRTF des complexes de PSI-30 en fonction de la température.....	174
55. Rapport de l'absorbance des feuillets $\beta$ sur les hélices $\alpha$ ( $\beta/\alpha$ ) en fonction de la température, pour les complexes de PSI-30, révélé par spectroscopie IRTF.....	175
56. Comparaison entre les fluctuations des structures secondaires des protéines et la dégradation des Chl-a du complexe de PSI-30 .....	177
57. Localisation et proportion relative des pigments au sein des complexes de PSI-200, PSI-100, PSI-30 et LHC-II .....	183
58. Modèle suggéré identifiant les transferts énergétiques dans le PSI natif (PSI-200) .....	185
59. Modèle suggéré identifiant les transferts énergétiques dans le PSI, dont l'antenne est réduite à 100 Chl-a/P-700 et 30 Chl-a/P-700 .....	186

## LISTE DES TABLEAUX

	page
1. Protéines du photosystème I.....	12
2. Maxima d'absorption de pigments élués.....	26
3. Indice de polarité des solvants utilisés.....	73
4. Chromatographie isocratique et par gradient des solvants utilisés.....	73
5. Valeurs des coefficients d'extinction molaire (littérature) aux longueurs d'ondes correspondant au maximum respectif d'absorption dans le diéthyl éther et à 440 nm (calculé expérimentalement) dans leur solvant de séparation respectif.....	77
6. Réduction chimique relative des P-700 de PSI-30 en fonction de la température .....	120
7. Concentration relative des principaux pigments en fonction du centre réactionnel au sein des différentes particules membranaires.....	123
8. Photodégradation relative des pigments des PSI-200.....	129
9. Photodégradation relative des pigments des PSI-100.....	136

10. Photodégradation relative des pigments des PSI-30 .....	143
11. Photodégradation relative des pigments des LHC-II .....	150
12. Rapport de l'absorbance des feuillets $\beta$ sur les hélices $\alpha$ en fonction du temps d'illumination des complexes de PSI-30, révélé par spectroscopie IRTF .....	178

## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

Le bien-être, la joie de vivre, l'épanouissement, tout ça c'est le photosystème I (PSI). Mais plus encore, c'est la face cachée du chloroplaste, le côté B de cette cascade mélodique d'électrons... Il fascine et passionne ses adeptes.

L'aspect physique de la photosynthèse est relativement bien défriché comparativement à l'étude des stress environnementaux que subit la membrane thylacoïdienne, et cette lacune s'accentue si on se tourne vers le photosystème I. Cette avenue est particulièrement intéressante considérant l'impact que ce type de recherche a sur une grande diversité de sujets (amélioration des connaissances fondamentales de la photosynthèse ainsi que du cheminement des excitons, et distinction des particularités cinétiques entre les photosystèmes I et II).

Ce projet tente dans un premier temps de faire le point sur certains aspects structuraux du PSI. En particulier, nous désirons étudier l'emplacement tridimensionnel des pigments ainsi que leur implication au sein de la membrane thylacoïdienne. Cet objectif implique l'utilisation de différents modes d'exactions connus et au besoin de les modifier et/ou de les adapter. L'étape ultérieure consiste à utiliser ces nouvelles connaissances pour nous aider à mieux comprendre la détérioration pigmentaire et protéique du PSI causée par des paramètres (températures élevée, fortes illuminations) préalablement établis.

## 1.1 TRAVAUX ANTÉRIEURS

D'une façon générale, le but ultime de la recherche impliquant du matériel végétal est d'en connaître suffisamment sur ses propriétés pour en évaluer voire même extrapoler quant aux causes et aux raisons d'un mauvais fonctionnement ou d'une détérioration. Les dommages causés aux plantes ont tout intérêt à être bien scrutés tant les implications sont diversifiées. On n'a qu'à penser à l'agriculture, la nutrition, la conservation des aliments... On se rend rapidement compte que tout tourne autour d'un besoin vital qui ne requiert aucune présentation: s'alimenter !

Ce sont quelques mots pour expliquer davantage la pâmoison, la frénésie, voire même le délire qui atteint le non initié qui s'engage dans le monde très agité du chloroplaste...

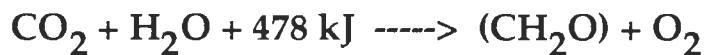
Plus près de nous, il y a la membrane thylacoïdienne, et plus spécifiquement le photosystème I. Cette région physique et fonctionnelle de la photosynthèse fera l'objet de la présente "discussion". Le but ultime de cette recherche est de mettre en évidence les structures (protéines, pigments) impliquées lors d'une détérioration sublétale de la membrane végétale. Pour ce faire, cela implique d'aborder le problème en faisant varier la taille de l'antenne chlorophylles-protéines (par extraction sélective). Cette stratégie nous permet de cerner les structures en question, ce qui nous autorise à prédire avec une plus grande exactitude l'emplacement tridimensionnel de celles-ci.

Pour ce faire il est désormais inévitable de provoquer la détérioration prématurée du système. A ce titre, il existe plusieurs méthodes qui ont fait leurs preuves. On n'a qu'à penser aux fortes illuminations, l'excès de la quantité lumineuse, provoquant la dégradation à prime abord des pigments. Une augmentation

graduelle de la température nous permet d'observer une détérioration plus prononcée des thylacoïdes (protéines et pigments).

### 1.1.1 Introduction

La photosynthèse peut se résumer très simplement par:



(Pour une revue récente de l'origine et l'évolution de la photosynthèse voir Blankenship, 1992).

Mais qu'en est-il exactement ? On peut diviser ce phénomène en deux: la phase sombre et la phase lumineuse. Dans le présent contexte je me limiterai à la phase lumineuse pour parcourir les méandres de cette science.

A l'intérieur même du chloroplaste réside un réseau complexe de membranes, appelées thylacoïdes, bien connus comme étant le siège de capture de l'énergie photonique dans le but de générer un transport d'électrons. La lumière est absorbée par des molécules de chlorophylles, lesquelles sont associées aux complexes protéiques et lipidiques qui constituent les membranes thylacoidiennes (Junge, 1977). Ce phénomène est non négligeable sachant qu'environ 2% de la lumière, en direction de la terre, est capté par les plantes. L'énergie lumineuse est transférée au centre réactionnel et absorbée par un dimère de chlorophylle-a. Le PSII et le PSI sont en communication l'un et l'autre via une série de transporteurs (Mathis et Rutherford, 1987), lesquels sont généralement représentés par le modèle du schéma en Z (Hill et Bendall, 1960). L'absorption des quanta de lumière par cette molécule du centre réactionnel résulte en l'excitation et la perte d'un électron vers un accepteur adjacent, ce par quoi la séparation de charge est initiée (Sauer, 1979). Ces électrons sont transférés à travers

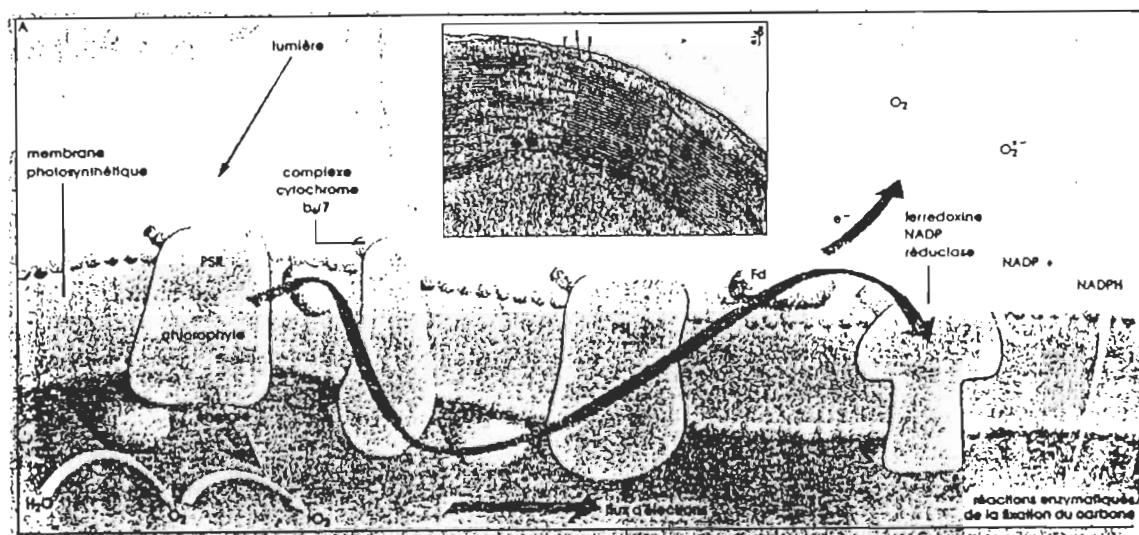
une large échelle de potentiels rédox, et ce avec la coopération des deux photosystèmes qui facilitent l'élévation des électrons d'un état rédox très positif (l'oxydation de l'eau) jusqu'à l'état suffisamment négatif pour réduire le NADP<sup>+</sup>. Quoique second lors de la cascade d'électrons, le terme "photosystème I" lui a été décerné car il fut le premier à être isolé en raison de sa grande stabilité comparativement au photosystème II (Bengis et Nelson, 1975, 1977; Mullet et al., 1980; **Figure 1**).

Les thylacoïdes se présentent sous forme de compartiments structuraux empilés et non-empilés où les photosystèmes ont une distribution hétérogène (pour une revue récente et détaillée sur les membranes photosynthétiques voir l'article de Melis, 1991). Anderson et Andersson (1981) ont démontré qu'il y a une distribution inégale des complexes pigments-protéines dans les régions empilées et non-empilées de la membrane.

Pour bien visualiser le problème, il est primordial de connaître à fond le PSI tant du point de vue structurel que fonctionnel. Nous savons maintenant que le photosystème I, tout comme le photosystème II, peut être fractionné en deux populations de vésicules distinctes prenant origine du grana (vésicules  $\alpha$ ) et des lamelles du stroma (vésicules  $\beta$ ) toutes deux séparées par sonication (Andreasson et al., 1988).

Sous une illumination verte, la taille de l'antenne de photosystème I provenant des vésicules  $\alpha$  (PSI $\alpha$ ) est 40% plus grande (basé sur le taux de la constante de photooxydation) que celle du PSI $\beta$  (Svensson et al., 1991). Le PSI $\alpha$  a une antenne fonctionnelle plus large que le PSI $\beta$ , et cela à cause de son association au LHC-II. Le PSI $\alpha$  est logé en périphérie des grana (en marge des membranes stromatiques) et est associé à un complexe de LHC-II différent (**mobile**) du PSII $\alpha$ , logé au centre des grana (Andreasson et Albertsson, 1993).

La grosseur des particules de PSI et de PSII est intimement reliée à la qualité lumineuse; le PSI est moyennement influencé par celle-ci tandis que le PSII est deux fois plus gros en présence de lumière rouge comparativement à la lumière verte (Mustardy et al., 1992).



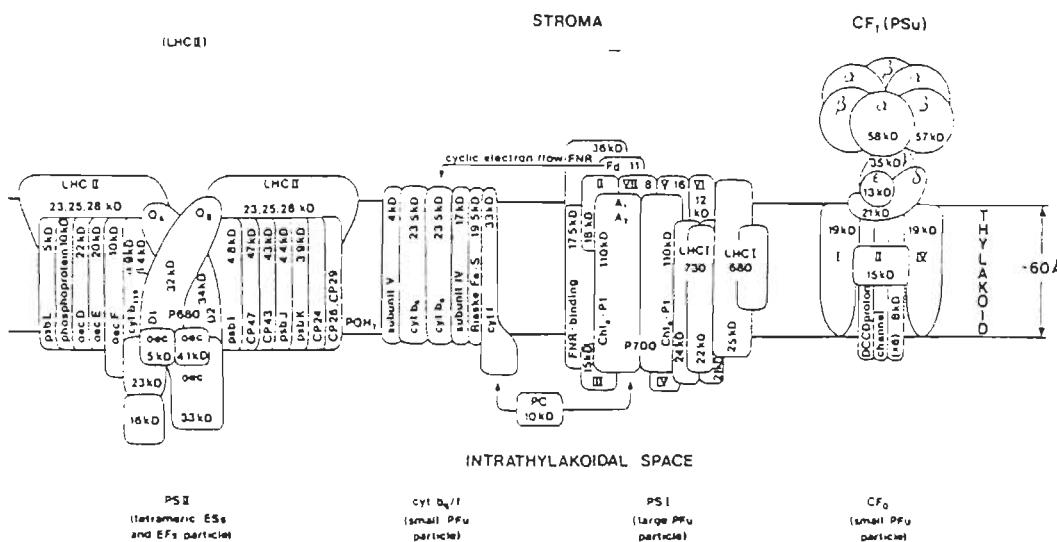
**FIGURE 1.** (A) Schématisation du transport d'électrons dans la membrane thylacoïdienne, (B) membrane thylacoïdienne démontrant les régions empilées et non-empilées, (Foyer, 1993).

### 1.1.2 Les polypeptides du photosystème I

La membrane thylacoïdienne est formée de six complexes polypeptidiques:

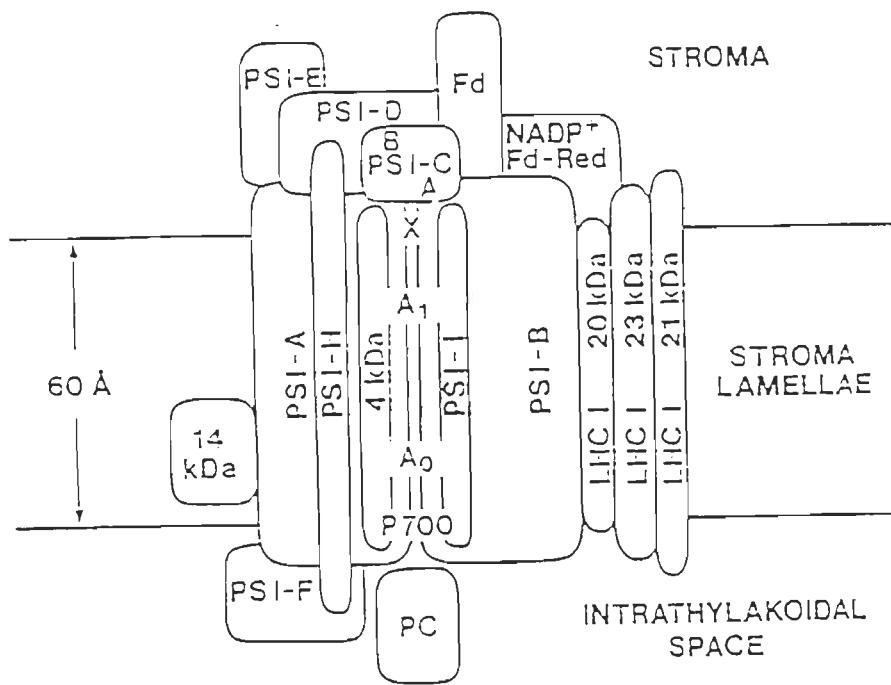
- 1° Le photosystème I (PSI)
  - 2° Le photosystème II (PSII)
  - 3° Le "Light Harvesting Complex I" (LHC-I)
  - 4° Le "Light Harvesting Complex II" (LHC-II)
  - 5° Le complexe des cytochromes b<sub>6</sub>/f
  - 6° Le facteur de couplage (CF<sub>O</sub> + CF<sub>1</sub>)

(voir la figure 2)



**FIGURE 2.** Modèle de la membrane thylacoïdienne indiquant le nom des composantes polypeptidiques et leur poids moléculaire, (Simpson et von Wettstein, 1989).

Se référant à la **figure 3**, on peut focaliser davantage notre étude sur le PSI et le LHC-I. Le complexe le plus périphérique est le collecteur d'énergie (photons) ou antenne de chlorophylle; appelé le **LHC-I**, qui fera l'objet de cette première section.



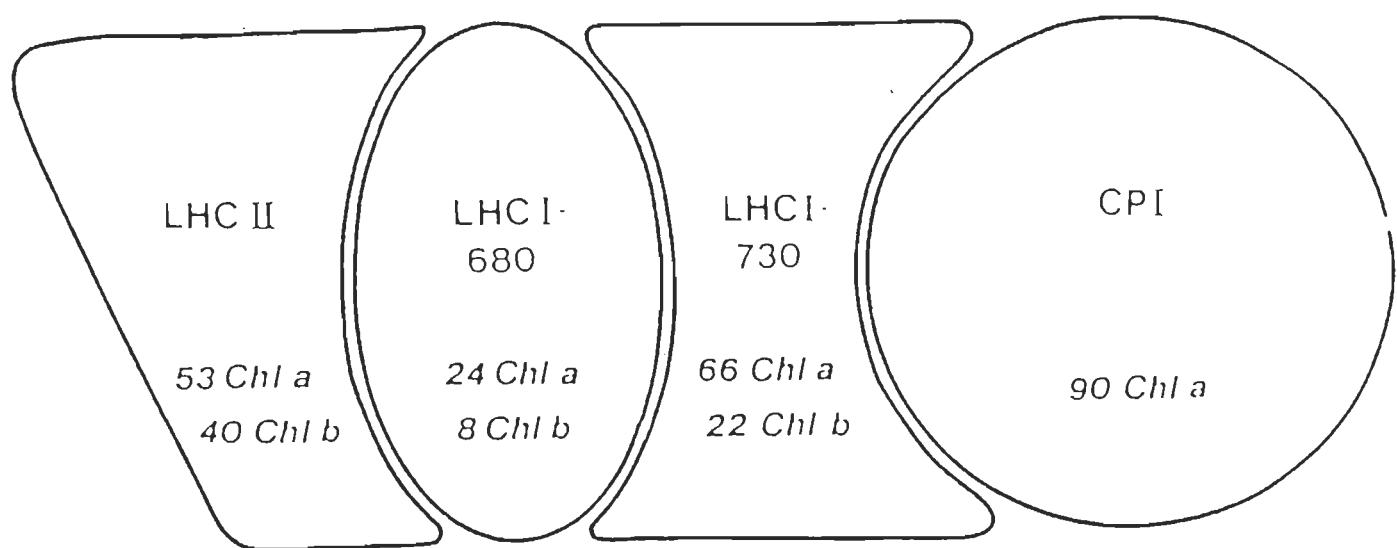
**FIGURE 3.** Modèle des sous-unités du photosystème I (Scheller et Moller, 1990).

Que ce soit chez les cyanobactéries, les algues vertes ou les plantes supérieures, le nombre de sous-unités composant le LHC-I peut varier de 3 à 5 (Boardman et Anderson, 1978; Thornber et al., 1979; Nechushtai et Nelson, 1981a; de Vitry et al., 1983). Habituellement chez les plantes supérieures, qui feront l'objet de la présente étude, il y a quatre sous-unités. Très récemment, Ikeuchi et ses collaborateurs (1991) ont isolé ces polypeptides chez l'épinard pour en conclure que les poids moléculaires varient entre 20 et 25 kDa (20.5, 21, 23 et 25 kDa); ces résultats sont similaires que ceux obtenus chez d'autres espèces (Lam et al., 1984a, b). Tout récemment, un petit polypeptide de 11 kDa aurait été isolé chez l'orge, une plante supérieure (Preiss et al., 1993; Thornber et al. 1993).

De cette polémique, un fait reste sans équivoque pour tout le règne végétal, c'est le lien qui existe entre l'efficacité du collecteur d'énergie et le nombre de molécules de chlorophylle qu'il contient (Ortiz et al., 1984). Il y aurait environ 200 chlorophylles/PSI-LHC-I (Lam et al., 1984a; Bassi et Simpson, 1987; Hinz et Simpson, 1988), avec un rapport Chl a/b variant de 2.5 à 6.3 (Haworth et al., 1983; Metz, et al., 1984; Bassi et Simpson, 1987); par contre chez les plantes supérieures ce rapport se situe autour de 3.

Si on se réfère à la **figure 4**, deux LHC-I distincts ont été observés: le LHC-I 680 qui participerait au transfert d'énergie, entre le LHC-II, et le centre réactionnel du PSI (Bassi et Simpson, 1987; pour une revue détaillée sur la photophosphorylation: Allen, 1992a, b), tandis que le LHC-I 730 protégerait le centre réactionnel des quantités excessives d'énergie lumineuse (Haworth et al., 1983). Le LHC-I 730 est constitué de façon hétérodimérique, soit d'un polypeptide de 21 et un autre de 22 kDa. Cependant le LHC-I 680 est subdivisé en deux complexes distincts, soit le A et le B. Les partie A et B sont respectivement constituées d'une protéine de 25 kDa et d'une de 23 kDa. Le LHC-I 680B est associé à la sous-unité non-pigmentée PSI-E, indiquant que cette protéine pourrait intervenir lors de la liaison de l'antenne au

centre réactionnel (Knoetzel et al., 1992, Knoetzel et Simpson, 1992; Plumley et al., 1993).



**FIGURE 4.** Modèle démontrant la distribution relative de la chlorophylle-a et -b parmi les différents complexes chlorophylles-protéines (Bassi et Simpson, 1987).

La localisation de ces pigments (Chl-a et -b) sème la controverse, puisqu'il y aurait au moins deux polypeptides contenant la chlorophylle mais par contre la chlorophylle-b serait située sur un seul polypeptide (Nechushtai et al., 1987; Vainstein et al., 1989). Les nouveaux développements (transport d'électrons adjacent au complexe: voir résultats et discussion) sur le rôle et le fonctionnement du LHC-I nous proviennent principalement de *Synechococcus* sp. 7002, une cyanobactéries dénudée en antenne de chlorophylle au niveau du PSI (Golbeck, 1987, 1992; Mukerji et Sauer, 1990). Cette nouvelle avenue donne une bouffée d'air frais dans la compréhension et la nouvelle recherche qui s'installe dans ce domaine.

Plus récemment Tyystjarvi et ses collaborateurs (1991) se sont interrogés sur le rôle réel de protection de ce complexe collecteur (LHC-I) de lumière, envers la photoinhibition.

Si on se tourne maintenant vers le cœur du PSI, il est intéressant de décortiquer ce massif complexe en quelques sous-unités aux fonctions inconnues... Les exemples mentionnés lors de cette étude sont principalement basés sur des plantes supérieures; par contre plusieurs travaux sont actuellement publiés sur des organismes photosynthétiques inférieurs (Li et al., 1991).

**TABLEAU 1.** Protéines du photosystème I

	<b>Sous-unités polypeptidiques</b>		<b>Poids moléculaire (kDa)</b>
<b>A</b>	<b>B</b>	<b>Génome</b>	
I	PSI-A+B	(Chloro.)	82-83
II	PSI-D	(Noyau)	18-22 (~ 20)
III	PSI-F	(Noyau)	17-19
---	PSI-L	(Noyau)	18
IV	PSI-E	(Noyau)	16
V	PSI-G	(Noyau)	14
VI	PSI-H	(Noyau)	9.5
VII	PSI-C	(Chloro.)	9
---	PSI-I	(Chloro.)	4
	PSI-J	(Chloro.)	
	PSI-K	(Noyau)	

"A" nomenclature d'après Schantz et Bogorad, 1988

"B" nomenclature d'après Bengis et Nelson, 1977

(Pour une revue récente et détaillée sur le sujet, voir Ikeuchi 1992).

1° Les **sous-unités PSI-A et PSI-B**, qui forment le noyau du PSI, formeraient un hétérodimère (Fish et Bogorad, 1986; Bruce et Malkin, 1988) (homodimère chez les bactéries photosynthétiques, Büttner et al., 1992) et qui ont respectivement 751 et 735 acides aminés, ce qui leur donne respectivement un poids de 83,217 et 82,634 Da (Kirsch et Sayer, 1986; Ohyama et al., 1986). Par contre le poids moléculaire vérifié par électrophorèse (SDS-PAGE) révélerait un poids entre 56 et 68 kDa dépendant des espèces observées (Kreuze et al., 1986; Fish et Bogorad, 1986; Zilber et al., 1990). Il y a donc environ 20 kDa de

différence entre les valeurs calculées à partir du séquençage et les valeurs obtenues par électrophorèse. D'après Golbeck (1987), cet écart est dû à la nature hydrophobique des polypeptides. Ces deux protéines seraient liées entre elles par des leucines formant un point d'attache du type "fermeture éclair" (Webber et Malkin, 1990), ce qui renforcerait l'hypothèse de dimérisation entre ces deux polypeptides.

Un des rôles importants de ce dimère est de loger une grande quantité de chlorophylles, soit environ 90 chlorophylles-a (Bassi et Simpson, 1987), le mettant au premier plan lors du transfert énergétique. L'histidine serait considérée comme un excellent candidat pour lier ce pigment à la protéine (Kirsch et al., 1986). Il existe une grande homologie entre les sous-unités A et B de même qu'entre les sous-unités comparées dans différentes espèces, en utilisant le maïs comme point de comparaison: 95% avec l'épinard, 83% avec *Chlamydomonas*, 78% *Synechococcus* (Reilly et Neilson, 1988). Ces degrés élevés reflètent un rôle important pour la liaison de la chlorophylle et les fonctions photochimiques primaires du PSI. Les hélices  $\alpha$  du polypeptide PSI-B sont reliées autant au niveau fonctionnel qu'au niveau évolutif par rapport à la protéine D2 du PSII ainsi qu'au polypeptide M du centre réactionnel bactérien (Margulies, 1991).

Comme on le verra dans la seconde partie, ce complexe lie les intermédiaires de la chaîne de transporteur d'électrons (P-700,  $A_0$ ,  $A_1$ ,  $F_x$ ).

**2° La sous-unité II (PSI-D)** est un polypeptide d'environ 20 kDa auquel s'associe la ferrédoxine, donc du côté accepteur du PSI (Andersen et al., 1990, 1992a; Lagoutte et Vallon, 1992). Par le fait même il pourrait être intimement lié à la sous-unité PSI-C (Nechushtai et al., 1981; Bonnerjea et al., 1985). Cette protéine est fortement chargée (positivement) (Wynn et Malkin, 1988), ce qui pourrait interagir avec les charges négatives de la ferrédoxine. Elle servirait donc à orienter

la ferrédoxine pour que le transfert d'électrons soit optimum (Hippler et al., 1989), et serait également importante lors de la biogenèse et de l'assemblage du PSI (Cohen et Nechushtai, 1992). Ainsi cette sous-unité est requise pour la stabilité de l'assemblage de la sous-unité PSI-E (Chitnis et Nelson, 1992).

3° La **sous-unité III (PSI-F)**, une protéine d'environ 17-19 kDa, serait impliquée dans l'interaction avec la plastocyanine (PC) du côté luménal du PSI, et donc contribuerait à la réduction du  $\text{P-700}^+$  par la PC (Bengis et Nelson, 1977; Münch et al., 1988; Okkels et al., 1988; Steppuhn et al., 1988; Franzén et al., 1989, Takabe et al., 1991). Ce mécanisme serait le même qu'avec la sous-unité II dans le cas de la ferrédoxine, car ce polypeptide est également chargé positivement (Wynn et Malkin, 1988). Par contre cette protéine n'est pas nécessaire à la photoréduction du  $\text{NADP}^+$  en illumination continue (Scheller et Moller, 1990), et ne serait pas associée aux pigments photosynthétiques (Steppuhn et al., 1988; Anandan et al., 1989).

4° La **sous-unité PSI-L**, à l'exception des petits polypeptides, est la toute dernière trouvaille de l'équipe d'Okkels (1991). Ce polypeptide de 18 kDa est hydrophobique, donc on lui prédit d'avoir deux hélices a. De plus il migrerait près des sous-unités PSI-H et PSI-C, soit du côté du stroma.

5° La **sous-unité IV (PSI-E)** est un polypeptide d'environ 16 kDa; malgré son aspect énigmatique, il pourrait contribuer à la liaison de la ferrédoxine, étant situé du côté du stroma (Nechushtai et al., 1981; Hoj et Moller, 1986; Scheller et al., 1988; Münch et al., 1988; Okkels et al., 1988; Steppuhn et al., 1988; Franzén et al., 1989; Andersen et al., 1990, 1992a, 1992b; Lagoutte et Vallon, 1992). De récentes recherches suggèrent un rôle essentiel dans la stabilisation du côté accepteur du PSI, en particulier au maintien de l'intégrité fonctionnelle entre la protéine  $\text{F}_A/\text{F}_B$  et le centre réactionnel du PSI (Weber et Strotmann, 1993).

**6° Les sous-unité V (PSI-G) et VI (PSI-H)** sont des polypeptides de 14 et 9.5 kDa respectivement, mais leurs fonctions restent encore aujourd'hui nébuleuses (Scheller et al., 1989a; Okkels et al., 1992).

**7° La sous-unité VII (PSI-C)** est une protéine de 8.8 kDa contenant le complexe ( $F_A/F_B$ ) (Golbeck, 1987; Hoj et al., 1987; Oh-oka et al., 1988, 1990), et possède une structure tertiaire identique à 2[4Fe-4S] ferrédoxine (Dunn et Gray, 1988; Oh-oka et al., 1988; Scheller et al., 1989b; Oh-oka et al., 1991), (voir le récent article de Golbeck (1993) pour plus de détails sur cette sous-unité).

Tout dernièrement, trois nouveaux polypeptides ont été identifiés, dont les poids moléculaires chez l'épinard sont de 3.9, 4.1 (PSI-I) et 7-9 kDa, ces poids moléculaires varient légèrement chez le pois (Koike et al., 1989; Ikeuchi et al., 1990, 1991a, b; He et Malkin, 1992). Le poids des polypeptides correspond néanmoins aux valeurs trouvées antérieurement, soit de 2.3 à 7 kDa chez une panoplie très variée d'espèces (Rodermel et Bogorad, 1985; Kück et al., 1987; Hayasida et al., 1987; Cushman et al., 1988; Choquet et al., 1988; Schantz et Bogorad, 1988; Ikeuchi et al., 1992). Ce dernier polypeptide (9 kDa) est une composante extrinsèque localisée du côté luménal de la membrane thylacoïdienne dont l'absence n'affecte pas le transport d'électrons. Dès lors, une fouille littéraire était de mise puisque plusieurs auteurs avaient prédit le même genre de résultats sans toutefois soulever les foules...

Et enfin, il existe trois polypeptides plus ou moins mobiles: la plastocyanine, la ferrédoxine et le FNR (ferrédoxine NADP<sup>+</sup> réductase). La PC étant du côté luménal du PSI, elle se fixerait sur la sous-unité PSI-F formant ainsi un complexe de 31 kDa que l'on peut lire sur gel SDS-PAGE (Wynn et Malkin, 1988; Wynn et al., 1989): donc la PC aurait un poids moléculaire d'environ 10.5 kDa. Contrairement aux deux autres protéines, il y aurait deux plastocyanines par centre réactionnel (Bottin et Mathis, 1985, 1987). Par contre la ferrédoxine et

la FNR, sont du côté du stroma et ont un poids de 10 et 37 kDa respectivement (Simpson et von Wettstein, 1989, Nakatani et Shin, 1991). Ces trois polypeptides feront l'objet d'une discussion plus élaborée à la prochaine section.

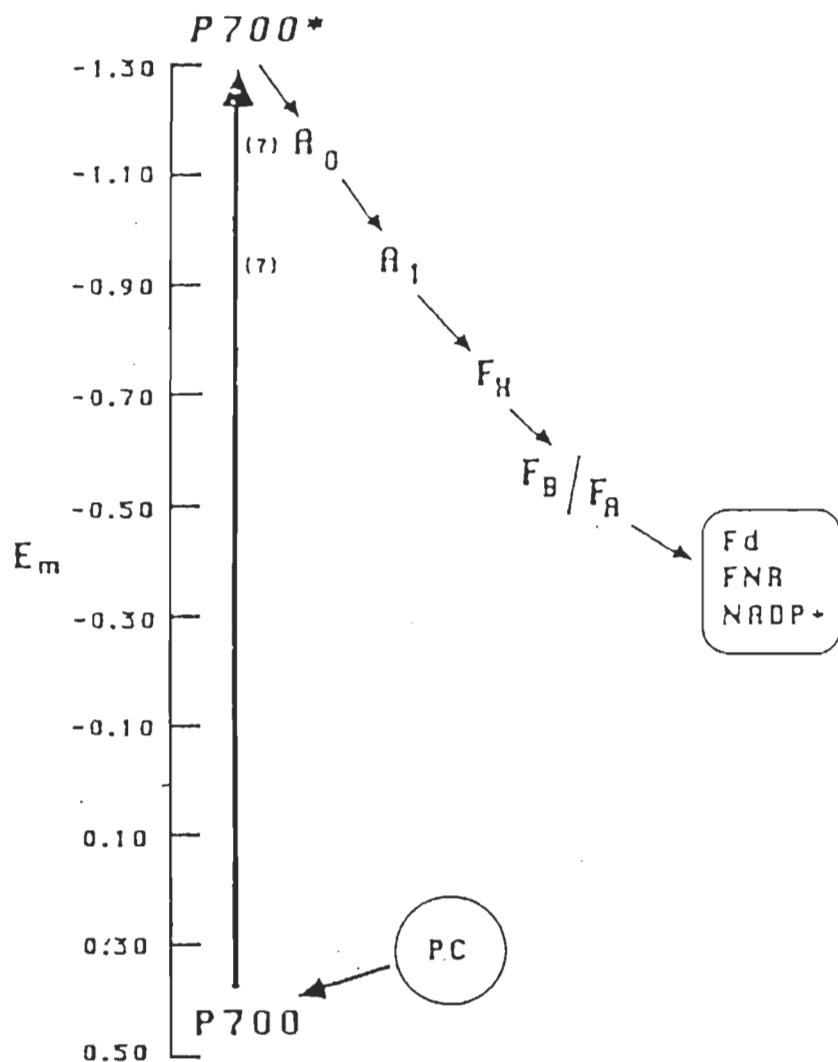
La recherche sur les protéines du PSI est loin d'être stagnante; tout récemment Ikeuchi et ses collaborateurs (1991) ont découvert l'existence de deux nouvelles sous-unités de 9 et 14 kDa qui seraient différentes de celles déjà élucidées...

(Pour une revue détaillée et récente, voir Böttcher et al., 1992; Zilber et Malkin, 1992).

### 1.1.3 Transport d'électrons chez le photosystème I

Comme mentionné brièvement dans la section 1.1.1, la séparation effectuées au niveau du PSII est le résultat direct des électrons parvenant jusqu'au complexe des cytochromes b<sub>6</sub> et f (pour une revue détaillée sur le sujet, voir Foyer, 1984). Dans la présente section, je suivrai chacun des intermédiaires non pas en terme de flux électronique mais plutôt par rapport aux structures favorisant ce transfert. Ainsi, il n'est pas nécessaire d'aborder dans cette section les détails du cheminement cyclique des électrons par exemple, mais de se concentrer sur l'aspect physique et structurel du PSI. Ainsi, par cette section, nous devrions avoir une vue d'ensemble des constituants du photosystème I et la toute dernière mode en ce qui concerne l'organisation tridimensionnelle des complexes...

Via le bassin de plastoquinones, les électrons sont transférés au complexe du cytochrome b<sub>6</sub>/f et enfin captés par la plastocyanine (**Figure 5**).



**FIGURE 5.** Séquence des accepteurs d'électrons accompagnée des changements des standards d'énergies libres avec le transport d'électrons au niveau du photosystème I (Golbeck, 1987).

La plastocyanine fait la navette entre le cytochrome b<sub>6</sub>/f et le P-700<sup>+</sup> (Wood et Bendall, 1975; Haehnel et al., 1981; Haehnel, 1982; Arnon, 1988), qui comme la PC et le cytochrome f, est à l'état réduit à l'obscurité (Whitmarsh et al., 1982). Les cytochromes c-553 et c-554 jouent le même rôle chez certaines algues et cyanobactéries (Wood, 1977, 1978; Bohner et Boger, 1978), ainsi que chez les procaryotes (Gross, 1979). La PC avec ses neuf charges négatives forme une répulsion avec les sous-unités PSI-A et PSI-B; ainsi la présence de Triton X-100 (à faible concentration) tend à changer les charges négatives pour des positives au site d'oxydation, augmentant ainsi la photoréduction du P-700 par la PC. Ceci peut être dû à l'enlèvement de lipides (négatifs) comme la phosphatidyl glycérol (PG) et la sulfoquinovosyl-diacyl glycérol (SQDG), dont l'implication dans les fonctions de régulation du transport d'électrons au niveau du PSI est aussi suggérée (Ke et al., 1976). Par contre avec une grande concentration de Triton, il y une forte répulsion de la PC, ce qui résulte en la diminution de l'activité de photoréduction du P-700 (Ratajczak et al., 1988).

Quand au P-700<sup>+</sup>, le premier donneur d'électrons du PSI, il reçoit ses électrons de la PC, et est localisé du côté luménal du PSI, entre l'hétérodimère de 82-83 kDa (Bengis et Nelson, 1977). Il y aurait 1 Q<sub>A</sub>/P-700 dans la membrane thylacoïdienne du stroma et 10 Q<sub>A</sub>/P-700 dans les grana, ce qui nous informe davantage sur la localisation du PSI et du PSII dans les membranes internes du chloroplaste (Andersson et Haehnel, 1982).

Il y a encore beaucoup de controverse quant à la nature du P-700; de récents travaux tendent à prédire qu'il serait un **dimère de chlorophylles** comme le P-680 (van Kan et al., 1990). Ce résultat est supporté par plusieurs techniques dont: ESR (Norris et al., 1971; Katz et Hindman, 1981), dichroïsme circulaire (Phillipson et al., 1972; Ikegami et Itoh, 1986, 1988; Mathis et Rutherford, 1987), absorption

optique (Ikegami et al., 1986), ENDOR (Norris et al., 1974), spectre ADMR (Den Blanken et Hoff, 1983), spectroscopie Raman (Moënne-Loccoz et al., 1990), "Hole burning" (Gillie et al., 1987), EPR (Astashkin et al., 1988). Mais même avec tous ces arguments, il y a encore quelques publications soutenant le P-700 comme chlorophylle monomérique; et le plus étonnant c'est que les mêmes techniques sont utilisées, comme le EPR (Wasielewski et al., 1981), et la spectroscopie ENDOR (O'Malley et Babcock, 1984). Les tous derniers travaux de Maeda et ses collaborateurs (1992a) fournissent une information de premier plan au sujet de la détection de molécules de chlorophylle-a' (épimère de chlorophylle-a) au niveau du photosystème I seulement. Ils trouvèrent un rapport Chl-a'/P-700 de 2, spéculant ainsi que le P-700 pourrait être un dimère de chlorophylle-a'. Il reste encore beaucoup à faire dans cette voie, vu l'étendue de la problématique; par contre la spectroscopie EPR, avec un tout nouveau résultat, l'orientation perpendiculaire (par rapport à la membrane thylacoïdienne) du P-700 (Rutherford et Sétif, 1990) pourrait déchiffrer cette énigme...

Les intermédiaires suivants, soit les premiers accepteurs d'électrons, **A<sub>0</sub>** et **A<sub>1</sub>**, sont aussi compris entre les sous-unités protéiques A et B (Fenton et al., 1979; Wasielewsky et al., 1987). A<sub>0</sub> est un monomère de chlorophylle (Shuvalov et al., 1979; Bonnerjea et Evans, 1982; Gast et al., 1983), tandis que A<sub>1</sub> est une **quinone** (Peterson et al., 1987) car il se produit un changement d'absorbance de 240 à 325 nm (Mansfield et Evans, 1986), et non entre 350 et 750 nm (Mansfield et Evans, 1985). Cette phylloquinone (A<sub>1</sub>), communément appelée vitamine K<sub>1</sub> (Brettel et al., 1986, Snyder et al., 1991), est répertoriée en deux exemplaires par P-700 (Malkin, 1986; Schoeder et Lauckau, 1986; Palace et al., 1987; Ziegler et al., 1987). Dans ce domaine, les recherches s'intensifient à propos de la réelle implication de A<sub>1</sub> au niveau du transport d'électrons (Iwaki et Itoh, 1991, Itoh et Iwaki, 1991), puisque lorsque la phylloquinone est absente, on observe une

diminution de seulement 50% de l'activité photosynthétique (Ikegami et Itoh, 1987; Sétif et al., 1987; Mansfield et Evans, 1988; Sieckmann et al., 1991). Pourtant ce site, appelé "Q<sub>ú</sub>", serait le site d'action de plusieurs types d'herbicides, et donc cette quinone fonctionnerait comme Q<sub>B</sub> au niveau du PSII (Itoh et Iwaki, 1990). Par ailleurs, on sait maintenant que la vitamine K<sub>1</sub> est grandement affectée par les radiations ultraviolettes (Barr et al., 1992).

Les trois accepteurs suivants sont des complexes (4Fe-4S), F<sub>X</sub> est du côté du stroma et, comme les deux accepteurs précédents, est également adjoint à la sous-unité I (Reilly et Neilson, 1988; Scheller et al., 1989a) par des résidus cystéines (Golbeck, 1987). Les intermédiaires suivants forment un complexe, F<sub>A</sub>/F<sub>B</sub>, qui est associé à la sous-unité PSI-C, une protéine de 9 kDa. La stoïchiométrie de F<sub>X</sub><sup>-</sup>, F<sub>A</sub><sup>-</sup> et F<sub>B</sub><sup>-</sup> est de 1:1:1 (Guigliarelli et al., 1989).

Ces accepteurs ont fait l'objet de recherches approfondies et ce, par le biais de différentes techniques: ESR (Cammack et Evans, 1975), spectroscopie Mossbauer (Evans et al., 1979, 1981), spectroscopie EXAFS (McDermott et al., 1987, 1988), le F-NMR (Golbeck et al., 1987a) et le EPR (Hanley et al., 1992a et b). Ce complexe fait encore partie intégrante de la recherche active sur le PSI: très récemment il a été utilisé pour étudier le transport d'électrons, en extrayant F<sub>A</sub>/F<sub>B</sub> et dénaturant F<sub>X</sub> et par la suite, en reconstituant le complexe pour retrouver l'activité initiale (Parret et al., 1990), et en détruisant partiellement ou complètement les centres Fe-S par le mercure (Kojima et al., 1987a; Inoue et al., 1990). Ce concept de recherche pourrait même s'étendre de la plastocyanine à la ferrédoxine (Kojima et al., 1987b).

Dans un même ordre d'idée Sakurai et al. (1991) ainsi que Bryant et ses collaborateurs (Zhao et al., 1992) ont également travaillé sur des extraits pauvres en particules F<sub>B</sub> sans pour autant détecter une baisse

significative dans le processus de recombinaison. Néanmoins,  $F_B$  constitue le site spécifique de réduction du **méthyle viologène**, un accepteur grandement utilisé dans l'étude de la chaîne de transport d'électrons (Inoue et al., 1989; Fujii et al., 1990).

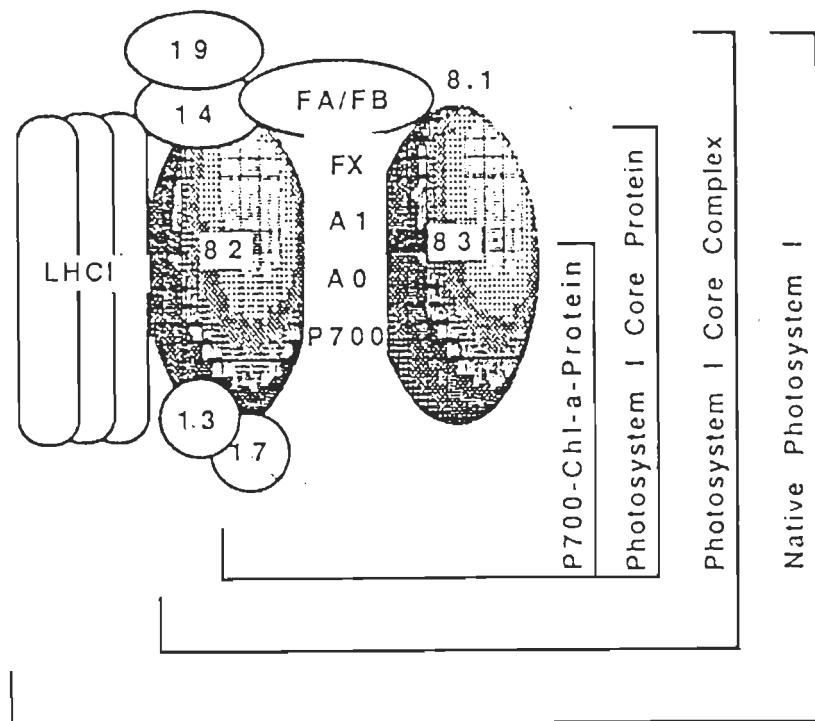
Finalement, en bout de chaîne, la ferrédoxine et le FNR acceptent les électrons successivement, ayant tous deux un site de liaison indépendant (Merati et Zanetti, 1987). Pour ce mécanisme, il y a deux modes d'interaction suggérés:

- 1° La ferrédoxine sert comme transporteur d'électrons mobiles entre le  $(F_A/F_B)^-$  et le FNR lié à la membrane (Forti et Grubas, 1985).
- 2° La ferrédoxine est immobile, car elle est liée au FNR, et accepte les électrons du complexe (Carillo et Vallejos, 1983).

L'intégrité des deux polypeptides (PSI-A et B) et la protéine de 9 kDa (PSI-C) seraient essentielles à l'activité du PSI (Hiyama et al., 1986, 1990; Golbeck, 1987). L'efficacité de l'interaction de la ferrédoxine et du photosystème I peut être grandement améliorée (près de 6 fois) par l'addition de magnésium par exemple (Hervas et al., 1992). Ceci rend le choix de la méthode d'extraction des complexes membranaires particulièrement délicat, compte tenu de la possibilité de dénaturation, de certains polypeptides.

### 1.1.4 L'organisation des complexes photosynthétiques

Comme déjà mentionné préalablement, le choix de l'extrait membranaire pour l'étude de l'organisation pigmentaire est d'une extrême importance. Une panoplie assez imposante de particules nous est offerte dans la littérature, ce qui facilitera la sélection et au besoin, une adaptation appropriée des méthodes peut être effectuée. Je propose donc brièvement ici la nomenclature et la classification des différents choix qui s'offrent à nous. (Figure 6).



**FIGURE 6.** Représentation schématique du photosystème I des plantes supérieures basée sur la composition polypeptidique et les accepteurs d'électrons (Golbeck, 1987).

## 1° Le photosystème I natif: PSI-200

- contient tous les polypeptides du tableau 1 en plus des trois petits polypeptides déjà mentionnés.
- les quatres polypeptides du LHC-I
- contient les intermédiaires P-700, A<sub>O</sub>, A<sub>1</sub>, F<sub>X</sub> et F<sub>A</sub>/F<sub>B</sub>
- ~ 200 chlorophylles/P-700  
(voir Mullet et al., 1980; Lam et al., 1984a; Dunahay et Staehelin, 1985; Bruce et Malkin, 1988, Preiss et al., 1993)

## 2° Photosystème I "Core Complex"

### i) PSI-200 (LHC dénaturé)

- contient les mêmes polypeptides que le PSI-200 sauf que les protéines de l'antenne de chlorophylles sont absentes ou dénaturées.
- ~ 120 Chl/P-700  
(voir Malkin et al., 1985; Bruce et Malkin, 1988; Rogner et al., 1990)

### ii) PSI-200 - LHC-I

- PSI-200 en absence de LHC-I
- ~ 25-40 Chl/P-700 (chlorophylle-a seulement)

Il existe plusieurs noms pour désigner ce type de particule, voici la liste des principaux avec leurs auteurs:

- HP 700 (Ke et al., 1975)
- PSI- "reaction center" (Bengis et Nelson, 1975, 1977)
- PSI- "sub-chloroplast fragment" (Malkin, 1975)

- PSI- "sub-chloroplast particle" (Golbeck et al., 1977, 1978)
- P-700-Chl-a protein complex (Shiozawa et al., 1974; Shin et Shimizu, 1988) ---> peut contenir du cytochrome b<sub>6</sub>/f
- "photosystem I complex" 100 Chl/P-700 (Nyhus et al., 1992)

### 3° Centre réactionnel

#### i) PSI "core protein"

- contient seulement deux polypeptides (sous-unité I)
- contient donc le P-700, A<sub>O</sub>, A<sub>1</sub>, et F<sub>x</sub>

est généralement utilisé pour étudier les propriétés de F<sub>x</sub> en absence de F<sub>A</sub>/F<sub>B</sub>

(voir Golbeck et al., 1987b, 1988; Parret et al., 1989)

#### ii) P-700 Chl-a-protéine (CP1)

- contient les deux polypeptides du "core protein"
- P-700 et A<sub>O</sub> actif, A<sub>1</sub> est aussi présent, mais ne peut être photoréduit
- ~ 40-100 Chl/P-700

Il est utilisé pour étudier les réactions primaires de la lumière entre le P-700 et A<sub>O</sub> sans l'influence des centres Fe-S. (voir Shiozawa, 1980; Anderson, 1980; Vierling et Alberte, 1983: par des méthodes électrophorétiques et Bengis et Nelson, 1975, 1977: par des méthodes d'ultracentrifugations).

### 1.1.5 Les complexes pigments/protéines et les pigments photosynthétiques

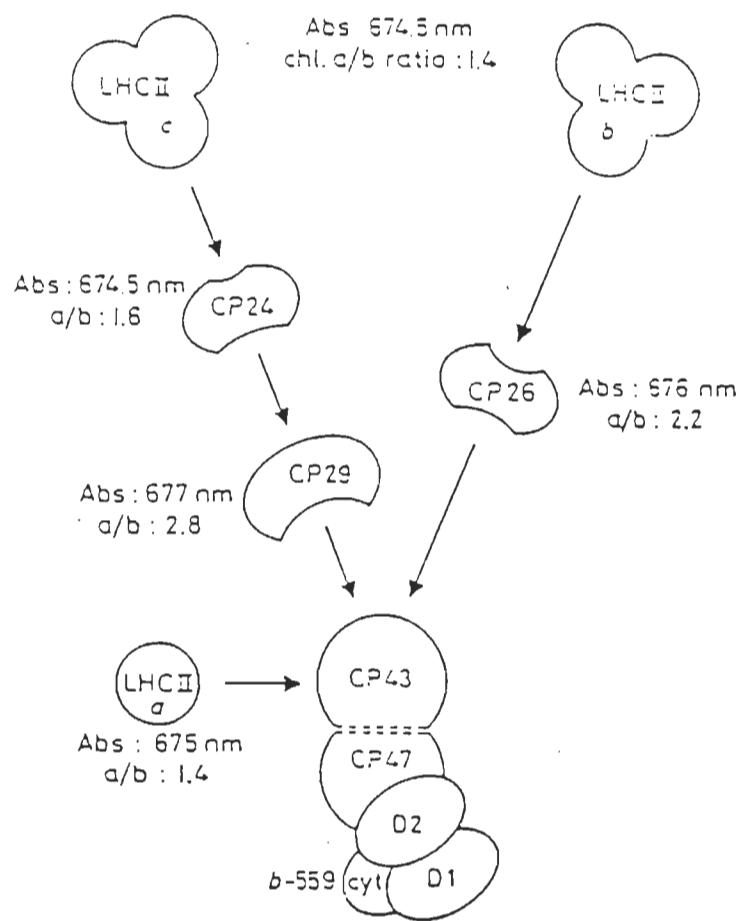
Pour mener à bien l'idée première de ce projet il importe de connaître précisément les pigments que l'on est susceptible de retrouver (**Tableau 2**). En effet lors de la dégradation des extraits membranaires, les premiers touchés seront sûrement les pigments (holochromes). Pour ce faire, la présente section a pour but d'identifier et de mieux connaître les groupes de pigments associés aux thylacoïdes et surtout leur emplacement respectif.

Les couleurs rencontrées chez les plantes sont dues à la présence et à l'accumulation de pigments. Une substance est un pigment si elle absorbe sélectivement une partie de la lumière visible. Les fonctions chimiques responsables de l'absorption de la lumière sont appelées **chromophores** (étymologiquement: porteuses de couleur). Elles sont constituées de liaisons chimiques riches en électrons délocalisés ou encore de la conjugaison de ces liaisons. Des groupements chimiques comme le groupe hydroxyle (-OH) ou méthoxy (-OCH<sub>3</sub>) amplifient ou modifient la couleur de base donné par le chromophore. Ces groupements sont appelés **auxochromes** (étymologiquement: amplificateurs de couleurs). L'effet **bathochrome** correspond à une modification de la structure moléculaire (l'addition de groupements chimiques) ayant pour effet de déplacer la couleur vers le rouge. Inversement, l'effet **hypsochrome** correspond à une modification structurale qui déplace l'absorption de la molécule vers les longueurs d'ondes plus courtes.

**TABLEAU 2.** Maxima d'absorption de pigments élués. Ces pigments ont été transférés dans plusieurs solvants (xanthophylles --> éthanol, Chl-a et -b --> acétone, carotènes et ses précurseurs --> hexane, et les Chl-a' et -b' --> solvants d'CLHP), (Humbeck et al., 1989).

Peak	Pigment	Maxima (nm)
1	Neoxanthin	465.2; 436.5; 412.7
2	Loroxanthin	472.4; 444.9
3	Violaxanthin	469.5; 439.3; 415.9
4	Antheraxanthin	474.0; 448.4; 422.0
5	Lutein	472.9; 444.6; 419.0
6	Zeaxanthin	477.5; 450.4
7	Chlorophyll b	644.5; 454.8
8	Chlorophyll b'	649.5; 462.2
9	Chlorophyll a	661.2; 428.9
10	Chlorophyll a'	663.2; 430.7
11	$\alpha$ -carotene	472.1; 443.8; 420.3
12	$\beta$ -carotene	477; 449.4
a	not identified	451.4; 425.0
b	cis-lycopene	438.5 (499.5; 469.0; 442.0)
c	cis-neurosporenes	461.1; 434.0 (464.6; 435.7) 458.2; 433.5 (459.2; 433.0)
b	$\zeta$ -carotene and $\beta$ -zeacarotene	424.8; 399.7; 379.9 (423.8; 399.1; 379.9) 451.8; 425.7; 403.0 (450.0; 424.7; 400.0)

Les photons qui parviennent aux thylacoïdes sont captés initialement par les antennes de pigments (LHC) du PSII (Figure 7).



**FIGURE 7.** Modèle hypothétique du transfert d'énergie au niveau du photosystème II (Bassi et Dainese, 1989).

Le LHC-II joue un rôle de premier plan au niveau de l'empilement des thylacoïdes et de la distribution d'énergie entre les photosystèmes (Allen et al., 1981; Day et al., 1984; Werst et al., 1992). Le LHC-II contient environ 40% des protéines des thylacoïdes et 50% de la chlorophylle totale (Plumley et Schmidt, 1987).

Les photons sont entraînés jusqu'au centre réactionnel (voir la section résultats et discussion) du PSI via le LHC-I. De là, les électrons parviennent au P-700 (via le complexe des cytochromes b<sub>6</sub>/f), qui est excité par la lumière déjà captée par les pigments du LHC-I.

Plusieurs études récentes ont été réalisées sur les transferts d'énergie entre les différents pigments et cela, sur des bactéries photosynthétiques, compte tenu de l'aspect relativement simple de l'antenne de chlorophylles et du centre réactionnel (Sundström et van Grondelle, 1992; Valkunas et al., 1992). Sachant que la composition en pigments des antennes est grandement influencée par le flux de photons (Takaichi et al., 1992), l'étude des pigments revêt un aspect fondamental.

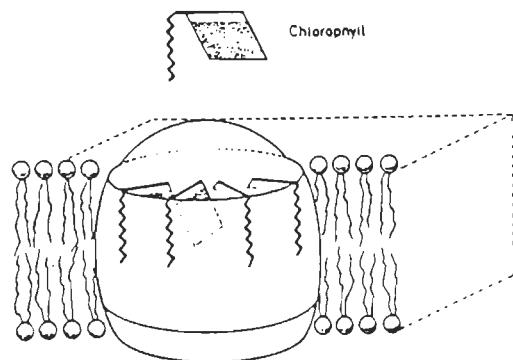
Le premier pas dans la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique s'effectue au niveau des centres réactionnels, lesquels représentent une petite fraction du contenu total en pigments. Sous une forte illumination, une excitation directe des centres réactionnels est possible mais c'est un événement très rare; dans la majorité des cas, la lumière est absorbée par la masse de pigments. Ces pigments transfèrent l'énergie d'excitation aux centres réactionnels qui convertissent ces états excités en séparation de charges "stable". L'énergie migre à travers un enchevêtrement de pigments jusqu'à ce qu'elle soit capturée, et ce, si elle n'est pas émise en fluorescence ou dissipée en chaleur. Ces réactions coexistent simultanément avec la capture de l'énergie d'excitation représentant une perte de l'utilisation photosynthétique de l'énergie lumineuse. D'où il appert que l'efficacité du premier pas de la conversion de l'énergie

photosynthétique dépend fortement de la **structure moléculaire** des membranes thylacoïdiennes, des complexes pigments-protéines et des centres réactionnels. L'architecture de ces unités détermine les conditions de migration de l'énergie, de la séparation de charges et de la stabilisation des charges (Garab et al., 1987).

On peut diviser les pigments photosynthétiques en deux ou trois groupes: les **chlorophylles**, les **caroténoïdes** et les **phéophytines**.

### 1° Les chlorophylles

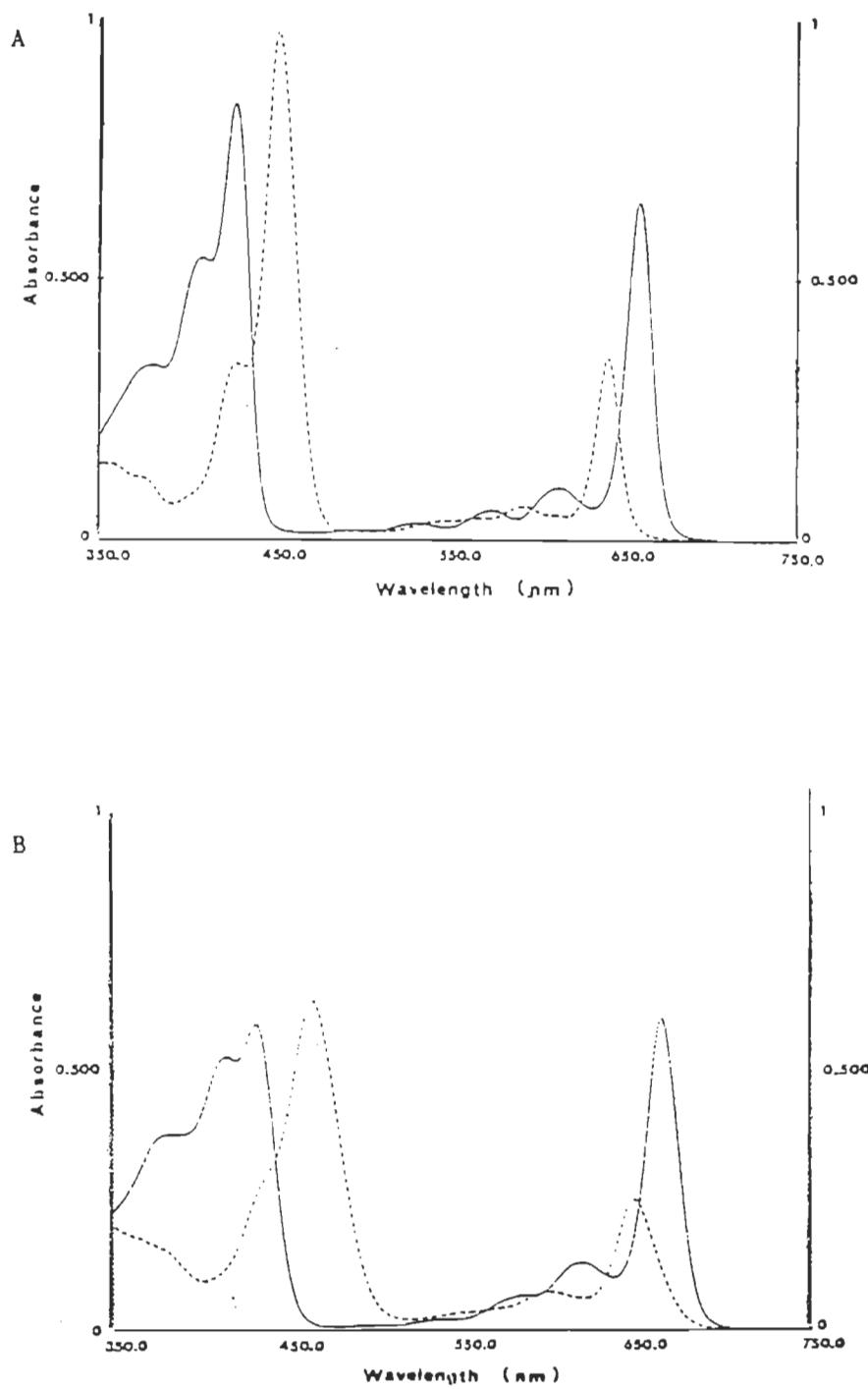
D'après les expériences sur la sédimentation des complexes Chl-protéines en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS), les chlorophylles-a et -b seraient liées aux protéines (Smith et Pickels, 1941; Green et al., 1991). Elles peuvent donc être extraites avec un mélange de solvant polaire (chlorophorme-méthanol, acétone-eau), ce qui démontre qu'elles ne sont pas liées de façon covalente (**Figure 8**). Les chlorophylles-a et -b possèdent une chaîne phytol, laquelle est estérifiée au groupe carboxyl de l'anneau, leur donnant ainsi leur caractère lipidique (Lichtenthaler, 1987). Ces chlorophylles constituent, chez les plantes supérieures et les algues, environ 20% des lipides totaux.



**FIGURE 8.** Schéma d'une section transversale de la membrane thylacoïdienne montrant des molécules de chlorophylles attachées sur une protéine intrinsèque.

La figure 9 nous montre un spectre d'absorption type de chlorophylle, ce qui nous servira grandement à évaluer l'altération des pigments en fonction des traitements qu'ils subissent. En déconvoluant ce type de spectre, on peut visualiser plusieurs formes de la chlorophylle (Jennings et al., 1990), ce qui nous ouvre un horizon particulièrement intéressant sur la dégradation des pigments.

Avec les récents travaux de Argyroudi-Akoyunoglou (1991) et de Greenbaum et Mauzerall (1991), il est maintenant possible d'associer une valeur expérimentale exprimée en pourcentage de chlorophylle, et cela pour chacun des complexes photosynthétiques de plusieurs espèces de plantes supérieures. Pour en savoir davantage sur la chlorophylle et les états singulets et triplets, voir la revue de Budil et Thurnauer (1991).

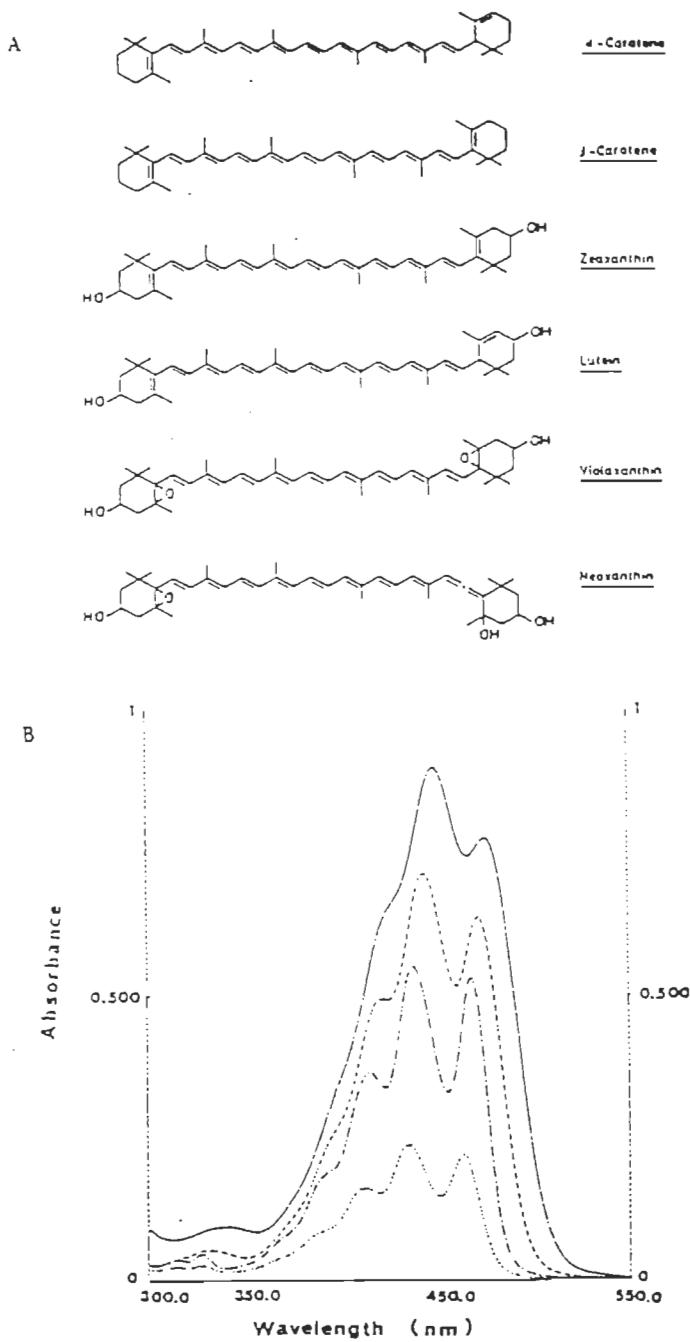


**FIGURE 9.** Spectre d'absorption de la chlorophylle-a (trait plein) et de la chlorophylle-b (tirets), A) dans le diéthyle d'éther (solvant pure) et B) dans l'éthanol 95% (Lichtenthaler, 1987).

## 2° Les caroténoïdes

Le terme caroténoïde a été créé par l'allemand Wackenroder, en 1830, afin de désigner le pigment de la carotte. Aujourd'hui, on rassemble sous cette appellation un ensemble d'hydrocarbures dont la charpente moléculaire est formée de huit unités de cinq atomes de carbone (tétraterpène). Depuis le début des années 80, une recrudescence de la recherche sur ces pigments a été notée. Ceci n'est pas sans répercussion avec l'annonce à grand éclat, que la consommation des caroténoïdes contenus dans les fruits et légumes, a été associée à une baisse de l'incidence de plusieurs types de cancers (Peto et al., 1981). Il existe deux types de caroténoïdes: les **carotènes** et les **xanthophylles**, qui se différencient principalement par l'absence ou la présence d'oxygène (**Figure 10a**).

De façon générale, les caroténoïdes transfèrent l'énergie aux autres pigments, et avec une très grande efficacité, préférentiellement captée par les chlorophylles. Cette énergie est saisie au niveau du centre réactionnel. L'efficacité du transfert d'énergie réside probablement dans le fait que les caroténoïdes se retrouvent des deux côtés de la membrane thylacoïdienne (Picorel et al., 1992; Thayer et Bjorkman, 1992), contrairement à ce qui a été proposé lors de précédentes études chez les membranes photosynthétiques bactériennes qui suggéreraient la présence de caroténoïdes principalement du côté du cytoplasme (Picorel et al., 1988). Comme nous le verrons plus loin, l'état d'excitation des caroténoïdes est idéal tant dans son rôle **d'antenne** que de celui de **photoprotection**: ces pigments ont leurs états singulets plus élevés en énergie et leur états triplets plus bas que les états correspondants chez les chlorophylles (Frank et al., 1991; Mimuro et Katoh, 1991).



**FIGURE 10.** A) Structure chimique et B) spectres d'absorption dans le diéthyle d'éther des principaux caroténoïdes des plantes supérieures,  $\beta$ -carotène (-), lutéine (---), violaxanthine (.-.) et néoxanthine (...) (Lichtenthaler, 1987).

Les caroténoïdes, en se liant au LHC, prennent une configuration "tout-trans" (Iwata et al., 1985), tandis qu'une liaison au centre réactionnel leur confère une conformation cis (Lutz et al., 1976; Koyama, 1990). Pour une revue des structures et des fonctions des caroténoïdes, voir les articles de Koyama 1991, Frank et al., 1992, 1993 (chez les bactéries) et de Gillbro et al. en 1993 .(Voir aussi sur le transfert d'énergie entre les caroténoïdes et les chlorophylles: Frank et al. 1992, 1993 et Owens et al., 1992)

### i) Les carotènes (sans oxygène)

Il existe deux isomères du carotène:  $\alpha$ -carotène  
 $\beta$ -carotène

Les  $\alpha$ -carotènes se présentent habituellement sous forme de trace chez les thylacoïdes. Par contre le  $\beta$ -carotène est très abondant surtout au niveau des centres réactionnels. Cet isomère est même orienté avec le P-700 (Schrafferricht et Junge, 1981). Il serait partiellement impliqué dans l'absorption de la lumière (Figure 10B), mais son rôle principal serait de protéger la Chl-a de la photooxydation dans ou près du centre réactionnel (Lichtenthaler, 1987).

### ii) Les xanthophylles (non polaire avec oxygène)

Le **tableau 2** nous montre les principaux types de xanthophylles. A l'exception de la violaxanthine qui est aussi liée à l'enveloppe chloroplastique, toutes les autres sont liées à la membrane thylacoïdienne (Lichtenthaler et al., 1981). Comme les carotènes, les xanthophylles sont des composés essentiels de structure (Plumley et Schmidt, 1987). La lutéine, la violaxanthine et la néoxanthine sont les xanthophylles les plus abondantes chez les plantes supérieures (Thornber, 1975; Braumann et al., 1982; Kolubayev et al., 1985; Lichtenthaler, 1987). Par contre, une dé-époxydation de la violaxanthine nous donne spontanément la zéaxanthine:

Violaxanthine ---> Anthéraxanthine ---> Zéaxanthine  
 (Yamamoto, 1979; Grumbach, 1983)

En somme, les caroténoïdes sont connues pour participer à l'assemblage des unités actives du PSII (Humbeck et al., 1989) et du PSI, mais surtout pour jouer un rôle de **protection des chlorophylles** (Aronoff et MacKinney, 1943; Pepkowitz, 1943; Sistrom et al., 1956; Anderson et Robertson, 1960; Foote, 1976; Krinsky, 1979; Siefermann-Harms, 1987; Sandmann et al., 1993). Une des preuves les plus probantes pour appuyer cette hypothèse nous provient des mutants dépourvus en caroténoïdes: ils ne peuvent survivre qu'en laboratoire et dans des conditions très spécifiques de température, d'oxygène... (Sistrom et al., 1956; Bilger et Bjorkman, 1990). L'irradiation aux UV-C occasionne une augmentation en caroténoïdes, ce qui renforce l'hypothèse de protection de la chlorophylle. Les caroténoïdes seraient donc un bon indice du stress infligé aux plantes (Campos et al., 1991). Elles sont également présentes en grande quantité (environ 2 µg/mg de protéine) dans l'enveloppe chloroplastique (Markwell et al., 1992).

### 3° Les phéophytines

En fait se sont des chlorophylles-a et -b qui ont subi une transformation (phéophylinisation), ce qui a occasionné une diminution du poids moléculaire de 22.3 Da par rapport aux chlorophylles, pour ainsi nous donner 871.18 et 885.16 Da respectivement

Plusieurs conditions peuvent causer une phéophylinisation:

- augmentation de l'acidité (fumigation SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>)
- tissu sénescent
- **stress lumineux ou thermique**

- traitement aux herbicides
- temps d'entreposage prolongé du matériel photosynthétique
- .
- .
- .

La Chl-a serait tout de même plus sensible que la Chl-b.

Depuis la découverte de la participation d'une phéophytine (Phéo-a) au transport d'électrons au niveau du PSII en tant que premier accepteur (Klimov et al., 1980), les recherches se sont succédées.

## **1.2 ADAPTATION DES TRAITEMENTS**

Toujours dans le but de mieux connaître l'aspect structurel du PSI, quelques traitements s'imposent pour mieux caractériser notre schème tridimensionnel du complexe. Comme déjà mentionné précédemment, les traitements à la chaleur et à haute intensité lumineuse permettront de dégrader graduellement le complexe photosynthétique préalablement choisi.

Peu de travaux ont été faits sur le sujet, ce qui nous permettra de défricher ce domaine en mettant au point des techniques d'évaluation, et cela, en fonction du temps. Dans un premier souffle, regardons ce que la littérature nous révèle à ce sujet.

### **1.2.1 Traitements calorifiques**

Plusieurs études récentes démontrent la complexité de la tolérance du photosystème II aux différents stress; par contre très peu a été fait au niveau du photosystème I (Kirilovsky et Etienne, 1991; Havaux, 1992a, 1992b).

#### i) Les basses températures

Contrairement aux résultats que nous escomptions, les acclimatations au froid sont connues pour préserver l'intégrité des complexes membranaires et augmenter la capacité du transport d'électrons au niveau du photosystème I seulement (Huner et al., 1988; Smith et al., 1989). Par contre, plusieurs cas reportés affirment qu'un abaissement de la température de croissance, ( $\sim 4^\circ \text{ C}$ ), favorise la synthèse de nouvelles protéines; 19 kDa chez le pois (Ma et al., 1990), 35 kDa chez la tomate et aucun changement signalé chez l'épinard (Ort et al., 1989). Par contre, en abaissant légèrement la température optimum de croissance, la photosynthèse s'en trouve affectée (hausse) dans une proportion d'environ 20 % (Brüggemann, 1992). Plusieurs

recherches ont été effectuées sur des cryoprotecteurs (exogènes) des membranes thylacoïdiennes, pouvant mieux expliquer la dynamique structurelle et fonctionnelle des complexes (Santarius, 1990, 1991, 1992). Pour une revue détaillée sur le sujet, voir Minorsky (1989) et Jia et al. (1992).

## ii) Les hautes températures

Il a été démontré que les températures élevées perturbent de façon irréversible (habituellement) la structure et les fonctions des thylacoïdes (Mukohata et al., 1973a, b; Krause et Santarius, 1975; Santarius, 1975; Armond et al., 1979; Gounaris et al., 1983, 1984; Sundby et Anderson, 1985, Ruban et Trach, 1991; Lepock et al., 1992; Nolan et Hopkins, 1992). Par exemple, elles altèrent la conformation du site d'action des herbicides de type urée ainsi que le complexe du cytochrome  $b_6/f$  (Thomas et al., 1986; Gounaris et al., 1983; Weist, 1986). A titre d'exemple, le raffinose (0.4-0.5 M) thermostabiliserait (Al-Khatibe et Weist, 1990a) davantage que le saccharose au niveau:

- du transport d'électrons
- de l'altération des polypeptides
- du déclin de la fluorescence induit par la température (Kamogawa et al., 1983; Bukhov et al., 1990; Searle et Schaafsma, 1992).

Hoshina et ses collaborateurs (1990), par des mesures de changements d'absorption du P-700 induits par éclair (flash-induced absorption), EPR et par électrophorèse, concluent qu'un traitement de:

35-50° C détruit le transport d'électrons

50-55° C " " le complexe  $F_A/F_B$

60-70° C " "  $F_x$

>70° C " " le P-700

(pour des résultats similaires voir Sonoike et al., 1990)

Mais qu'en est-il des complexes protéiques? Subissent-ils une détérioration graduelle de la périphérie jusqu'au centre ou si c'est l'ultrastructure des complexes pigments-protéines qui est affectée sans tenir compte de leur emplacement tridimensionnel? En ce sens, quelques études attirent notre attention, particulièrement celles de Frackowiak et de ses collaborateurs (1985) suggérant que les caroténoïdes se dégradent dans une proportion plus élevée que les molécules de chlorophylles. Mais ces conclusions ne semblent pas faire l'unanimité, principalement dans le cas où il y a absence de LHC (Wrobel et Hendrich, 1991). Toutes ces questions restent pour le moment sans réponse. C'est pourquoi l'on pourra, en se servant des nouvelles données, ajuster notre tir et ainsi profiter de cette expertise pour façonner des expériences pertinentes.

Depuis quelques années, une nouvelle voie d'étude fait son apparition dans l'élucidation des mécanismes d'adaptation des plantes exposées à la chaleur; la lumière rouge de faible intensité, protège l'appareil photosynthétique contre les effets des températures élevées. Ce traitement stabiliserait le photosystème II par la création d'un gradient de protons et le maintient de l'équilibre ionique (Havaux et Strasser, 1990, 1992). Depuis peu, on tente également d'élucider certains changements initiés par des températures spécifiques, causant des perturbations majeures durant la croissance des plantes (Janssen et al., 1992).

En terminant, notons qu'on peut utiliser différentes techniques pour démontrer qu'il y a altération des protéines, par exemple par électrophorèse et sa lecture par densitométrie (Al-Khatib et Weist, 1990b).

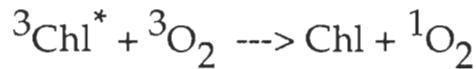
### 1.2.2 Photodestruction des complexes photosynthétiques

La quantité de photons reçue tout comme leur longueur d'onde, induit des changements chez les photosystèmes I et II des cyanophytes et des plantes vasculaires (Powles, 1984). La photoinactivation du photosystème II requiert seulement de la lumière (Kok et al., 1965), tandis que le photosystème I requiert de la lumière et généralement de l'oxygène (Satoh 1970a, b, c).

Le rapport PSI/PSII devient plus élevé en présence d'une intensité lumineuse faible, et plus bas avec une forte intensité. Les travaux des auteurs cités précédemment, suggèrent que les changements du rapport PSI/PSII induits par la qualité et l'intensité lumineuse sont accomplis par un mécanisme commun pour le contrôle de la synthèse ou l'assemblage du complexe du PSI. Cette hypothèse a été vérifiée ultérieurement par le même groupe pour ainsi en faire ressortir les grandes lignes: 1° les changements d'intensités lumineuses résultent en la régulation de l'assemblage du PSI de façon similaire à la régulation en réponse à la qualité lumineuse, 2° la régulation est en corrélation avec le transport d'électrons au niveau du complexe du cytochrome  $b_6/f$ , et non avec le bassin de plastoquinones (Murakami et Fujita, 1991). Donc à forte illumination, le taux P-680/P-700 est d'environ 2, par contre à faible illumination ce taux augmente à 4; ce qui suggérerait que le PSII serait impliqué dans un mécanisme de prévention à la surexcitation du PSI (Wilhelm et al., 1989 et selon une étude récente, le PSII $\beta$  agirait comme photoprotecteur (Neale et Melis, 1991).

Tout le monde s'entend sur le fait que la lumière à forte intensité détruit des molécules de chlorophylles (Asada et Takahashi, 1987; Siefermann-Harms, 1990; Miller et Carpentier, 1991). Par contre des résultats contradictoires affirment que ce traitement n'affecte pas la quantité de protéines totales (Sagar et Briggs, 1990) ou encore diminue cette quantité (Nurmi, 1990). Néanmoins, il est généralement

accepté que le photoblanchiment de la chlorophylle survient lorsque le transfert d'énergie de la  $^3\text{Chl}^*$  vers une caroténoïde est supprimé. En ces circonstances, un  $^1\text{O}_2$  est produit, lequel est impliqué dans la dégradation de la chlorophylle:



(Asada et Takahashi, 1987; Egorov et Krasnovsky, 1992)

L'utilisation d'accepteur d'électrons comme le silicomolybdate ou le DBMIB (au niveau du PSII) mène à une photooxydation sélective et un photoblanchiment irréversible des  $\beta$ -carotènes. En présence d'une illumination normale sans accepteur, aucun blanchiment ne se produit, ce qui est dépendant de l'habileté du centre réactionnel à initier la séparation de charges. Au niveau du PSII, la cinétique du photoblanchiment suggère deux phases: très rapidement, il y a une perte de 50% des  $\beta$ -carotènes totaux, suivie d'une perte de chlorophylles accessoires absorbant à 670 nm (Telfer et al., 1991).

Dans un même ordre d'idée, les caroténoïdes sont d'excellents "quencher" de  $^3\text{Chl}^*$  et de  $^1\text{O}_2$  (Foots et al., 1970; Grams et Eskins, 1972, Monger et Parson, 1977; Mathis et al., 1979; Kramer et Mathis, 1980). Donc l'efficacité du "quenching" dépend significativement de la **distance** entre chlorophylles et caroténoïdes et de leur orientation mutuelle (Moore et al., 1982). Par contre une augmentation de température cause une inactivation de tous les enzymes thermolabiles, ce qui pourrait, en ces conditions, produire différentes espèces réactives d'oxygène ( $\text{O}_2^-$ ,  $\text{O}_2^{2-}$ ,  $^1\text{O}_2$ ; Weickowski et Majewska, 1990).

Dans le cas du LHC-II, les caroténoïdes ne suffiraient que partiellement à la tâche de protection des chlorophylles. Le réel mécanisme (discuté ultérieurement) impliquerait l'apoprotéine du LHC-II qui agirait comme barrière pour l' $O_2$ , donc protégeant les pigments des dommages causés par la photooxydation (Siefermann-Harms, 1990).

Au point de vue transport d'électrons, dans des conditions anaérobiques, c'est au niveau  $A_O \rightarrow A_1$  qu'il y a photoinhibition; par contre en présence d' $O_2$ , ce sont les centres Fe-S qui sont affectés (Inoue et al., 1990).

Un point qu'il faut toujours avoir à l'idée, c'est qu'il existe un processus **d'acclimatation** caractéristique chez les plantes supérieures qui implique des changements dans la morphologie des feuilles, des propriétés photochimiques, de l'ultrastructure du chloroplaste et de la concentration d'enzymes (Boardman, 1977; Björkman, 1981; Lichtenthaler et al., 1981).

### **1.3 BUT ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE**

En des termes très généraux, le but de l'étude réside en une meilleure compréhension du photosystème I principalement du centre réactionnel, du point de vue structurel et fonctionnel. Plus spécifiquement, de connaître l'emplacement tridimensionnel des pigments qui composent les particules membranaires et leurs rôles dans celles-ci.

La stratégie générale pour élucider ce problème consiste, comme discuté ultérieurement, à dégrader superficiellement le complexe membranaire et ainsi analyser les particules affectées. Pour ce faire, un premier objectif s'impose: adapter des techniques d'extractions membranaires pour tirer le maximum d'informations des traitements proposés. Ce qui implique d'avoir plusieurs particules actives dont la taille de l'antenne varie et dont le centre réactionnel est bien préservé par plusieurs polypeptides.

Le deuxième objectif reste un point culminant dans la démarche expérimentale: il s'agit d'imposer un traitement efficace au complexe membranaire dans le but d'affecter les composantes périphériques. Comme déjà mentionné, les **températures élevées et de fortes illuminations** contribueront efficacement, d'après l'abondante littérature sur le sujet, à dégrader et contrôler l'organisation de l'extrait.

Les objectifs qui suivent sont d'ordre technique; reliés aux méthodes biophysiques, les sous-objectifs nous permettront d'aller chercher l'information là où elle se trouve. Le premier objectif est d'établir une méthode d'évaluation pour estimer le degré de détérioration du complexe, en vue d'avoir un contrôle précis à chaque extrait. Il se divise donc en deux parties, soit l'aspect structurel et l'aspect fonctionnel; dans le premier cas, un spectre d'absorption pour chaque

traitement nous assure de bien suivre l'évolution des particules, et dans le deuxième cas, des mesures de photooxydation du P-700 nous donne une bonne idée de la cinétique des transporteurs d'électrons du photosystème I.

Ikegami et ses collaborateurs (1990) suggèrent que la Chl-a (P-700) et certains lipides (PG, MGDG) contribuent grandement à la stabilité thermique du centre réactionnel en fortifiant les sous-unités A et B. A la lumière de ces informations, il sera plus aisé de formuler des expériences adaptées à nos besoins et ainsi acquérir l'expertise voulue pour extrapoler quant à l'arrangement structurel et fonctionnel du PSI.

Pour scruter un peu plus à fond le complexe, des méthodes plus raffinées s'imposent. La spectroscopie infrarouge présente un potentiel intéressant, compte tenu de sa grande précision. A prime abord, on veut savoir quelle est l'implication des protéines sur la dégradation du complexe. Ce qui implique l'état de la structure secondaire des protéines comme l'apparition de nouvelles conformations par exemple. Dans un même ordre d'idée, un objectif qui en découle directement, soit l'évaluation et la caractérisation des pigments faisant partie intégrante du complexe photosynthétique. Pour ce faire, l'utilisation du CLHP est une technique de premier choix (pour plus de détails, voir la section matériel et méthodes).

Les **hypothèses** sous-jacentes sont très délicates à formuler parce qu'elles sont très nombreuses et très variées. Par contre quelques-unes peuvent facilement être envisagées:

- 1° Les pigments dégradés en premier lieu seraient situés au centre du complexe, et donc seraient les derniers collecteurs de photons (études comparatives selon les traitements: illumination et augmentation de la température), ce qui n'implique pas les mêmes mécanismes que chez les PSII par exemple.
- 2° L'évaluation de l'atténuation de la dégradation provoquée, correspond aux réels mécanismes de protections élaborés par la plante.
- 3° Les changements conformationnels (au niveau des hélices  $\alpha$  et  $\beta$ ), s'il y a lieu, provoqués par les traitements expérimentaux (température et photodestruction), sont de nature très différente selon le traitement.
- 4° Les mécanismes impliqués lors de la dégradation des plantes (épinard, orge, laitue ...), seraient similaires à ceux provoqués en laboratoire.

Cette étude a ses limites puisque qu'il sera très difficile de s'assurer de la localisation exacte de chaque constituant protéique impliqué au niveau du PSI; et ces limites s'étendent à l'emplacement précis des pigments. Par exemple, dans le cas des expériences en spectroscopie infrarouge, nous saurons les modifications qu'auront subies les protéines, mais il est très difficile de cerner quelles protéines ou même, quels groupes de protéines sont réellement concernés. Par contre, comme mentionné précédemment, le fait d'étudier plusieurs particules membranaires ayant des antennes de composition différente, nous ouvre les portes conduisant vers une meilleure approche de la réalité.

## 1.4 TECHNIQUES/THÉORIES

Le choix des extraits membranaires demeure une étape de premier plan. Quatre particules membranaires ont été extraites du complexe natif de PSI. Les deux premiers types extraits contiennent les mêmes protéines mais diffèrent par leur contenu en pigments, principalement en chlorophylles-a, soit le **PSI-30** et le **PSI-100** (30 et 100 Chl-a/P-700 respectivement) extrait par chromatographie pour le PSI-30 et par ultracentrifugation et par l'utilisation de détergents pour le PSI-100. Une troisième particule du même type que le PSI-100, mais incluant le LHC-I, est utilisée, fournissant ainsi environ 100 Chl/P-700 supplémentaire, d'où le nom **PSI-200**. Et enfin le **LHC-II** mobile, pouvant être extrait lorsqu'il est phosphorylé (cela se produit lorsqu'il est près de la plastocyanine), peut aider à élucider les différentes fonctions entre les antennes de pigments.

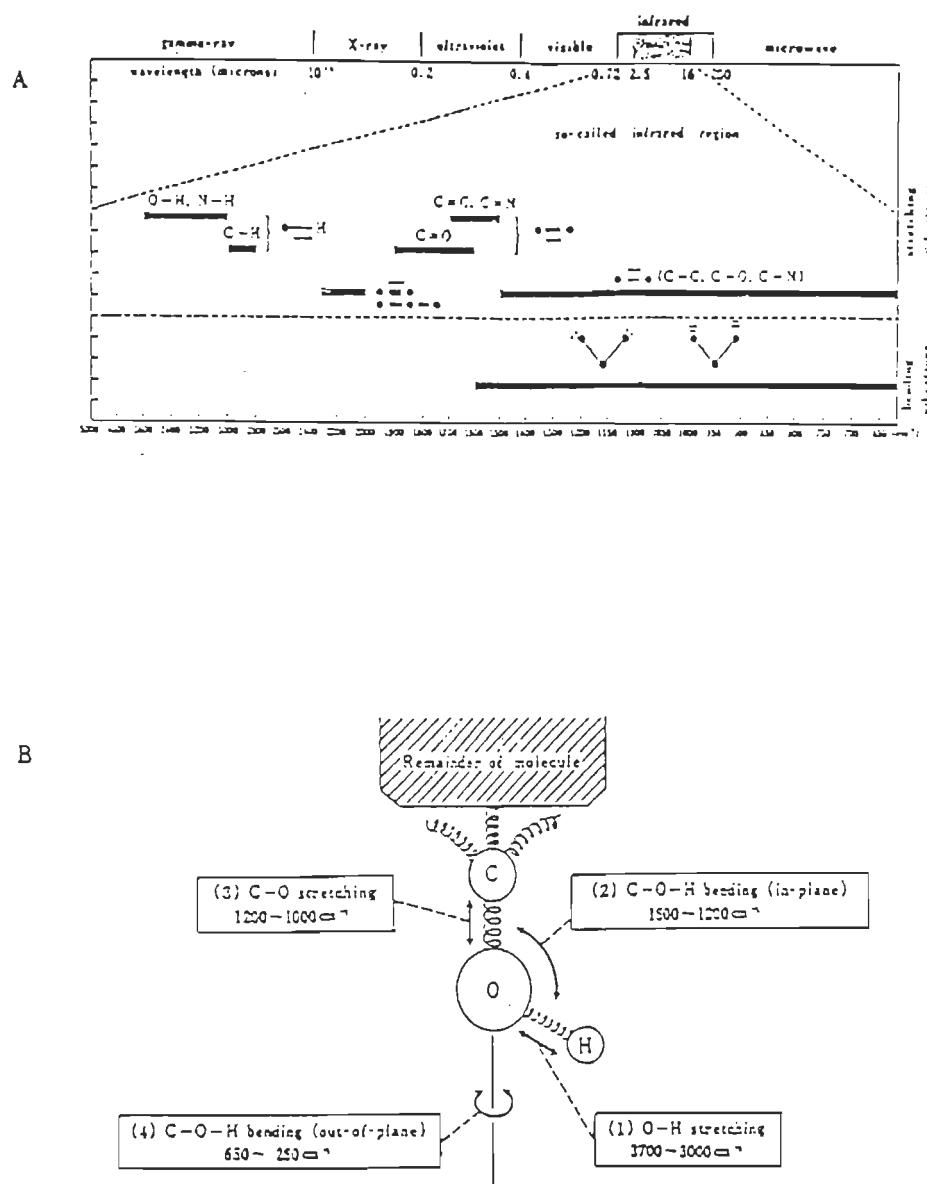
La deuxième étape réside dans le fait qu'il faut trouver des techniques (douces) de dégradation du complexe. Cet aspect a déjà été abordé dans la dernière section: il s'agit de traiter l'extrait à des températures pouvant dégrader légèrement les structures, jusqu'à l'atteinte d'une détérioration prononcée du système, ainsi qu'un deuxième traitement qui ne manque pas d'audace lui non plus, soit une forte illumination dans le but, entre autres, de blanchir les pigments. Une fois ces traitements accomplis, plusieurs tests peuvent être effectués pour s'assurer de l'efficacité de ceux-ci. Un simple spectre d'absorption détermine la gravité de la détérioration que les pigments, entre autres, ont subie. En se référant aux spectres déjà publiés (voir les figures précédentes), il devient plus facile de prédire quels pigments sont affectés et à quel degré. Au niveau du transport d'électrons via la dégradation structurelle, il est possible d'avoir une bonne idée de l'état fonctionnel du complexe, et ce, par la photoréduction du P-700 (Marsho et Kok, 1971; Mathis et al., 1988; Asada et al., 1992, 1993; Mi et al., 1992a et b)). Après ces quelques tests,

nous sommes davantage en mesure d'appliquer différentes techniques biophysiques dans le but d'approfondir les résultats préliminaires ci-haut mentionnés.

#### 1.4.1 La spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge (IR) par transformée de Fourier (IRTF), s'avère une technique de pointe pour défricher ce domaine encore presque vierge... Le spectre infrarouge est considéré comme l'une des plus caractéristiques propriétés d'un composé. échelonné de 0.75 micron (un micron est égal à  $10^{-4}$  cm et exprimé en  $\mu$ ) à 200 microns, donc entre le visible et la région du micro-onde, cette zone est appelée infrarouge (**Figure 11A**). Cependant, ce qu'on appelle la région de l'infrarouge est habituellement couvert entre 2.5 et 50  $\mu$ : la région la plus proche est appelée le proche infrarouge, et la plus éloignée, l'infrarouge lointain (near- and far-). La longueur d'onde de la lumière IR est plus fréquemment exprimée en terme de **nombre d'ondes**, ce qui est la réciproque de la longueur d'onde et se traduit par le **centimètre**. L'unité du nombre d'onde est le  $\text{cm}^{-1}$ . Par exemple, l'échelle de 2.5 à 25  $\nu$  correspond à des nombres d'ondes de 4000 à 400  $\text{cm}^{-1}$ .

Toute molécule est faite d'atomes liés par des liens chimiques. Le mouvement des atomes et les liens chimiques peuvent être comparés à un système de balles et de ressorts constamment en mouvement (**Fig. 11B**). Ces mouvements peuvent être envisagés comme étant la combinaison de deux types de mouvements, les vibrations élastiques et les vibrations de flexions ("stretching" et "bending"). La fréquence de ces vibrations n'est pas seulement dépendante de la nature particulière des liens chimiques eux-mêmes, comme les liens C-H ou C-O, mais est affectée par la molécule entière et son environnement.



**FIGURE 11.** A) Visualisation de certaines vibrations correspondant à la région de la spectroscopie infrarouge, B) illustration des vibrations élastiques et de flexions par le modèle des "balles et des ressorts" (Nakanishi et Solomon, 1977).

La différence entre une molécule et la balle du ressort consiste en ce que les niveaux d'énergie vibrationnelle de cette première sont quantifiés; ce qui implique que seul le faisceau infrarouge, avec une fréquence correspondante (exactement) requise pour éléver le niveau d'énergie d'un **lien**, peut être absorbé. C'est-à-dire que l'amplitude des vibrations particulières est augmentée soudainement et non graduellement. Donc, lorsque l'échantillon est irradié par le faisceau IR, où la fréquence change continuellement, les molécules absorbent certaines fréquences dont l'énergie est consommée en vibrations élastiques ou de flexion, et ce en fonction des liaisons. Le faisceau transmis correspond à la région de non-absorption, donc un enregistrement de l'intensité du faisceau transmis en nombres d'onde ou en longueur d'onde permet d'établir une courbe des bandes d'absorption. C'est le spectre infrarouge.

Il a été mentionné précédemment que les fréquences des liens respectifs dans une molécule sont affectées par tout l'environnement de la molécule. Donc, certains liens ont des caractéristiques distinctives: les liens doubles et triples sont plus forts que les simples, N-H, O-H, C-H, etc. du type X-H, et ont spécifiquement un atome terminal léger, l'hydrogène. Ce qui correspond à un ressort particulièrement robuste ou à une balle terminale légère. Comme le système du ressort, les vibrations de ces liens sont affectées par le reste de la molécule dans une portion minime.

Par ailleurs, on peut séparer ces régions en fréquences collectives: de façon générale la région de 3600 à 1500  $\text{cm}^{-1}$  appartient aux vibrations élastiques. Par contre la région sous 1600  $\text{cm}^{-1}$  appartient aux vibrations élastiques des liaisons simples du type C-C, C-O, C-N, C-halogène, etc. et également aux vibrations de flexion des autres liaisons. De plus, chaque composé a un "patron" dont les molécules vibrent entre 1300 et 650  $\text{cm}^{-1}$  qui est appelé l'**empreinte** (finger print).

Un fait est à souligner qui vient jeter une ombre sur le plat. Une vibration n'est pas nécessairement accompagnée d'une bande

d'absorption en IR, mais seulement lorsque cette vibration cause un changement du moment dipolaire de la molécule; plus grand est le changement plus grande sera l'absorption (Nakanishi et Solomon, 1977). De plus, l'intensité d'absorption est fonction de l'ouverture de la fente, c'est pour cette raison qu'on représente souvent l'intensité sous forme relative: très forte, forte, moyenne...

Il est possible grâce à des tables, de déterminer le ou les types de liens qui correspondent aux bandes d'absorption; et ce pour toutes les liaisons:

1° C-C	(alkane)
2° C=C	(alcène)
3° Aromatiques	(phényle)
4° X-Y, X=Y=Z	
5° -OH, C-O, stéroïde, sucre	(alcool, phénol)
6° -O-	(éther)
7° Amines, sels d'ammonium	
8° C=O	(groupes carbonyles)
9° -NO <sub>2</sub> , -NO	
10° Hétérocycles	
11° -S	(sulfure)
12° -P	
13° Halogènes, sels inorganiques (ex. PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> )	

(voir Nakanishi et Solomon, 1977)

Pour l'étude en cours, la spectroscopie infrarouge reste une méthode de prédilection pour y scruter la face cachée de la structure des complexes du photosystème I...

Il s'avère très important d'apporter une attention particulière au milieu dans lequel baigne l'échantillon: soit le garder dans son propre tampon (environnement le plus naturel possible) puisque que

l'absorption de l'IR est affectée par l'environnement des groupes. Donc, pour ce genre de travail il est tout à fait exclu **d'assécher l'échantillon**, principalement dû au fait qu'il subit une détérioration qui peut varier d'une fois à l'autre (voir la chapitre matériel et méthodes). Et c'est justement dans cette voie qu'il faut travailler, soit sur les modifications causées uniquement par les traitements préalablement discutés. Le problème reste important, l'eau contenue dans l'échantillon吸orbe énormément en infrarouge, allant même jusqu'à masquer complètement les bandes recherchées. Il faut donc connaître avec précision la quantité d'eau contenue dans l'échantillon, et pour ce faire, l'utilisation de fenêtres, de  $\text{BaF}_2$  par exemple, s'avère une technique largement utilisée. Sachant l'épaisseur entre les deux fenêtres (en sandwich), pouvant varier: 6  $\mu$  (Tanfani et al., 1990), 10  $\mu$  (Nabedryk et al., 1990a, b), il est ainsi plus facile de contrôler les paramètres d'extrapolation du spectre. L'utilisation du  $\text{D}_2\text{O}$  (pour la protonation de  $\text{H}_2\text{O}$ ), qui absorbe dans l'infrarouge dans une région peu convoitée pour les expériences de ce type (1500 à 1800  $\text{cm}^{-1}$ ), comporte un avantage de taille mais des désavantages colossaux. En plus de l'aspect technique (centrifugation supplémentaire, perte de matériels...), son utilisation occasionne un déplacement de 1657 à 1554  $\text{cm}^{-1}$  dû aux échanges  $\text{H} \leftrightarrow \text{D}$ , et affecterait également les feuillets  $\beta$  (Chapados et al., 1991; He et al., 1991).

Un autre aspect à ne pas négliger est la concentration de Triton dans l'échantillon, qui aurait un effet non-négligeable sur la conformation des structures secondaires (He et al., 1991). De plus, ce détergent induirait un déplacement vers le bleu du spectre d'absorption de la Chl-a à 690 nm en fonction de sa concentration, le coefficient d'extinction molaire pouvant varier de 63 à 87 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Sonoike et Katoh, 1990). Par contre, Tapie et ses collaborateurs (1984) affirment que le centre réactionnel du PSI ne semble pas être affectée par la digitonine, l'octyl glucoside, le dodécyl maltoside et le Triton X-100: le transport d'électrons a les mêmes caractéristiques que dans la

membrane thylacoïdienne, et l'isolation n'affecte pas l'orientation intrinsèque des pigments dans le complexe. Cette affirmation a aussi été vérifiée par dichroïsme circulaire sur des particules de "P-700-Chl-a protein" avec le Triton X-100 (Shubin et al., 1986). Nous avons donc **lavé** convenablement l'échantillon avant d'effectuer le spectre, afin de minimiser les effets secondaires.

Plusieurs techniques ont été mises au point pour soustraire l'eau (Haris et al., 1986; Powell et al., 1986; Dousseau et Pézolet, 1990; Lee et al., 1990); ces techniques ont l'avantage d'éliminer tout liquide indésirable, et ainsi d'optimiser le spectre.

Le IRTF est donc un bon outil pour étudier les structures secondaires des protéines (Susi et Byler, 1986; Surewicz et Matsch, 1988; Haris et Chapman, 1988; Gerwert, 1992), et aussi pour observer les changements conformationnels (Mantele et al., 1985; Haris et al., 1986, 1990; Alvarez et al., 1987; Surewicz et Matsch, 1988; Nabedryk et al., 1990c; Tajmir-Riahi, 1990; Thibodeau et al., 1990; Ganter et al., 1992; Noguchi et al., 1992). Dans ce cas, il devient primordial d'avoir des points de repère sur les bandes amides pour "suivre" adéquatement les protéines dans leur cheminement (dégradation):

#### AMIDE I:

- vibration élastique --> C=O (plane) faiblement couplé
- C-N (élastique) et N-H (de flexion)

soit:  $\alpha$                      $\sim 1657 \text{ cm}^{-1}$   
 $\beta$                      $\sim 1628 \text{ et } 1638 \text{ cm}^{-1}$   
 $\beta$  (antiparallèle)  $\sim 1650\text{-}1675 \text{ et } 1693 \text{ cm}^{-1}$

- tours (turns)      -->  $\sim 1678 \text{ cm}^{-1}$   
(He et al., 1991)

## AMIDE II:

- vibration de flexion --> N-H fortement couplé avec C-N (élastique)

donc:  $\sim 1545 \text{ cm}^{-1}$

(Nabedryk et al., 1989)

Plusieurs autres informations sont très importantes pour expliquer les changements des protéines:

- changements de conformation  $\alpha$  et  $\beta$  (Nabedryk et al., 1989; Chapados et al., 1991),
- position de plusieurs autres bandes (Mantele et al., 1988),
- le % de conformation  $\alpha$  et  $\beta$  chez les protéines thylacoïdiennes (Nabedryk et al., 1984).

Les fréquences de transitions de ces deux bandes amides sont dépendantes de la conformation secondaire des protéines (Susi et Byler, 1986; Surewicz et Matsch, 1988). L'approximation quantitative des structures a commencé par l'estimation des moindres carrés (Ruegg et al., 1975).

Plusieurs bandes ont déjà été identifiées, par rapport aux structures que je suis susceptible de retrouver, par exemple:

les bandes à  $1700 \text{ cm}^{-1}$  --> P-770 (C=O de la Chl-a)

$1717 \text{ cm}^{-1}$  --> P-700<sup>+</sup> "

$1737 \text{ cm}^{-1}$  (Nabedryk et al., 1990a)

les bandes à  $1083, 965$  et  $931 \text{ cm}^{-1}$  serait attribuées à

$\text{PO}_3^- \text{H}$

$1088$  et  $976 \text{ cm}^{-1}$  serait attribuées à  $\text{PO}_3^{2-}$

(Tajmir-Riahi, 1989)

D'autres bandes sont assignées à des protéines comme les amides A et B dont les fréquences ont été assignées entre 3300 à 2800 cm<sup>-1</sup> (Chapados et al., 1991).

Donc, une protéine ou un complexe protéique contient plusieurs types de structures qui résultent en plusieurs maxima des amides I et II par exemple, ce qui cause des chevauchements. Pour y remédier et décortiquer chacun de ces épaulements, il est possible d'utiliser la déconvolution (Kauppinen et al., 1981; Yang et al., 1985; Byler et Susi, 1986; Holloway et Mantsch, 1989), ainsi que la dérivée seconde (Susi et Byler, 1983; Lee et al., 1985; Dong et al., 1990).

De récentes recherches démontrent des altérations évidentes au niveau des thylacoïdes et du PSII suite à des traitements: il y aurait augmentation de la portion en structure  $\beta$ , et ce, à forte illumination (Telfer et al., 1990, He et al., 1991) ainsi qu'à des températures élevées (He et al., 1991). De plus les hélices  $\alpha$  seraient orientées au moins à 30° (après un traitement aux températures élevées) par rapport à la membrane normale (Nabedryk et al., 1984), et à 20°-25° dans les membranes pures en segments d'hélices  $\alpha$  transmembranaires (Nabedryk et al., 1985; Breton et Nabedryk, 1987). Ces informations feront l'objet d'interprétations futures ainsi que de point d'appui dans la poursuite de nouvelles connaissances dans le domaine.

#### **1.4.2 Chromatographie liquide à haute performance (CLHP)**

La prochaine étape de ce travail consiste donc à connaître l'ensemble des pigments qui composent notre complexe. Cette section a un attrait particulièrement intéressant compte tenu du fait qu'on peut suivre l'évolution des pigments au même rythme que les traitements (dégradation). Une des meilleures techniques expérimentées jusqu'à ce jour pour séparer les pigments d'un

complexe reste le bon vieux CLHP. De récentes publications démontrent qu'il est possible de séparer un nombre très important de pigments de membranes thylacoïdiennes: myxoxanthophyll, nostoxanthine, caloxanthine, zéaxanthine, cryptoxanthine, chlorophylle-a et -a', chlorophylle -b, isocryptoxanthine, echinenone M et M',  $\alpha$  et  $\beta$ -carotène, néoxanthine, violaxanthine, lutéine, anthéraxanthine, lactucaxanthine, taraxanthine, et quelques inconnus (Siefermann-Harms, 1988; de las Rivas et al., 1989; Coufal et al., 1989; Minguez-Mosquera et al., 1991; Almeda et al., 1992; Maeda et Watanabe, 1992). Pour ce faire, une étude préliminaire en chromatographie sur couche mince (CCM) est indispensable pour avoir une idée précise des groupes de pigments présents dans l'extrait (Shiraki et al., 1978), (voir la section suivante).

La chromatographie a été découverte par un botaniste russe, Mikhail Tswett, en 1906. Il réussit à séparer différents pigments végétaux sur une colonne de carbonate de calcium. Les différentes bandes de couleur observées lui ont inspiré le nom de cette nouvelle technique.

La chromatographie est un domaine très vaste, car il existe aujourd'hui plusieurs techniques de séparation faisant appel à cette méthodologie. Toutes ont cependant un point en commun: elles nécessitent une phase mobile pour le transport des produits et une phase stationnaire qui permet leur séparation de concert avec la phase mobile. Les séparations chromatographiques sont basées sur les différences d'équilibre des divers composants d'un échantillon entre la phase mobile et la phase stationnaire.

Les molécules qui ont des interactions plus fortes avec la phase stationnaire étant mieux fixées sur celle-ci, sortiront du système chromatographique après les molécules moins retenus.

En plus du CLHP, plusieurs autres méthodes chromatographiques

(chromatographie liquide sur colonne, chromatographie sur couche mince) ont été utilisées au cours de cette recherche. Compte tenu que ces techniques seront élaborées plus en détails dans le prochain chapitre, je m'en tiendrai ici seulement aux principes généraux de la CLHP.

Cette technique est certainement l'une des plus rapides et des plus sensibles méthodes de séparation et d'analyse des pigments. Cette procédure est largement utilisée tant dans le milieu industriel qu'au niveau de la recherche fondamentale. Pour le type d'expériences ici présentées, il aura fallu maints ajustements et mises au point pour pallier aux exigences du très large éventail de pigments à analyser pour un même chromatogramme. La préparation de l'échantillon et le choix des solvants en mode gradient revêtent une importance capitale.

Les détails de la procédure seront divulgués dans le prochain chapitre. Cette dernière section a donc comme but premier, d'introduire le chapitre suivant.

## CHAPITRE II

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### **2.1 EXTRACTIONS MEMBRANAIRES**

##### **2.1.1 Extraction des PSI-30**

Le corps de cette extraction est basé sur les travaux de Thornber et ses collaborateurs (Shiozawa et al., 1974), par contre des modifications **majeures** ont été apportées, ce qui fait que la méthode sera ici élaborée en détail. Toutes les centrifugations seront effectuées à 4° C et l'expérimentation, à l'obscurité ou en présence de lumière verte.

100 g de feuilles **d'épinard** sont lavées, asséchées et dépourvues du pétiole et de la nervure principale pour garder seulement le limbe. Les feuilles sont homogénéisées dans un tampon de saccharose 0.5 M, NaCl 0.1 M, TRIS base 50 mM et de l'ascorbat de sodium 20 mM à pH 8.0 dans un volume final de 300 ml. L'homogénéisation s'effectue dans un mélangeur commercial, à régime élevé à raison de trois périodes de quinze secondes.

L'homogénat est ensuite filtré sur coton fromage (12 couches), et gardé sur la glace en présence de lumière verte (ces dernières conditions seront préservées jusqu'à la fin).

Pour enlever les débris cellulaires, on centrifuge (Sorval RC-5B avec un rotor SS-34 à godets fixes et ce à 4° C) 1 min à 3000 x g. Le surnageant est centrifugé 10 min à 20,000 x g. Le culot est re-suspendu dans environ 150 ml d'un tampon constitué de NaCl 0.1 M, TRIS base 50 mM, ascorbate de sodium 20 mM et 1 mM d'EDTA à pH 8.0, et

centrifugé pendant 20 min à 30,000 × g (cette dernière procédure doit être répétée deux autres fois). Le culot est re-suspendu avec un volume minimal du dernier tampon.

L'étape qui suit consiste à doser la chlorophylle totale; j'ai choisi d'utiliser la méthode de Porra (1989) et ses collaborateurs comparativement à celle d'Arnon (1949), qui a déjà plus de quarante années d'utilisation, et dont les valeurs sont environ 10 % en deça des valeurs obtenues avec les coefficients de l'équipe de Porra.

A l'extrait on ajoute du tampon Triton 20 % pH 7.4 (Triton X-100 20 % p/p, TRIS base 50 mM, et de l'ascorbate 20 mM), pour obtenir un rapport Triton/Chl de 75/1 (p/p). On incube 10 à 15 min à 4° C à l'obscurité, puis on centrifuge à 27,000 × g pendant 10 min.

Pour la séparation et la purification des complexes protéiques du PSI, la chromatographie sur colonne demeure un des moyens de prédilection. Plusieurs supports chromatographiques peuvent être envisagés: échangeuse d'ions, par affinité, par interactions hydrophobes... La chromatographie par gel d'**hydroxylapatite** ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}_2$ , une forme cristalline du phosphate de calcium), est un outil puissant pour fractionner et purifier les protéines, enzymes, acides nucléiques, virus et autres macromolécules. Ce type de gel est également très versatile compte tenu qu'on peut l'utiliser pour une large échelle de pH (5.5 à 14); il est également stable chimiquement et thermiquement. Pour la suite de la purification, nous utiliserons ce type de support.

Le surnageant est déposé sur une colonne d'**hydroxylapatite** (2 × 12 cm) préalablement équilibrée par un tampon phosphate 10 mM pH 7.0. On lave ensuite la colonne avec ce même tampon phosphate jusqu'à ce que l'éluat soit incolore. La présence d'une bande fortement pigmentée dans le haut de la colonne est caractéristique à cette étape. Un deuxième lavage est amorcé dans la colonne et terminé par

centrifugation: une fois que la colonne est bien imprégnée par le tampon, on retire le gel contenant l'extrait à séparer, puis, on le centrifuge à faible vitesse pendant environ 1 min afin de se débarrasser, principalement des attribut du PSII. En présence d'un tampon Triton 1 % pH 7.4 (Triton X-100 1% (p/p), TRIS base 50 mM, et 20 mM d'ascorbate), on procède à des lavages successifs pour éliminer le surnageant à chaque fois, jusqu'à l'obtention d'un surnageant exempt de chlorophylle (environ 40 centrifugations à vitesse réduite). L'étape suivante consiste à supprimer le Triton de la préparation en procédant à une série de lavages avec le tampon phosphate 10 mM pH 7.0, de la même manière que précédemment. L'étape finale, qui a pour but de libérer le PSI-30 des billes d'hydroxylapatite, s'effectue en lavant une dernière fois le gel, avec une forte concentration en phosphate (0.4 M, pH 7.0). Il suffit de deux à trois lavages pour délivrer les particules membranaires; au-delà de ce nombre, il faut concentrer le matériel pour pouvoir l'utiliser de façon judicieuse. Ce type de particules peut se conserver plus d'un mois à -80° C ou dans l'azote liquide tout en gardant son intégrité structurelle et fonctionnelle.

### 2.1.2 Extraction des LHC-II, PSI-200 et des PSI-100

La présente extraction est basée sur les travaux de l'équipe de Malkin (Bruce et Malkin, 1988). Étant donné que des modifications **majeures** ont également été apportées, les détails de la procédure seront exposés.

La beauté de cette méthode réside principalement dans le fait que chaque étape, peut être interrompue, tout en préservant le résultat final. En adaptant les conditions, il est aisément d'obtenir les particules ci-haut mentionnées, et cela pour une même extraction, minimisant ainsi les fluctuations du matériel expérimental.

J'ai utilisé la même procédure que dans le cas de l'extraction

précédente (voir la section 2.1.1) en modifiant légèrement le tampon d'homogénéisation: saccharose 0.3 M, TRIS-HCl 50 mM, NaCl 10 mM et du MgCl<sub>2</sub> 5 mM. Juste avant utilisation, j'ajoute des inhibiteurs de protéases (acide aminocaproïque, p-aminobenzamine et du PMSF) pour obtenir une concentration finale de 2 mM et cela pour tous les tampons de cette expérience. Après une filtration sur 8 couches de coton fromage, on centrifuge 10 min à 12,000 × g (Sorval RC-5B avec un rotor SS-34). Le culot est re-suspendu dans un tampon NaCl 150 mM, en laissant agir celui-ci au moins 10 min pour s'assurer de la lyse des chloroplastes. On ajoute, à la solution contenant les membranes, une grande concentration de NaBr (2 M) et on laisse barboter légèrement pendant 30 min à l'obscurité et toujours à 4° C. Après avoir dilué dans un égal volume d'H<sub>2</sub>O, on centrifuge à 12,000 × g pour 10 min. L'étape du lavage avec le NaBr, doit être répétée une autre fois. Le culot est re-suspendu dans le tampon d'homogénéisation et re-centrifugé pendant 10 min à 12,000 × g pour ainsi éliminer les résidus de NaBr. On re-suspend dans le tampon d'homogénéisation et on dose la chlorophylle pour avoir une concentration de 3 mg Chl/ml.

On ajoute à la suspension, dans un rapport 1:1 (v/v), un tampon sulfate d'ammonium 10 % (p/v) contenant également du N-octyl β-D-glucopyronoïde à 60 mM (un détergent, qui détruit l'association entre le LHC-II et le complexe du PSI) et 1 % d'acide cholique. On incube à 4° C pendant 30 min en agitant légèrement. On centrifuge 1 h à 250,000 × g à l'aide d'une ultracentrifugeuse Beckman (modèle L7-80, rotor SW-41), afin de séparer le complexe des cytochromes b<sub>6</sub> et f. On re-suspend dans l'eau distillée pour obtenir une concentration en chlorophylles de 1.0 mg/ml. A cette suspension, on ajoute du Triton X-100 (d'une solution 20 %) pour obtenir une concentration finale d'environ 0.5 %, et on l'incube à la température de la pièce en agitant doucement pendant 1 h. On centrifuge 20 min à 48,000 × g pour éliminer les membranes non-solubilisées et les granules d'amidon.

Le surnageant est déposé sur un gradient de saccharose 1.0-0.1 M avec un coussin (2 M) d'environ 4 ml, en présence de 0.02 % de Triton X-100. Les tubes sont centrifugés (ultracentrifugeuse) 20 h à 90,000 × g (rotor modèle SW-28).

La bande du haut, qui est enrichie en LHC-II, est prélevée et congelée à -80° C pour une utilisation ultérieure. Tandis que la bande du bas est constituée de PSI-200 (200 Chl/P-700).

On dilue le PSI-200 avec cinq volumes de tampon TRIS-HCl 20 mM pH 7.6, et on centrifuge 1 h à 250,000 × g (rotor modèle SW-41). Le culot est re-suspendu dans de l'eau distillée pour obtenir une concentration de 0.5 mg Chl/ml. On ajoute du Zwittergent 16 (0.2 % p/v) et du dodécyl-β-D-maltoside (0.15 % p/v), pour effectuer la séparation du complexe protéique et de l'antenne de pigments. On agite légèrement la solution 1 h à 4° C et qui est par la suite déposée sur un gradient de saccharose 1.0-0.1 M comme précédemment. La bande du bas est enrichie en PSI-100 (100 Chl/P700), tandis que la bande du haut contenant essentiellement du LHC-I, est contaminée par du LHC-II.

Il est à noter que tous les tampons ont été complétés non pas avec de l'eau distillée mais avec le tampon d'homogénéisation, donc en présence de saccharose, pour s'assurer de préserver l'intégrité des membranes.

## **2.2 SPECTROSCOPIE UV/VISIBLE**

Les spectres de changements d'absorbance en fonction du temps ou de la longueur d'onde pour les **PSI-30** (photoblanchiment, températures élevées, calcul du rapport Chl/P-700, réduction du centre réactionnel) ont été exécutés grâce à un spectrophotomètre UV-VIS SLM AMINCO modèle DW-2000 en utilisant les deux monochromateurs, dont un comme référence, la résolution étant fixée à 3 nm. Les courbes sont directement reproduites à l'aide d'une table traçante Hewlett-Packard modèle 7470A.

Nous donnant une plus grande versatilité, sans changement notable en comparaison avec le SLM AMINCO, les spectres pour les autres particules membranaires (**LHC-II, PSI-100 et PSI-200**) nous sont livrés par un spectrophotomètre à réseaux de diodes (Hewlett-Packard modèle 8452A).

Dans les deux cas, le tampon de solubilisation des membranes nous sert de référence.

### **2.3 CALCUL DU RAPPORT CHL-a/P-700**

Dans le but de s'assurer de l'équité entre les différentes particules membranaires, tant au niveau de la concentration en chlorophylles que pour consolider la reproductibilité des extraits, la mesure du rapport Chl/P-700 s'impose. Ce rapport nous renseigne, de juste façon, sur la taille de l'antenne de chlorophylle-a principalement et cela en fonction du centre réactionnel.

En utilisant la formule suivante:

$$c = \frac{A(678 \text{ nm}) - A(725 \text{ nm})}{\epsilon l}$$

c = concentration (mM)

A = absorbance

$\epsilon$  = coefficient d'extinction molaire ( $\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

l = parcours optique

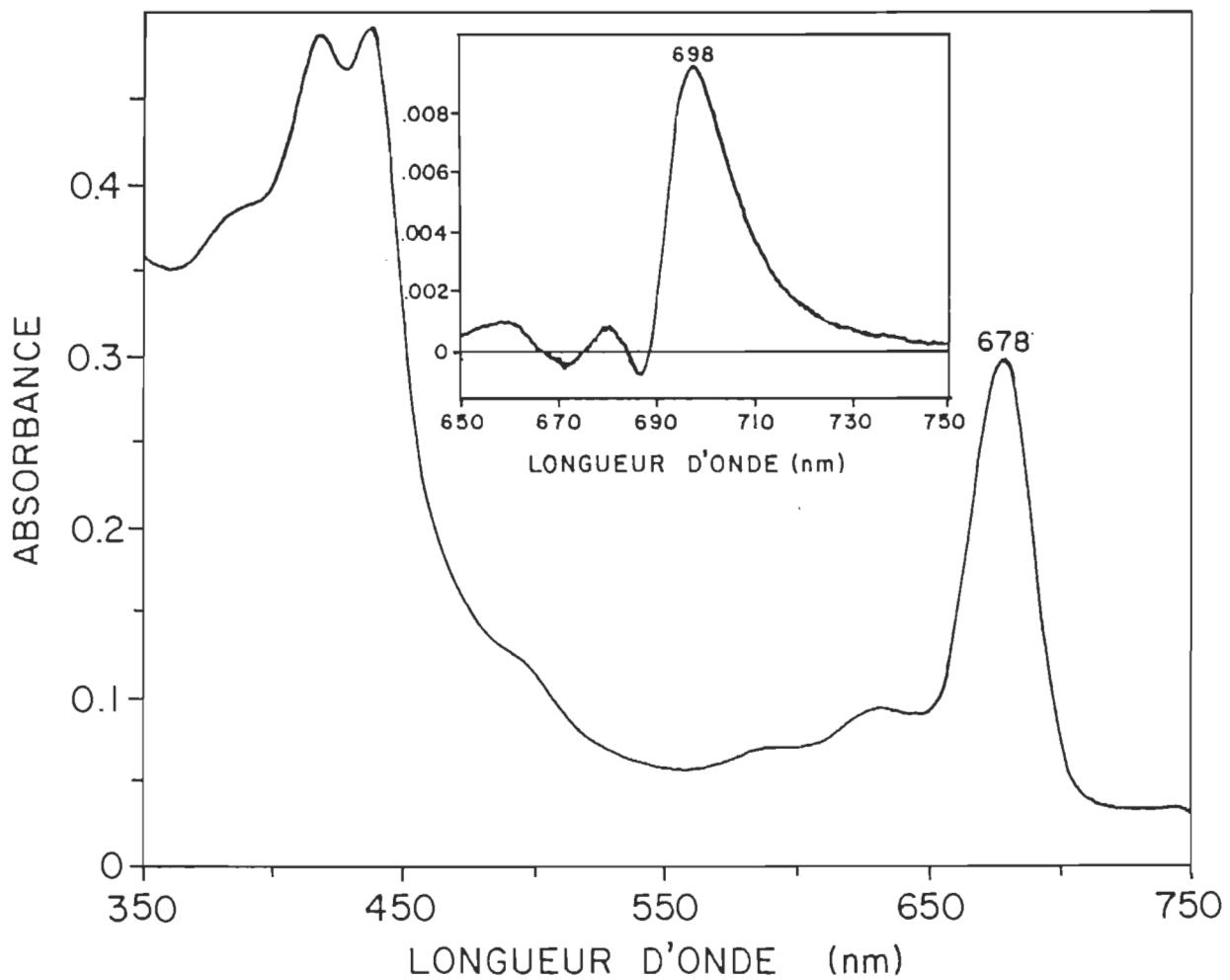
il est possible d'obtenir un rapport fiable.

Un premier spectre d'absorbance est fait pour obtenir la quantité de chlorophylle-a ( $A(678 \text{ nm})$ ) ainsi que le zéro d'absorbance pour ce type de particule ( $A(725 \text{ nm})$ ) pour une concentration de  $10 \mu\text{g Chl/ml}$ . Donc l'absorbance de la chlorophylle-a (à 678 nm pour les PSI-30) est soustraite par l'absorbance à 725 nm pour nous donner l'absorbance réelle. On divise ensuite par le coefficient d'extinction molaire de la Chl-a ( $70 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) et par le parcours optique (1 cm) pour nous donner la concentration en chlorophylle-a.

En utilisant la même formule, il est possible de calculer la concentration de P-700 (698 nm), en utilisant  $64 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  comme

coefficient d'extinction molaire. Un premier spectre est effectué en oxydant complètement le P-700 du complexe soit en présence de ferrycianide de potassium (2 mM) et un second en réduisant le centre réactionnel avec de l'ascorbate (6 mM). L'absorbance à 698 nm de l'extrait réduit moins son absorbance lorsqu'oxydé, nous donne la quantité de P-700 fonctionnels; ainsi en remplaçant les valeurs dans la formule il est aisément d'obtenir la concentration en P-700.

La **figure 12** donne l'exemple de ce type de spectre pour les particules de PSI-30. Etant donné que la procédure est la même pour les autres extraits, je n'ai pas cru bon répertorier les figures sur cet aspect.



**FIGURE 12.** Exemple de spectres afin de calculer le rapport Chl-a/P-700 chez le PSI-30. Spectre d'absorbance du PSI-30, spectre de réduction chimique du P-700 (en mortaise). Le rapport est de  $30 \text{ Chl-a/P-700} \pm 1.5$  (voir le texte). Le rapport pour les particules de PSI-100 et PSI-200 ont été calculées de la même façon (résultats non-montrés).

## 2.4 ÉLECTROPHORÈSE ET DENSITOMÉTRIE

L'électrophorèse ne fait pas partie intégrante des techniques utilisées pour élucider les mécanismes de dégradations des complexes, mais est un outil de premier plan pour déterminer le contenu protéique de chaque complexe.

Pour une meilleure résolution des bandes, nous avons choisi d'utiliser un gel de polyacrylamide sous forme de gradient (10 à 17.5 %). En utilisant une pompe péristaltique, il est possible de couler le gel en gradient continu. Les deux solutions de résolution sont constitués de 40 % d'eau distillée (v/v), **10 % d'acrylamide** (p/v), 25 % de tampon de base (Trizma base 20 mM, LDS 20 % p/v à pH 8.8), 0.9 % de saccharose (p/v), 0.08 % de persulfate d'ammonium (p/v), et 0.05 % de TEMED (v/v), tandis que l'autre solution est constitué de **17.5 % d'acrylamide** (p/v), 25 % de tampon de base, 9.3 % de saccharose (p/v), 0.08 % de persulfate d'ammonium et 0.04 % de TEMED. Le persulfate d'ammonium et le TEMED doivent être ajoutés à la toute fin. Le gradient ainsi formé est coulé entre deux plaques de verre fixées à l'aide d'une unité de gel vertical (Hoeffer Scientific Instruments, modèle SE400). On dépose environ 0.3 cm d'isopropanol sur le dessus du gel pour s'assurer que le dessus du gel soit parfaitement lisse. On laisse polymériser 1 h.

Après avoir asséché les plaques avec un buvard, on insère le peigne et on coule rapidement la solution d'entassement (63 % d'eau distillée v/v, 19 % de tampon de base p/v pH 6.8, 5 % d'acrylamide p/v, 0.16 % de persulfate d'ammonium et 0.1 % de TEMED, (les deux derniers produits ne doivent être utilisés qu'en dernier lieu). La polymérisation dure environ 30 min.

Traitements des échantillons: Les particules membranaires sont préparées afin d'obtenir une concentration de 10 µg Chl/ml. L'échantillon est mélangé dans une proportion de 1 pour 1 avec une

solution de: 25 % de tampon de base pH 6.8 (p/v), LDS 4 % (p/v), glycérol 4 % (p/v), 10 % de mercaptoéthanol (v/v), 57 % d'eau distillée (v/v) et une quantité minimale de bleu de bromophénol. Le mélange est ensuite séparé dans des tubes à eppendorf à raison de 40 µl dans chacun. Afin de bien dénaturer les protéines, on laisse les tubes à la température de la pièce pour au moins 30 min, et on centrifuge quelques secondes pour se débarrasser des particules non-solubilisées.

Après avoir enlevé le peigne, on emplit les réservoirs avec ce tampon: 25 % de tampon TRIS-glycine v/v (0.1 M Trizma-base et 0.77 M de glycine), 0.1 % LDS (p/v) et on complète avec de l'eau distillée. On dépose les échantillons dans les puits ainsi que les standards de poids moléculaire dans les puits latéraux. Le gel est déposé à 4° C, et branché au potentiomètre (17 mA) jusqu'à ce que les protéines aient atteint le gel de résolution; ensuite on augmente le courant à 20 mA.

Coloration/décoloration des gels: Le gel est ensuite déposé pour une à deux heures dans un bac contenant une solution de coloration (0.6 mM de bleu de coomassie, 50 % de méthanol (v/v), 43 % d'eau distillée et 7 % d'acide acétique, v/v) et cela en agitant légèrement. Par la suite le gel est transféré dans une solution de décoloration (20 % de méthanol (v/v), 7 % d'acide acétique (v/v) et 73 % d'eau distillée, v/v), jusqu'à ce que le gel soit complètement décoloré, en prenant soin de changer le tampon quelques fois.

Densitométrie: Les gels ont par la suite été analysés et comparés entre eux, pour une plus grande précision, par densitométrie laser (LKB, modèle Ultroscan XL).

## **2.5 DÉGRADATION SUBLÉTALE**

### **2.5.1 Photoblanchiment**

Les extraits membranaires sont déposés dans une cuvette de quartz de 3 ml avec une concentration de 10 µg Chl/ml (sauf pour les échantillons étudiés par la CLHP où la concentration est de 100 µg Chl/ml et le volume de 250 µl). L'éclairage se fait à 4° C à l'aide d'un faisceau actinique de 150 W (575 W/m<sup>2</sup>), dont l'extrait est protégé par une bouteille d'eau pour minimiser l'absorption de chaleur.

### **2.5.2 Dégradation aux températures élevées**

Ce type de dégradation s'effectue dans les mêmes conditions que précédemment, sauf que la transmission de la chaleur se fait au contact de l'eau. Les échantillons sont placés dans des tubes eppendorf, puis déposés dans un bain d'eau thermostatée pour 10 min (les températures varient de 30° à 90° C).

## **2.6 PHOTORÉDUCTION ET RÉDUCTION CHIMIQUE DU CENTRE RÉACTIONNEL DU PSI (P-700)**

La réduction des centres photochimiques chez les différents extraits de photosystème I, nous renseigne sur l'aspect cinétique du P-700. Dans le but de bien cerner le comportement de celui-ci, deux techniques ont été mises à profit: la réduction chimique et la réduction par la lumière.

### **2.6.1 Réduction chimique**

En ce qui concerne les extraits membranaires, la concentration en chlorophylles est de 10 µg/ml et le volume employé est de 3 ml, chacun des extraits étant dilué dans son propre tampon de suspension. Nous avons utilisé le spectrophotomètre Aminco (voir la section 2.2). Comme dans la section 2.3, le P-700 est préalablement oxydé et ensuite réduit en utilisant de l'ascorbat et cela en utilisant le mode dual, donc 698 nm pour l'absorbance du centre réactionnel et 725 nm comme référence. Les valeurs sont calculées par la formule présentée à la section 2.3, en utilisant  $64 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  comme coefficient d'extinction molaire (Hijima et Ke, 1972).

### **2.6.2 Photoréduction**

Ce type de mesure est effectué dans les mêmes conditions que la réduction chimique, sauf que le réducteur est uniquement la lumière. Deux filtres bleus sont utilisés (Corning, 4-72 et 4-96) afin de protéger le tube photomultiplicatur (Lien et San Pietro, 1979).

## **2.7 CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE (CLHP)**

Les solvants d'élutions contenus dans les réservoirs sont propulsés à travers le système grâce à une ou plusieurs pompes. Celles-ci sont faites de matériaux résistants à la corrosion. Elles doivent générer des pressions allant jusqu'à  $4.2 \times 10^4$  kPa (6000 psi; maximum de 4000 psi pour l'appareil utilisé), sans impulsion, avec des volumes livrés reproductibles. Un contrôleur facilite l'opération des pompes en mode isocratique (phase mobile constante) ou gradient (phase mobile variant au cours de la chromatographie).

La colonne est la partie la plus importante du système de CLHP car c'est dans la colonne contenant la phase stationnaire que s'effectue la séparation. Les gels utilisés sont soit en phase normale, c'est-à-dire que les particules formant le gel sont polaires, soit en **phase inverse**, c'est-à-dire que des greffons non-polaires sont chimiquement liés à la surface d'un substrat solide. En phase normale (gel de **silice**, d'alumine), plus un solvant est polaire, plus sa force d'élution, c'est-à-dire sa capacité à désorber les composantes de l'échantillon de la phase stationnaire, est grande. En phase inverse, plus un solvant est non-polaire, plus sa force éluante est grande (Gallant, 1990).

Le choix de la phase mobile est critique pour la réussite de la séparation. Malheureusement, la seule façon de déterminer la phase mobile à utiliser est encore l'essai-erreur, en connaissant les effets de polarité discutés plus haut.

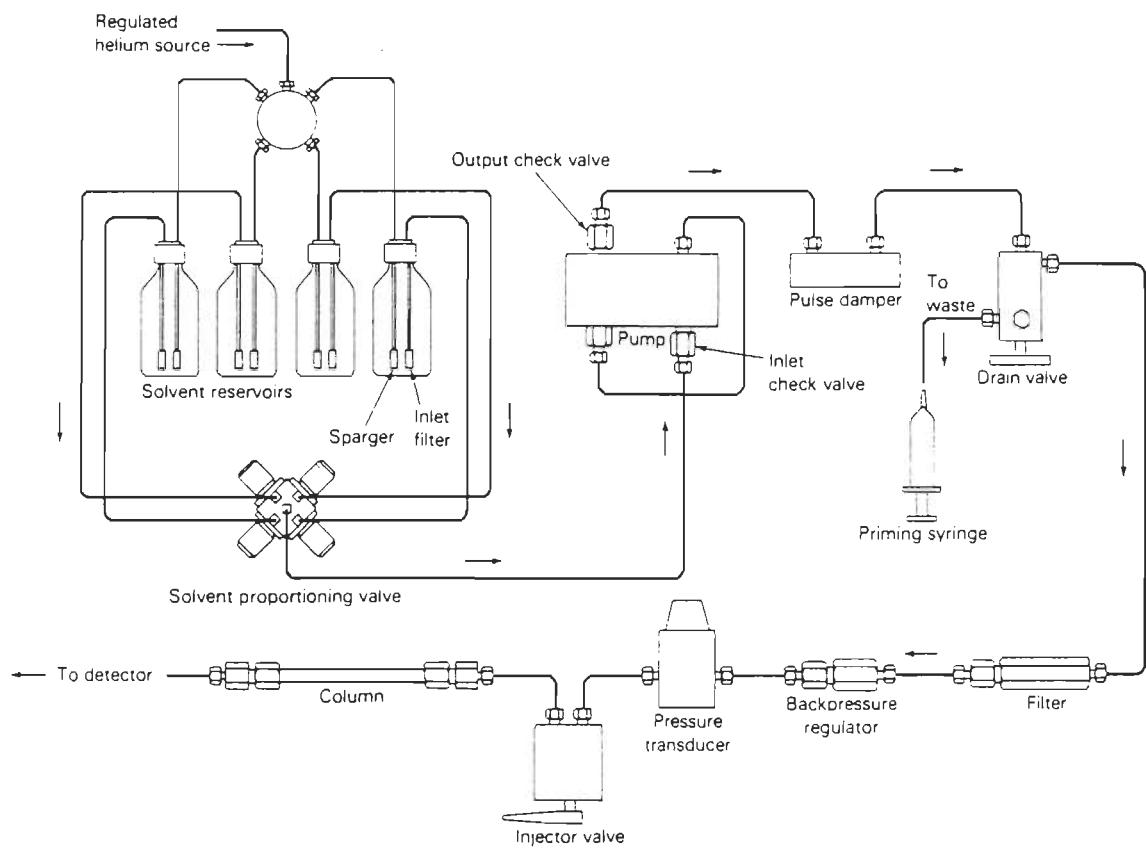
Pour avoir une juste idée des groupes de pigments contenus dans chacun des extraits et surtout pour comparer la présence et la quantité des pigments par rapport aux autres, il nous fallait une méthode fiable, qui tienne compte de la concentration des pigments.

Les valeurs qu'on obtient en CLHP sont en volts, ce qui est proportionnel à l'absorbance, donc à la concentration du pigment. Ces valeurs sont très relatives compte tenu: a) que chaque pic est détecté à 440 nm, ce qui ne correspond pas nécessairement à leur maximum d'absorption respectif, b) que chaque pigment, lors de la séparation, baigne dans un mélange de solvants qui lui est propre, compte tenu que nous avons utilisé un gradient, son absorbance variera donc en fonction de celui-ci, c) et enfin chaque pigment a son propre coefficient d'extinction molaire.

Pour palier à ces lacunes, nous avons également eu recours à la chromatographie sur couche mince (CCM, voir la section 2.8).

Système chromatographique: Nous avons utilisé un système de contrôle 600E (Waters) ainsi qu'un détecteur 484 (Waters), informatisé par le programme "Baseline 810" (voir la **figure 13**).

La détection se fait à 440 nm. La technique utilisée a été élaborée par Siefermann-Harms (1988), puis modifiée dans notre laboratoire. Les différences fondamentales résident principalement dans les proportions des solvants et le temps que chacun d'eux passe dans la colonne (**tableau 3 et 4**). Il est à noter que les temps (du tableau 4) peuvent varier sensiblement, dans le but de maximiser la résolution des pics.



**FIGURE 13.** Représentation schématique de l'appareil à chromatographie liquide à haute performance (Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, CT).

**TABLEAU 3.** Indice de polarité des solvants utilisés

SOLVANTS	INDICE DE POLARITÉ
Hexane	0.0
Acétonitrile	6.2
Méthanol	6.7
H <sub>2</sub> O	9.0

**TABLEAU 4.** Chromatographie isocratique et par gradient des solvants utilisés.

TEMPS (min)	VITESSE (ml/min)	MÉTHANOL (%)	HEXANE (%)	ACÉTONITRILE (%)	H <sub>2</sub> O (%)
0	2.0	78	0	20	2
4.0	2.0	78	0	20	2
8.0	2.0	8	0	91	1
15.0	2.0	83	17	0	0
19.0	2.0	83	17	0	0
20.0	2.0	78	0	20	2

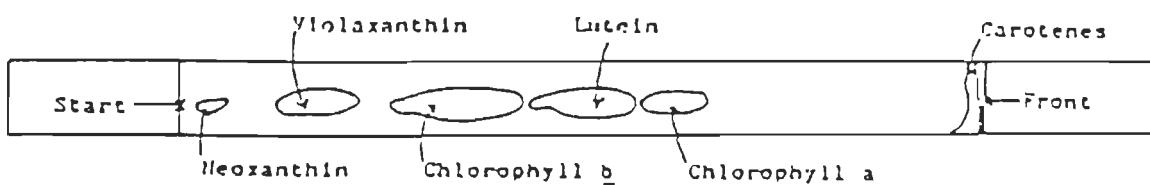
Dans les préparations de photosystème I, les protéines sont précipitées en centrifugeant dans une solution 100 % d'acétone. La séparation des pigments présents dans le surnageant est effectuée à la température de la pièce à l'aide d'une colonne Nova-Pak C<sub>18</sub> (-Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CH<sub>3</sub>, dimension 8 X 100 mm, remplie avec des particules sphériques de 4 µm, "end-capped"). La colonne est protégée par une pré-colonne (Guard-pak). Pour l'expérience, nous avons utilisé le mélange de solvants indiqué au tableau 4. La vitesse de propagation est de 2 ml/min. La concentration en Chl pour chaque type de particules est de 100 µg Chl/ml, dans un volume de 150 µl.

L'injection est très importante car plus les quantités injectées sont petites, plus il risque d'y avoir des variations importantes de précision. La séparation chromatographique est aussi importante car une bonne résolution et la présence de pics étroits et symétriques rendent la mesure de la surface sous les pics plus facile.

La présence d'air dans la phase mobile mène à courte échéance à la formation de bulles d'air qui deviennent emprisonnées dans les différentes parties du système. Ces bulles peuvent interférer dans le bon fonctionnement des pompes, des soupapes de contrôle, des détecteurs en donnant des résultats néfastes en affectant la reproductibilité des temps de rétention ou la sensibilité des détecteurs. Nous avons réglé ce problème par le dégazage, soit en injectant de l'hélium dans les solvants.

## 2.8 CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

L'extrait des pigments de chaque préparation membranaire obtenu dans l'acétone est déposé sur une plaque de silice et les pigments sont séparés par la migration d'un mélange de solvants (Shiraki et al., 1978). En se basant sur les travaux de Shiraki (figure 14) on peut localiser six pigments. Les distances de migration répertoriées dans la littérature (qui sont proportionnelles aux solvants utilisés), confirment la nature de ceux-ci (Bolliger et König, 1969).



**FIGURE 14.** Exemple d'un chromatogramme en couche mince sur gel de silice d'un extrait de pigments (dans l'acétone 80 %) développé dans un système de solvants composé de tert-Butyl alcool : pentane dans un rapport 1 : 9. (Shiraki et al., 1978).

**i)** Chaque point pigmentaire ainsi séparé, est prélevé et solubilisé dans 1 ml de **diéthyle éther** (solvant pour lequel nous avons le coefficient d'extinction molaire pour chacun des pigments). Ce mélange est centrifugé pour se débarrasser de la silice, et l'absorbance de chacun d'eux est prise à la longueur d'onde correspondant à leur maximum d'absorption respectif. Compte tenu du solvant, les longueurs d'ondes sont respectivement: 437 nm pour la **néoxanthine**, 439 pour la **violaxanthine**, 453 pour la **chlorophylle-b**, 444 pour la **lutéine**, 428 pour la **chlorophylle-a** et enfin 450 pour le **β-carotène** (Lichtenthaler, 1987; Humbeck et al., 1989; Khachik et al., 1992).

Afin d'obtenir la concentration respective des pigments, nous avons utilisé la loi de Beer-Lambert (voir la section 2.3):

$$C = A/\varepsilon l$$

La concentration (mM) de chaque pigment est donc calculée en divisant l'absorbance (à la longueur d'onde respective) par le coefficient d'extinction molaire (livré par la littérature en mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>); (voir le **tableau 5**) et le parcours optique (1 cm).

**ii)** La séparation des pigments par la chromatographie sur couche mince est faite une deuxième fois, mais en solubilisant les points pigmentaires obtenus dans le mélange de solvants correspondant au mélange de la séparation lors de la CLHP. L'absorbance est cette fois-ci prise à **440 nm**. Connaissant maintenant la concentration en mM de chaque pigment, compte tenu que le volume déposé lors de cette chromatographie et la concentration en Chl-a est identique à ceux de la chromatographie précédente, il est aisément de calculer le nouveau coefficient d'extinction molaire.

**TABLEAU 5.** Valeurs des coefficients d'extinction molaire (littérature) aux longueurs d'ondes correspondant au maximum respectif d'absorption dans le diéthyle éther et à 440 nm (calculé expérimentalement) dans leur solvant de séparation respectif.

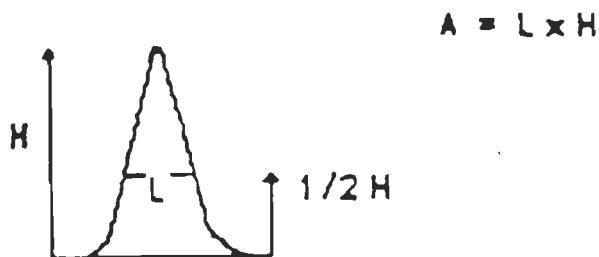
PIGMENTS	COEFFICIENTS (litt.) ( $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )	COEFFICIENTS (exp.) ( $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )
----------	--	---

Chl-a	428 nm ---> 127	440 nm -> 29 ( $\pm 3.2$ )
Chl-b	453 nm ---> 168	440 nm -> 80 ( $\pm 5.1$ )
Lutéine	444 nm ---> 200	440 nm -> 185 ( $\pm 6.0$ )
Néoxanthine	437 nm ---> 65	440 nm -> 60 ( $\pm 4.0$ )
Violaxanthine	439 nm ---> 155	440 nm -> 148 ( $\pm 2.3$ )
$\beta$ -carotène	450 nm ---> 250	440 nm -> 225 ( $\pm 7.0$ )

iii) En utilisant la même formule (loi de Beer-Lambert), nous pouvons maintenant calculer la concentration de chaque pigment, en utilisant l'absorbance à 440 nm directement sur le chromatogramme de la CLHP et le nouveau coefficient d'extinction molaire calculé en ii).

Plusieurs méthodes sont disponibles pour la mesure des pics. 1° La coupe et la pesée des pics est une méthode d'utilisation très facile pour les gens qui aiment le bricolage et qui sont patients... Dans ce cas, la masse du pic est reliée à la concentration. La non-uniformité du papier

et dans le cas de très petits pics, cela peut amener des erreurs. 2° La mesure de la **hauteur du pic**, mais elle est relativement imprécise, principalement dans le cas où les pics, sur un même chromatogramme, n'ont pas une fonction gaussienne classique. 3° **Les intégrateurs mécaniques et les ordinateurs** fournissent des résultats très précis en autant que les paramètres d'intégration sont bien ajustés. 4° Et enfin **la triangulation**, la technique que nous avons utilisée, qui est la plus simple pour calculer l'aire d'un pic. Elle consiste à multiplier la largeur du pic à demi hauteur par sa hauteur:



Elle est par contre imprécise avec des pics ayant une trainée. Cette méthode est plus précise que d'utiliser la hauteur du pic multipliée par la base divisée par deux ( $A = H \times B/2$ ), à cause de l'imprécision dans la détermination de la base du triangle.

Les valeurs obtenues par la CLHP sont très relatives; la CCM est donc beaucoup plus précise pour évaluer la concentration des pigments. Par contre la CLHP est une technique reproductible et donc bien adaptée pour suivre les faibles variations durant la photodégradation. Il est à noter que ces procédures ont été exécutées avec les particules de PSI-200, afin de s'assurer que tous les pigments soient présents.

Cette même procédure a également été utilisée pour les extraits

traités à de fortes illuminations. En guise de contrôle, la dégradation de chaque pigment a été comparée avec les résultats de la CLHP et cela après 20 secondes d'illumination (correspondant à environ 50 % de la dégradation pigmentaire). Aucune différence significative ne fut enregistrée entre ces deux méthodes d'évaluations (contrôle et après 20 secondes d'illumination), lors du photoblanchiment.

Cette procédure permet d'obtenir le rapport molaire entre les pigments pour un extrait donné. Dans le but de comparer les quantités de pigments entre eux, mais aussi entre les différents extraits, nous avons évalué les pigments par rapport au P-700, sachant que chaque particule membranaire contient le même nombre de chlorophylles (Chl-a + Chl-b, voir tableau 7).

## 2.9 SPECTROSCOPIE INFRAROUGE PAR TRANSFORMÉE DE FOURIER

L'infrarouge est une technique qui, pour ce projet de recherche, permettra de suivre "l'évolution" des protéines contenues principalement dans le complexe **PSI-30**.

### 2.9.1 L'instrumentation

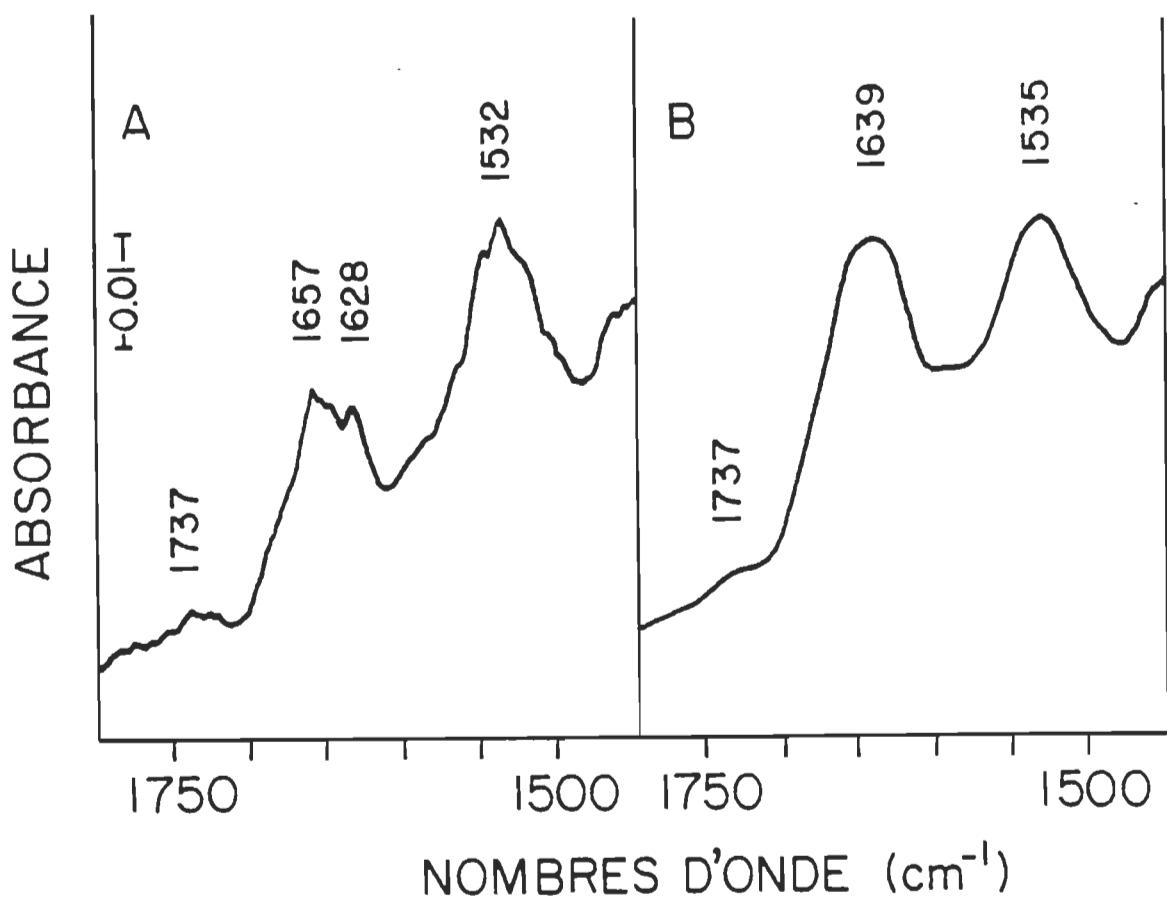
Les spectres infrarouges ont été enregistrés sur un appareil DA3-0.02 (Bomem-FTIR) équipé d'un système de refroidissement à l'azote liquide et d'un détecteur HgCdTe.

### 2.9.2 Mesures/état membranaire

Comme nous l'avons mentionné dans la section 1.4.1, la principale difficulté lors d'expériences où l'intégrité du matériel se doit d'être préservée, est la présence d'eau (tampon) qui vient masquer les bandes à étudier.

Une des techniques les plus largement employées est l'utilisation de fenêtres de BaF<sub>2</sub>. Compte tenu que les fenêtres sont en position verticale, il est fortement recommandé de sécher l'échantillon avant la mesure. Cette façon de faire donne d'excellents résultats en ce qui a trait à la résolution; par contre, l'intégrité des membranes en prend un dur coup. La **figure 15** nous montre deux spectres de PSI-30, l'un avec la technique des fenêtres de BaF<sub>2</sub>, et l'autre avec une autre technique, qui sera discutée à la section 2.9.3, suivant laquelle l'échantillon est natif, donc dans son propre tampon. Les protéines de ce type de complexe membranaire, comme le révèle cette figure, contiennent une certaine proportion de feuillets  $\beta$ . Cette proportion tend à diminuer fortement avec le temps de séchage, étant donné qu'il faut environ 40

h, à la température de la pièce, pour s'assurer de faire évaporer le maximum d'eau. Il m'apparaît donc essentiel de procéder aux mesures avec des échantillons **en solution**, sans quoi la nomenclature préalablement choisi pour décrire l'extrait devrait lui aussi varier avec le temps et le traitement...



**FIGURE 15.** Spectres infrarouges par transformée de Fourier des complexes de PSI-30 par la méthodes A) d'ATR contrôle, B)  $\text{BaF}_2$  (séché 40 h). La concentration de l'échantillon est de 10  $\mu\text{g Chl/ml}$ .

### 2.9.3 Atténuation totale de la réflexion (ATR)

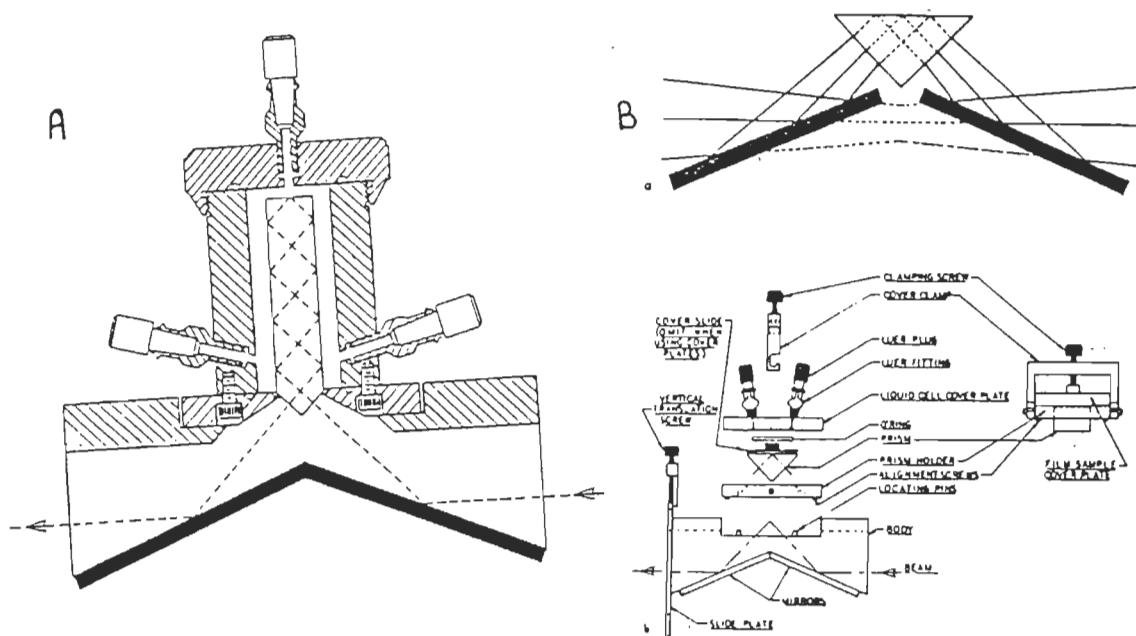
Le choix du support et de l'état des membranes pour optimiser la mesure, ont été faits par une série d'expériences:

i) L'utilisation des **fenêtres de BaF<sub>2</sub>** a été la première technique utilisée, mais pour les raisons mentionnées antérieurement, nous avons préféré nous tourner vers une avenue où l'intégrité serait de mise...

ii) La technique de "l'atténuation totale de la réflexion" (ATR), en est une d'avant garde qui permet une plus grande précision tout en gardant l'échantillon dans son milieu naturel. La cellule du **prisme à 9 réreflections** (Harrick, PLC-19M; prisme en ZnSe à 45°) fut utilisée avant tout car cela permettait d'employer un grand volume d'extrait avec précision (**figure 16A**). Ce volume peut également être diminué, mais le nombre de réreflections s'en trouve évidemment affecté. Cette appareil semblait parfait, sauf que l'impressionnante quantité d'eau était très difficile à éliminer mathématiquement. Le faisceau laser parcourt une trop grande distance dans un liquide très dilué (10 µg Chl/ml) pour ne pas masquer les bandes amides par exemple.

iii) La cellule du **prisme à une réflexion** (Harrick, PLC-11M; prisme en ZnSe à 45°) semble être tout indiquée dans le but de maximiser le rapport du signal échantillon/tampon, pour ce type d'expérience (**figure 16B**). 5 µl d'extrait à 10 µg Chl/ml est déposé directement sur le prisme, puis recouvert d'un couvercle. De cette façon nous nous assurons de la reproductibilité quant à la concentration de l'échantillon (Harrick, 1960; Fahrenfort, 1961; Katlafsky et Keller, 1963; Frech, 1968).

Les spectres sont enregistrés avec une résolution de 2-4 cm<sup>-1</sup>. La soustraction de l'eau (tampon) s'effectue en utilisant comme ligne de base la région 2200 cm<sup>-1</sup>, comme élaboré par la méthode du professeur Pézolet (Dousseau et al., 1989).



**FIGURE 16.** Représentation schématique de la cellule à prisme A) à neuf réflections, B) à une réflexion.

## CHAPITRE III

### RÉSULTATS ET DISCUSSION

Ce chapitre est construit de façon chronologique, soit selon l'ordre dans lequel les expériences ont été conçues. Cette approche est capitale pour bien comprendre la justification et l'orientation que prendra le type de techniques utilisées.

Nous utiliserons quatre types membranaires aux particularités distinctes. Pour chacune d'elles, la première étape est d'établir, de façon globale, la dégradation des pigments en relation avec de fortes illuminations ou de hautes températures. Suite aux résultats obtenus, des études plus approfondies seront entreprises sur la relation pigments/protéines, sur la dégradation de la chlorophylle-a en fonction de l'activité photosynthétique et enfin, plus spécifiquement, sur le rôle des groupes pigmentaires (chlorophylles, carotènes et xanthophylles).

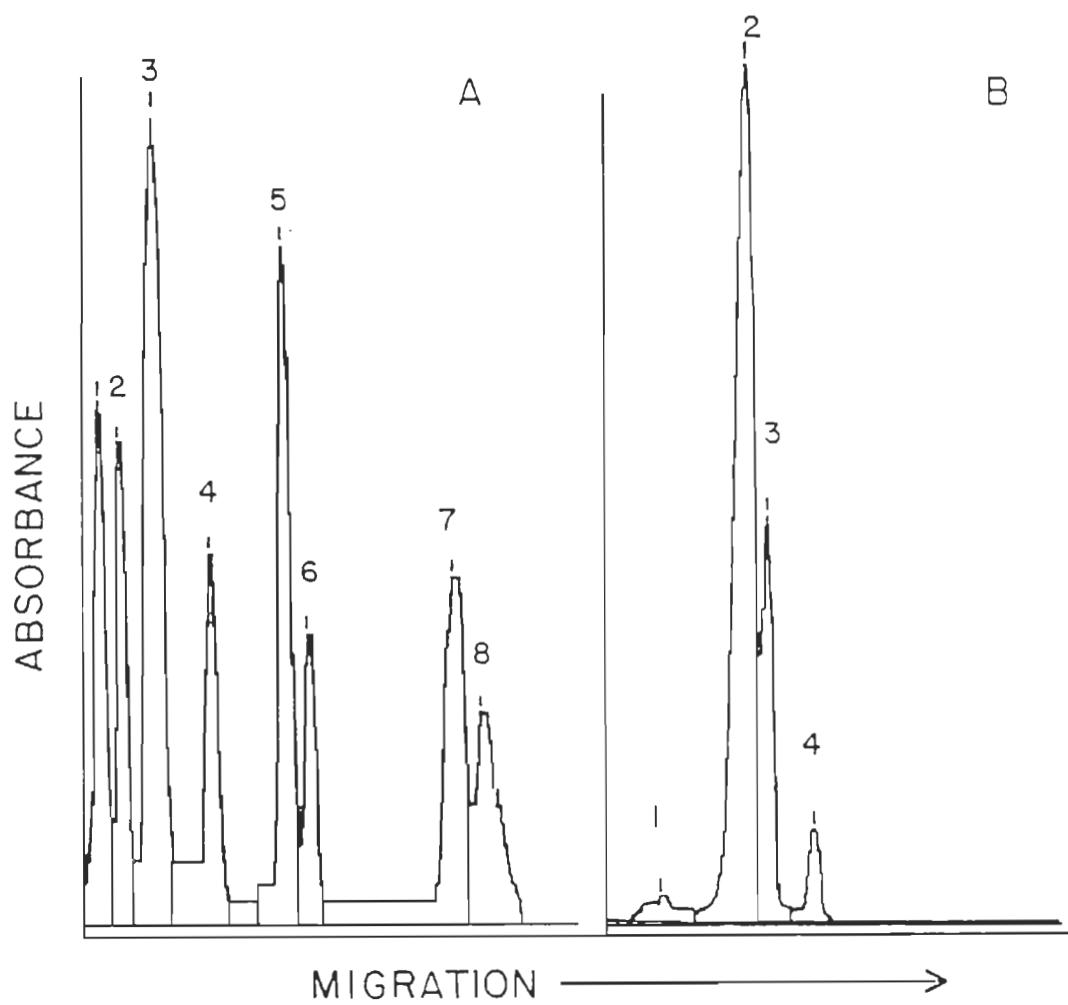
Les expériences effectuées à plusieurs reprises (minimum en triplicata) et les résultats sur les quatres types membranaires qui en originent, sont très similaires. Donc, afin d'alléger le texte, nous présenterons seulement les figures **pertinentes** et dont l'intérêt résume bien les idées lancées.

### **3.1 ÉVALUATION DE LA PHOTODÉGRADATION PIGMENTAIRE PAR SPECTROSCOPIE**

En premier lieu, il est essentiel de bien connaître le contenu protéique de chaque type membranaire. Les trois particules contenant le centre réactionnel P-700, soit le PSI-30, le PSI-100 et le PSI-200, ont été choisies, parmi plusieurs intermédiaires (où le contenu en protéines et en pigments diffère), pour leurs similitudes au niveau protéique. Ces complexes de protéines sont formés par les sous-unités mentionnées à la section 1.1.2. Il était capital pour la bonne marche des expériences mais également pour faciliter la discussion en ce qui a trait à la dégradation pigmentaire, que les sous-unités soient représentées de façon **égale et proportionnelle** (même protéines et dans des proportions identiques). De plus, il est important de s'assurer qu'il n'y a pas de dégradation ou d'agrégation protéique (différent d'un extrait à l'autre, lors des procédures d'isolation), influençant ainsi le flux photonique et la transmission de chaleur. Donc, à ce niveau, "suivre" le mode d'action (transfert énergétique) des pigments demeure intelligible, et exempt de facteur intermédiaire (différence au niveau des protéines et de leurs associations aux pigments).

L'**électrophorèse** nous permet, avec justesse, d'établir les types de sous-unités contenus dans chaque complexe (**figure 17**). Les trois particules membranaires mentionnées auparavant, sont identiques au point de vue protéique, à l'exception du PSI-200 qui contient les quatres protéines du LHC-I.

La quatrième particule membranaire, le LHC-II mobile, extraite au niveau du PSI, est constituée de quatre protéines seulement (**figure 17 B**). La similitude, autant par le poids moléculaire que par la quantité respective des protéines entre cette antenne de pigments et le LHC-I, est telle, qu'un seul densitogramme est nécessaire pour bien visualiser l'ensemble protéique de ces complexes.



**FIGURE 17.** Analyse de la composition polypeptidique par densitométrie laser. **A)** PSI-30; 1 = PSI-A, 2 = PSI-B, 3 = PSI-D, 4 = PSI-F, 5 = PSI-L, 6 = PSI-E, 7 = PSI-G et 8 = PSI-C et **B)** du LHC-II; 1 = 28 kDa, 2 = 24 kDa, 3 = 23 kDa et 4 = 20 kDa.

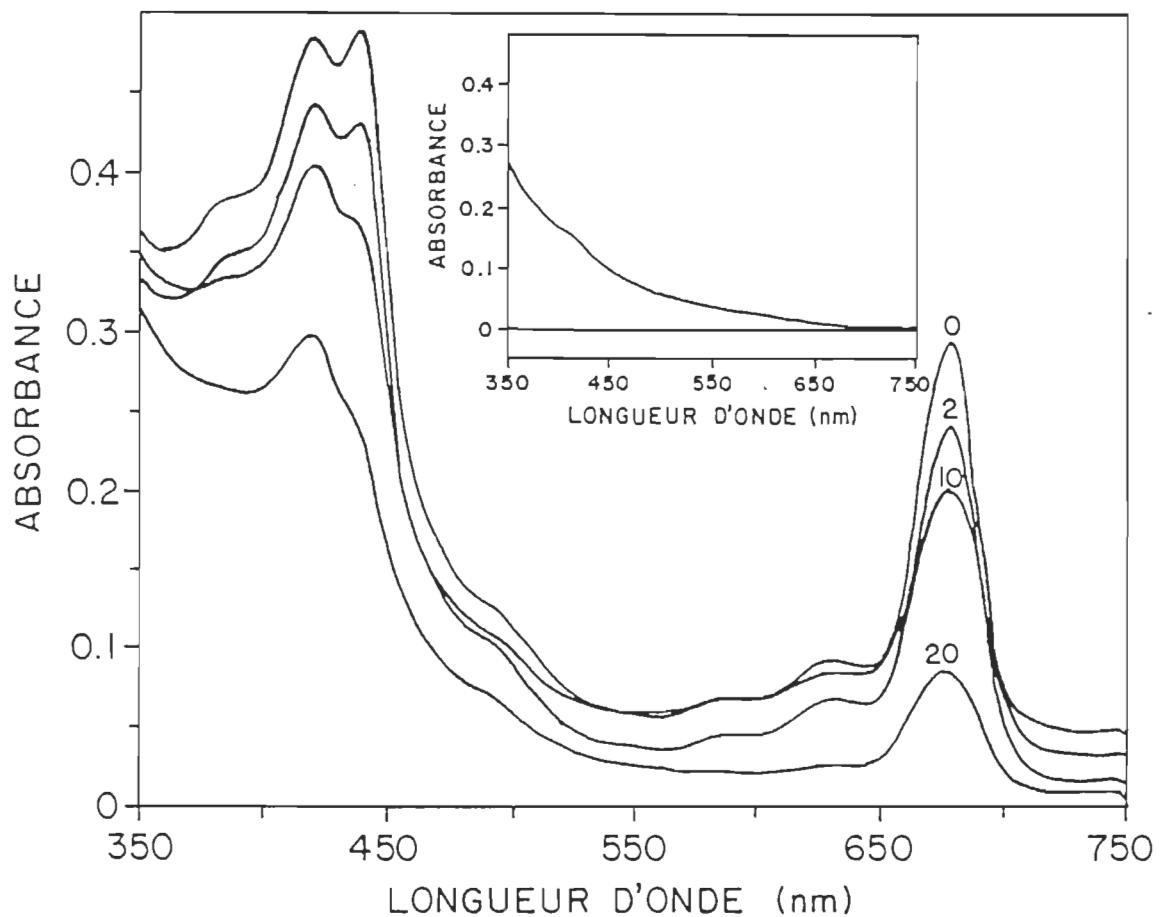
## Le photoblanchiment des complexes protéiques

De façon très générale, la **figure 18** nous renseigne sur la dégradation des pigments contenus dans le PSI-30. Compte tenu de sa simplicité pigmentaire relative (elle est également dépourvue en Chl-b), cette particule membranaire nous guidera dans la compréhension et dans la continuité logique de notre cheminement.

Cette figure montre la présence de chlorophylle-a (pics majeurs à 678 et 439 nm) et de caroténoïdes (épaulement à 491 nm). Avec les temps d'illumination utilisés, soit 2, 10 et 20 min (sur un ensemble de spectre, de 0 à 300 min), nous avons le loisir de cerner la dégradation des pigments dans leur ensemble, mais aussi l'un par rapport à l'autre. A ce stade-ci de l'expérimentation, il n'est pas pertinent d'évaluer avec précision la dégradation d'un pigment en particulier; mais plutôt de comparer le comportement distinct par groupes de pigments.

Quoique nous ayons sélectionné des temps d'illumination représentatifs, pour bien y visualiser la perte relative d'absorbance pour chaque pic, il est très difficile, avec ce type de spectres, de "suivre" avec certitude un pigment et de le comparer avec le pourcentage de dégradation d'un autre. Pourtant ces données sont primordiales pour bien traduire le comportement comparatif des pigments.

A titre d'exemple, deux pics ont été sélectionnés dans le but de comparer l'altération de deux pigments différents. Nous avons choisi le pic à 410 nm, et le pic à 678 nm.

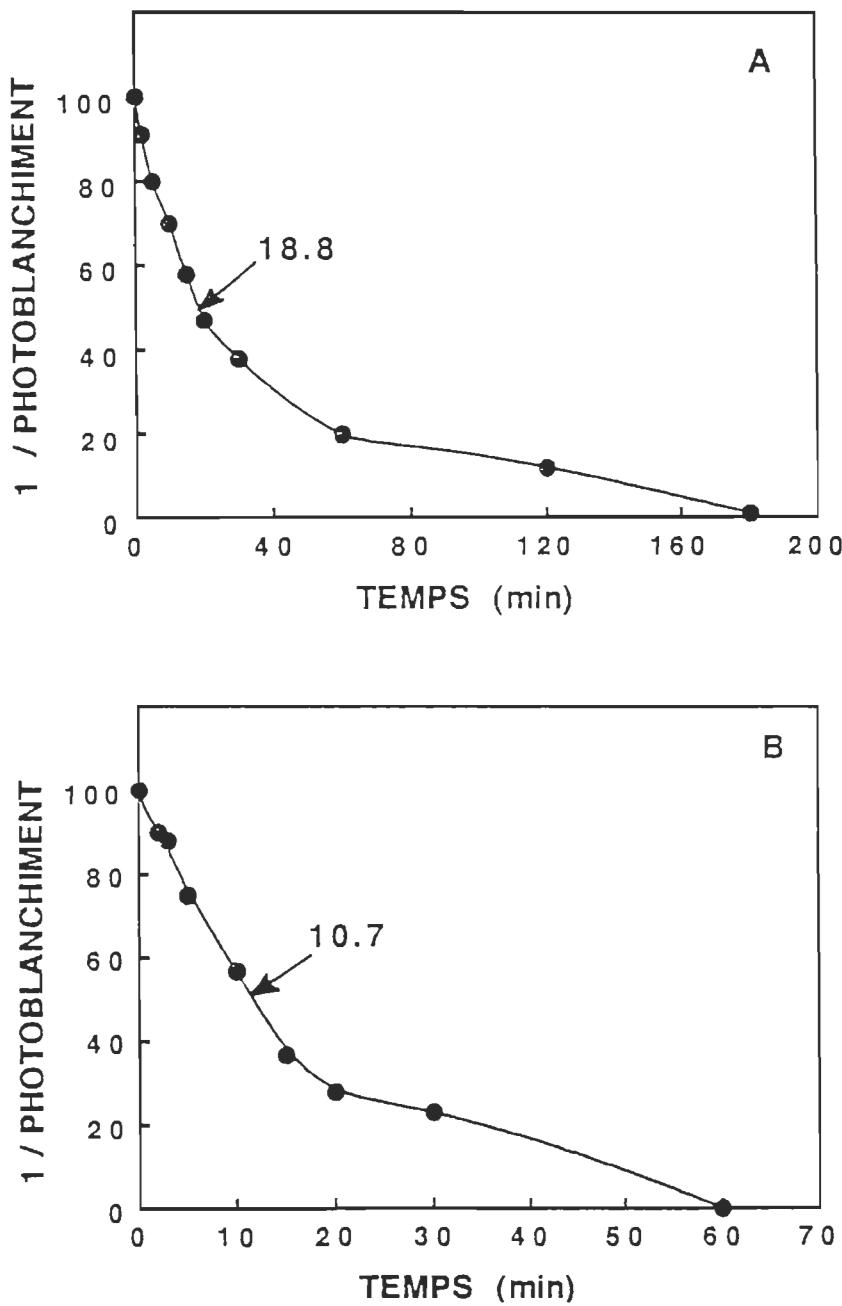


**FIGURE 18.** Spectres d'absorption des PSI-30 en fonction du temps d'illumination; spectre d'absorption après 300 minutes d'illumination (en mortaise).

La figure 19 nous montre, pour ces deux pics, la dégradation du pigment en fonction du temps. Ces pigments semblent se comporter de façon similaire. Ces graphiques ont été obtenus en soustrayant l'absorbance par tranche de 10 % (pour obtenir 10 points représentatifs), en se basant sur le spectre de photoblanchiment maximum, soit après 300 min d'illumination (figure 18).

Un bon moyen d'estimer la vitesse d'altération des pigments qui est largement employé dans la littérature, consiste à mesurer graphiquement le temps requis pour affecter 50 % des pigments ( $I_{50}$ ). Les valeurs obtenues,  $18.8 \text{ min} \pm 1.1 \text{ min}$  (à 410 nm) et  $10.7 \text{ min} \pm 0.7 \text{ min}$ , sont statistiquement significatives. Il semble donc, à la lumière de ce test, que les pigments d'un même extrait membranaire et dans les mêmes conditions expérimentales et de traitements, se dégradent à des vitesses variables.

La question qui reste en suspens à ce stade-ci est déterminante pour le reste de la stratégie expérimentale. Le rôle de chacun des pigments varie-t-il en relation avec son environnement immédiat (interactions avec les lipides et les protéines), avec son emplacement tridimensionnel dans le complexe membranaire (en périphérie ou près du centre réactionnel) ou encore est-ce son identité structurale qui lui procure cette souplesse ?



**FIGURE 19.** Dégradation A) du pic à 410 nm et B) du pic à 678 nm chez des particules de PSI-30 en fonction du temps (voir le texte).

La poursuite de la recherche touchera principalement la comparaison des différentes particules membranaires présentées antérieurement, dans le but d'y déceler une différence notable.

En principe, le photoblanchiment en excès devrait être observé seulement pour les holochromes situés à la fin de la migration énergétique parce qu'ils reçoivent une plus grande portion de l'excès d'énergie (Miller et Carpentier, 1991).

Les recherches pour cette partie de chapitre se concentreront principalement sur la **chlorophylle-a**. Ce pigment est non seulement intéressant par son abondance et sa localisation multiple dans le complexe, mais aussi parce que le centre réactionnel (P-700) est très probablement constitué d'un dimère de chlorophylle-a (van Kan et al., 1990).

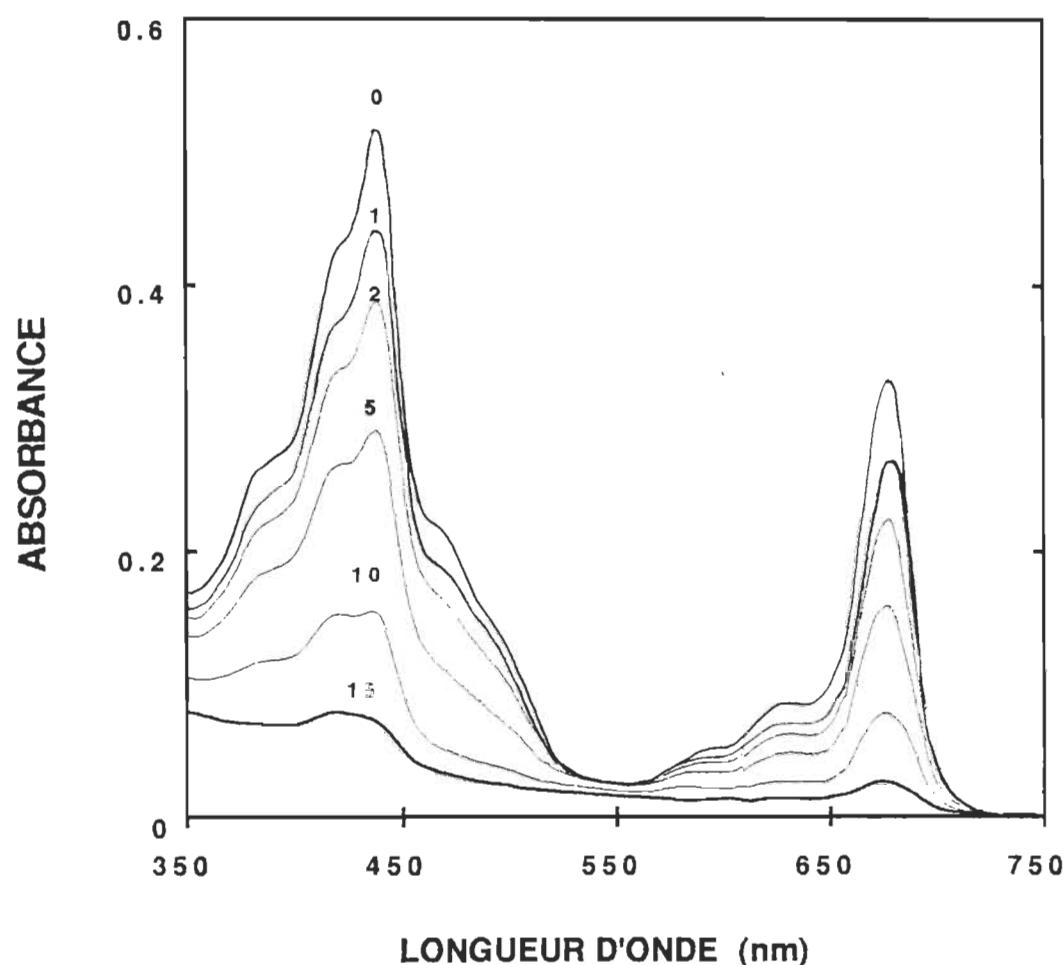
Il est généralement accepté que le photoblanchiment d'une chlorophylle, se produit lorsque le transfert d'énergie d'une chlorophylle excitée, dans son état triplet, s'oriente vers (est transférée) l'oxygène triplet. En ces circonstances, l'oxygène singulet est produit; il en résulte la dégradation de la chlorophylle (Krinsky, 1978; Koka, et Song, 1978; Asada et Takahashi, 1987; Siefermann-Harms, 1987):



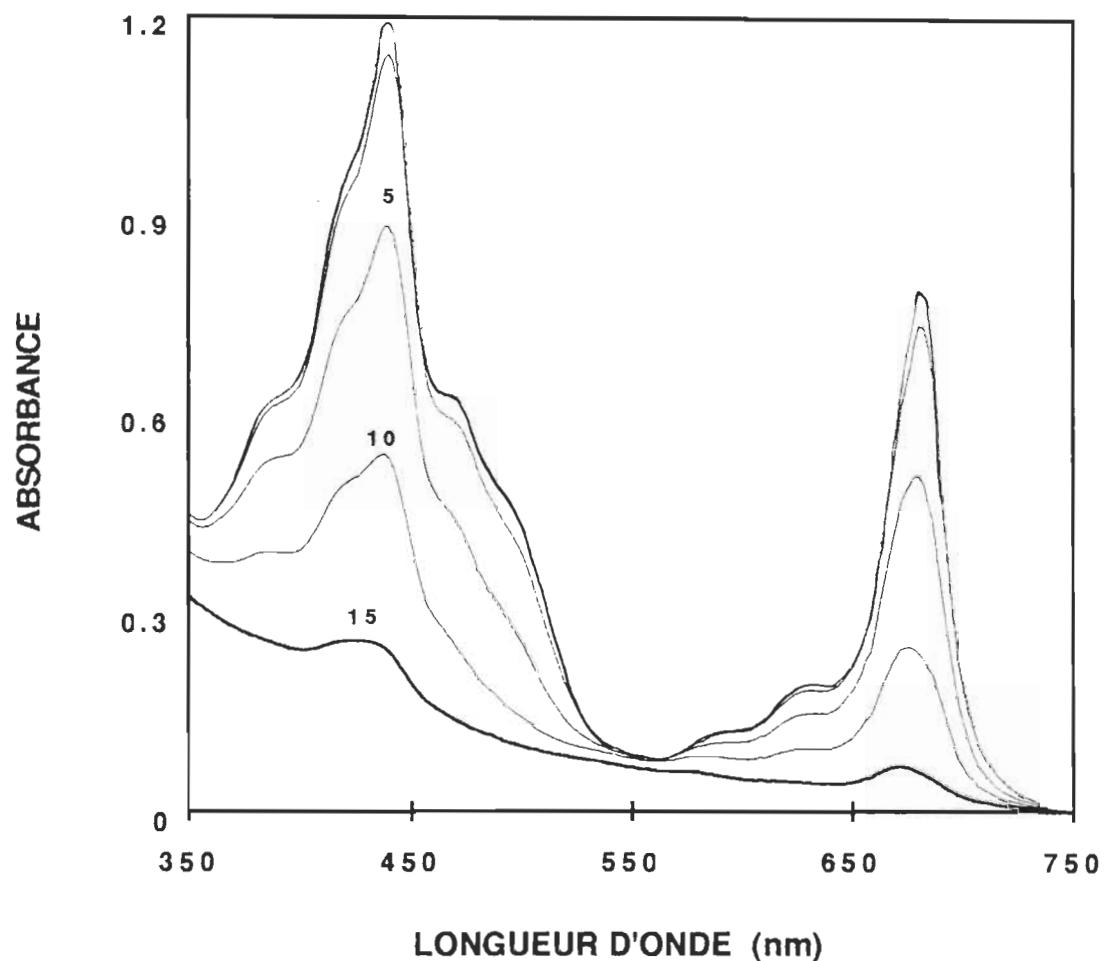
Les états singulet et triplet sont probablement distribués de façon similaire. En effet, les états triplets sont formés par dé-activation thermique des premiers états singulets et ont une plus grande probabilité de se trouver parmi les populations de Chl déjà excitées au premier état singulet (Purcell et Carpentier, 1993).

Les **figures** qui suivent (20, 21 et 22) représentent les spectres d'absorption du PSI-100, PSI-200 et LHC-II respectivement, en fonction du temps d'illumination. Des figures semblables à la figure 19 pour le PSI-30 (non-présentées), démontrent que les différents pics d'absorption décroissent de façon **indépendante** pour les trois complexes membranaires.

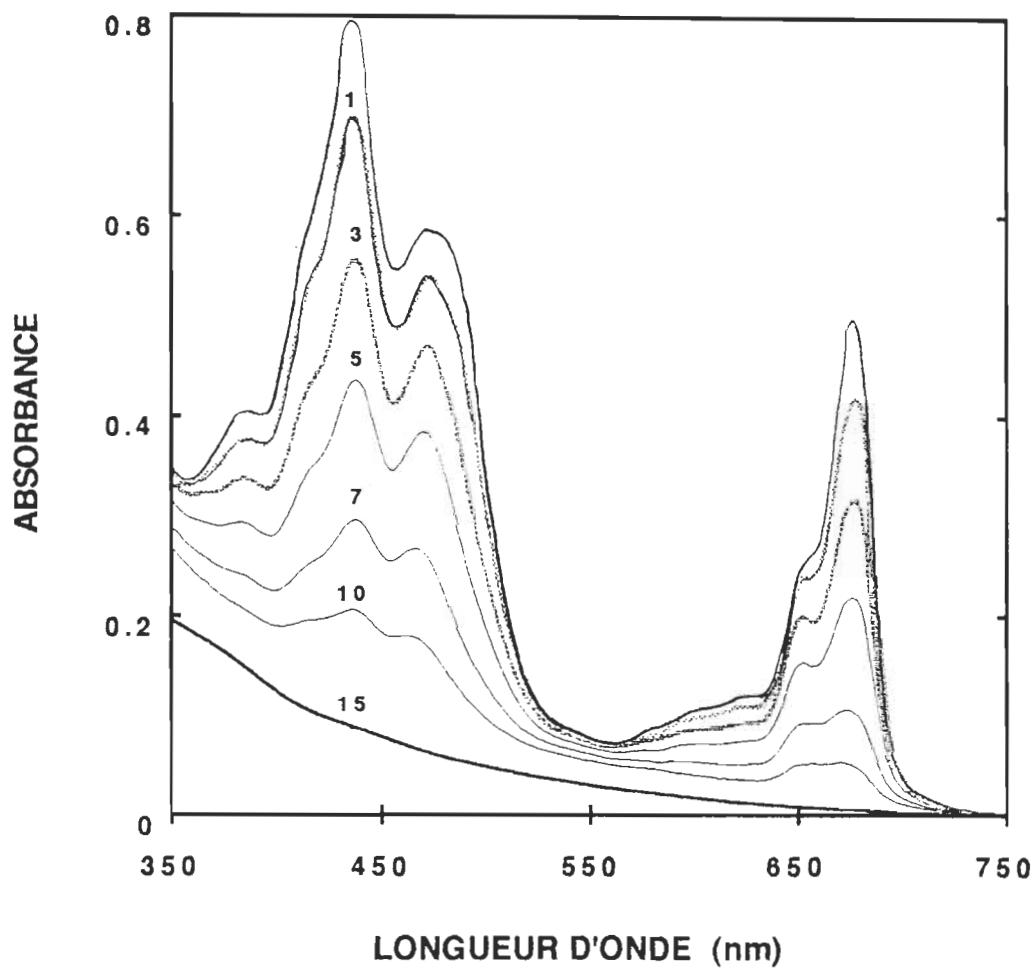
Dans le cas du PSI-100, on constate que la forme du spectre est différente des autres types de particules, et cela principalement entre 400 et 450 nm. La différence de proportionnalité entre le pic à 410 et 440 par exemple, est frappante si on compare avec le PSI-30. Les différences de structures reliées aux types, aux nombres et à l'emplacement des pigments feront couler beaucoup d'encre dans les sections à venir...



**FIGURE 20.** Spectres d'absorption du PSI-100 en fonction du temps d'illumination (0, 1, 2, 5, 10 et 15 min).



**FIGURE 21.** Spectres d'absorption du **PSI-200** en fonction du temps d'illumination (0, 1, 5, 10 et 15 min).

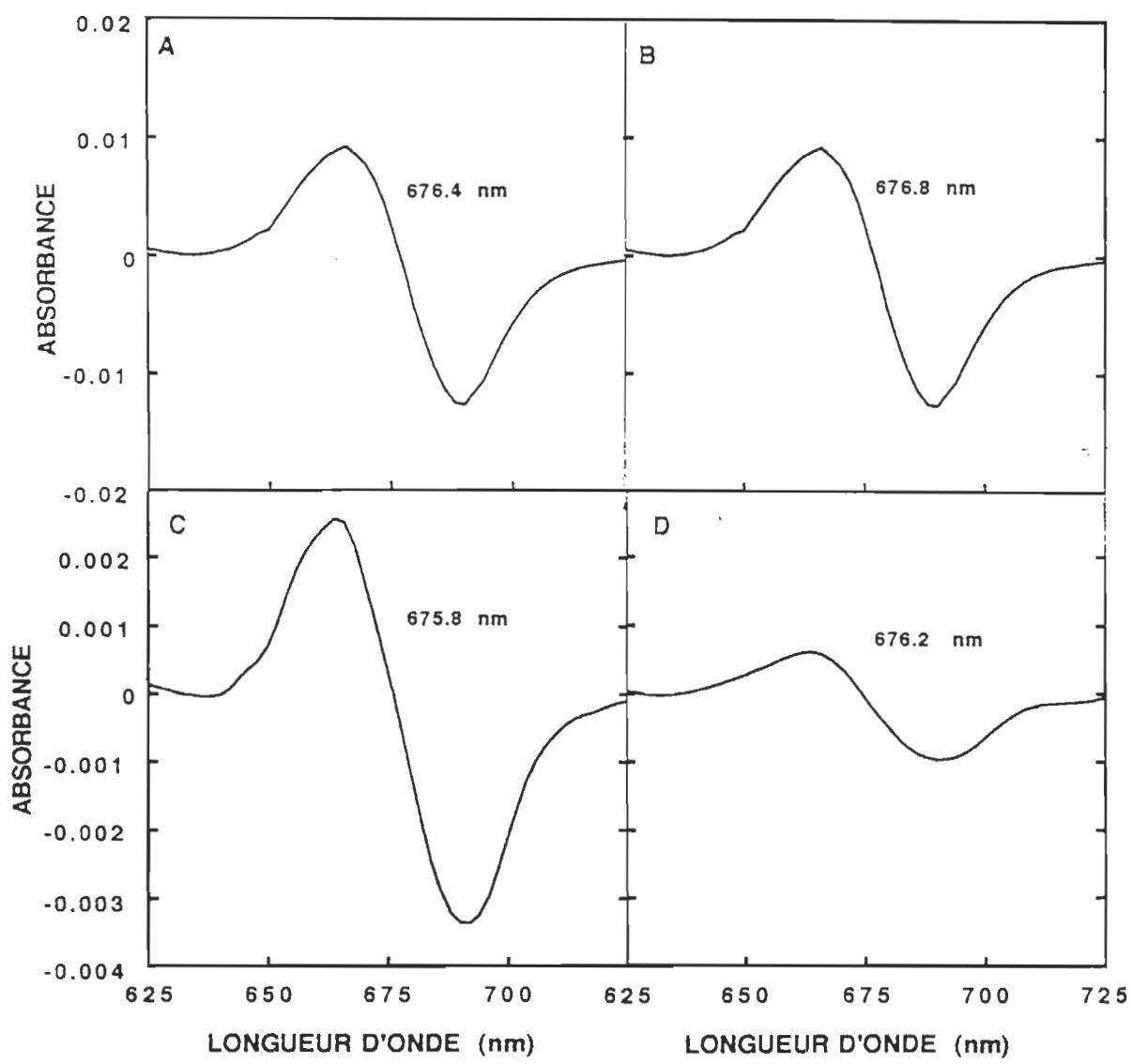


**FIGURE 22.** Spectres d'absorption du LHC-II en fonction du temps d'illumination (0, 1, 3, 5, 7, 10 et 15 min).

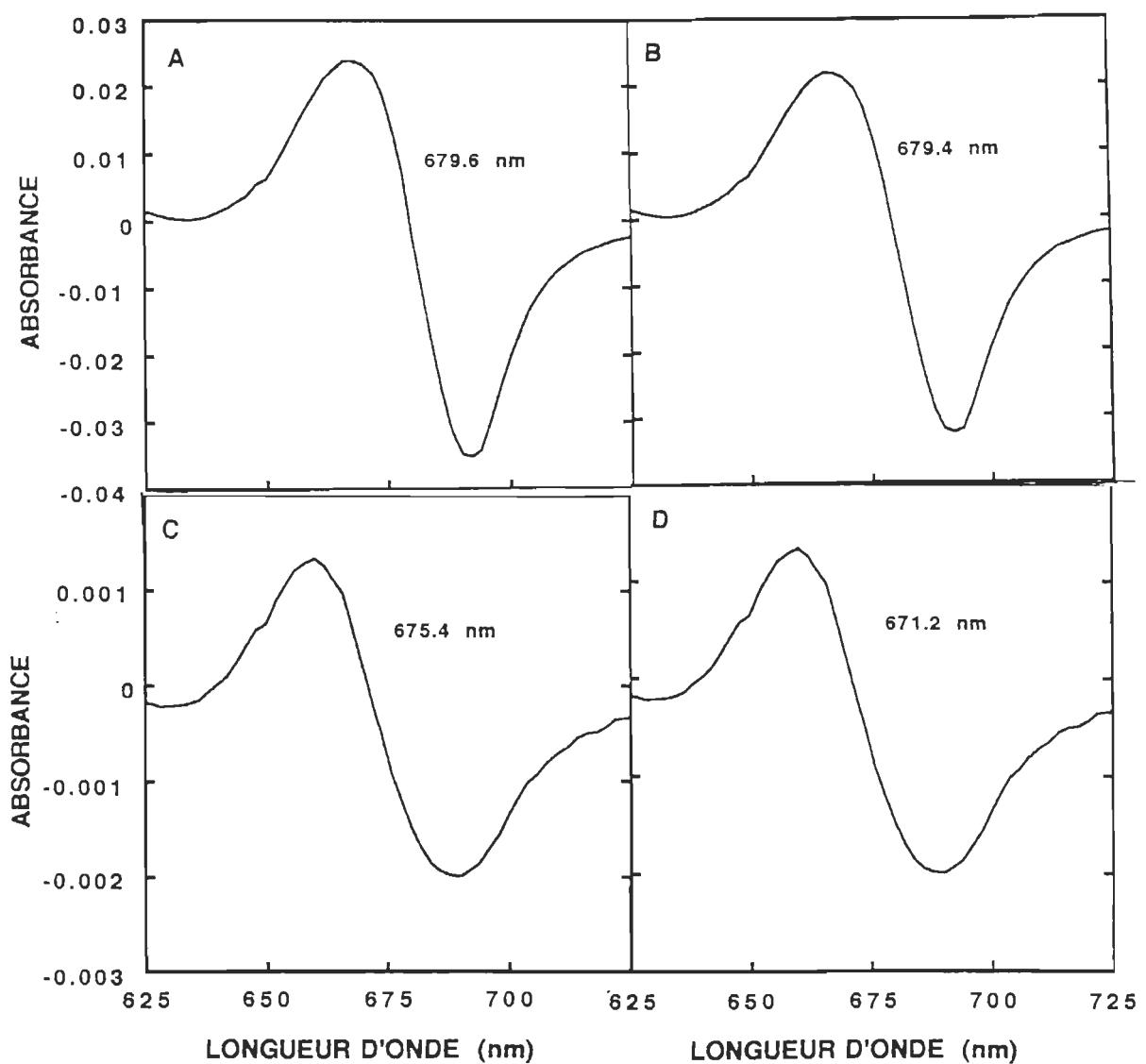
Plusieurs caractéristiques viennent définir davantage les différentes particules; comme autre exemple, la présence de **chlorophylles-b** (656 nm) dans le LHC-II (figure 22) comparativement aux autres particules (plus faible et moins évidente chez le PSI-200). Les comparaisons générales pourraient prendre une allure considérable, mais là n'est pas le but ultime de cette recherche.

**Le déplacement du maximum d'absorption**, principalement de la chlorophylle-a, fera l'objet de la présente discussion. En observant spécifiquement le pic à 678 nm des spectres de photoblanchiment du PSI-30, on ne constate **aucun déplacement** du maximum d'absorption, et cela même en normalisant tous les spectres à zéro d'absorbance en utilisant comme référence **750 nm** (résultats non-présentés). Cette dernière approche a été utilisée pour avoir une juste idée des fins déplacements de l'absorbance de la chlorophylle-a. Quoique l'étude des déplacements du maximum d'absorption de la Chl-a soit, dans cette section, le centre d'intérêt, les caroténoïdes peuvent aussi présenter ce type de déplacement (Matsuura et Shimada, 1993).

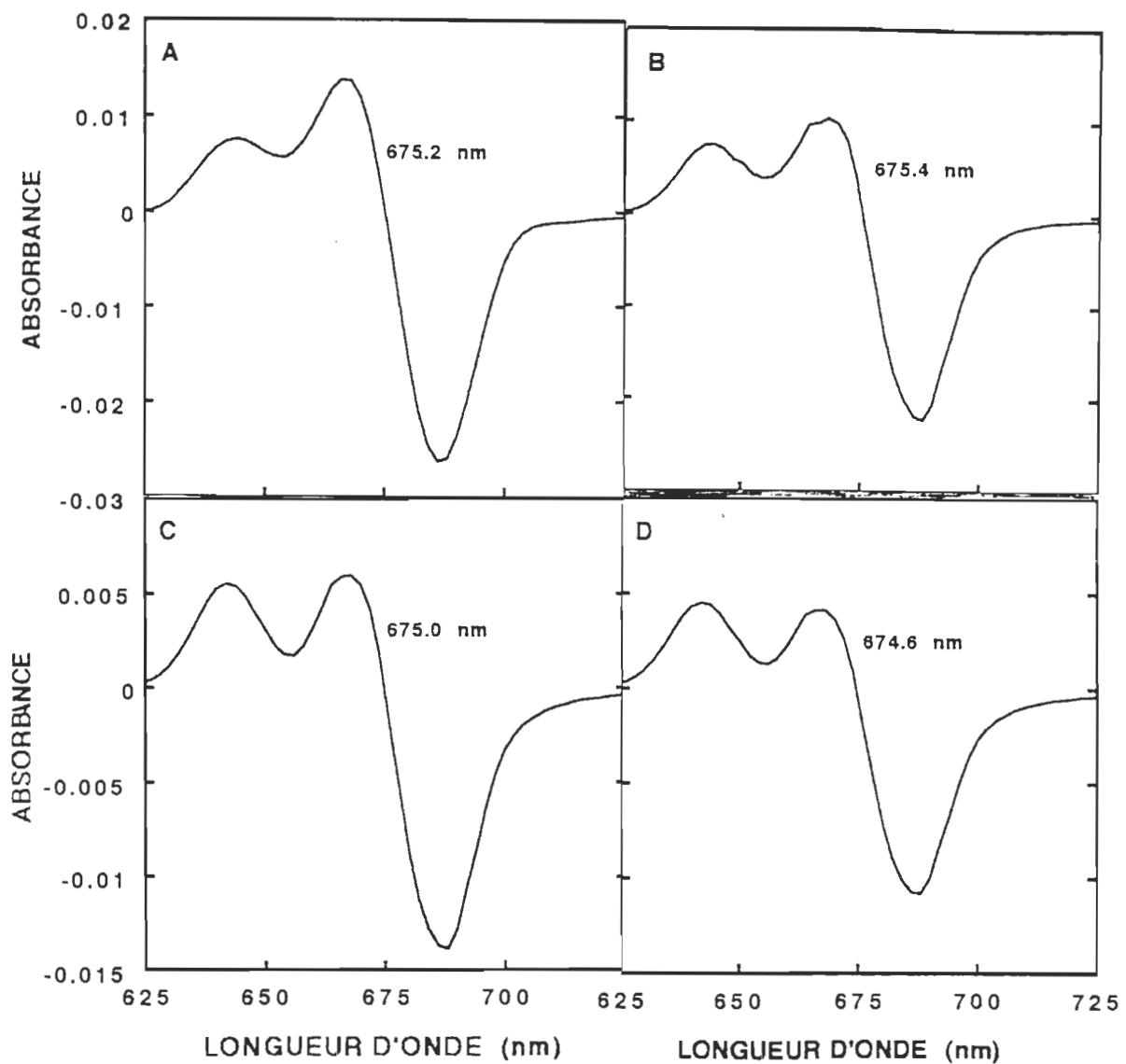
Visuellement il est très difficile, en comparant les spectres des figures 20 à 22, d'affirmer que le maximum d'absorption varie. La méthode qui nous semble la plus précise pour ce type d'information, est de calculer et de produire un spectre de la **dérivée première** de la section concernée. Donc, lorsque ce spectre passe par le zéro relatif d'absorbance, une longueur d'onde nous est fournie, qui représente avec précision le maximum d'absorption. Dans le cas du **PSI-100** contrôle, le maximum d'absorption de la Chl-a est de  $676.4 \pm 0.3$  nm, et **varie peu** en fonction du photoblanchiment (**figure 23**). Contrairement au dernier complexe membranaire, le maximum d'absorption du **PSI-200 varie de façon significative** soit de  $679.6 \pm 0.3$  à  $671.2 \pm 0.3$  (**figure 24**). Tandis que le **LHC-II** ne varie pas de façon significative en présence d'une irradiance prolongée (**figure 25**).



**FIGURE 23.** Spectres de la dérivée première des particules de PSI-100 en présence d'illuminations variables A) contrôle, B) 1 min, C) 5 min, D) 15 min.



**FIGURE 24.** Spectres de la dérivée première des particules de PSI-200 en présence d'illuminations variables A) contrôle, B) 1 min, C) 10 min, D) 15 min.



**FIGURE 25.** Spectres de la dérivée première des particules de LHC-II en présence d'illuminations variables A) contrôle, B) 1 min, C) 5 min, D) 7 min.

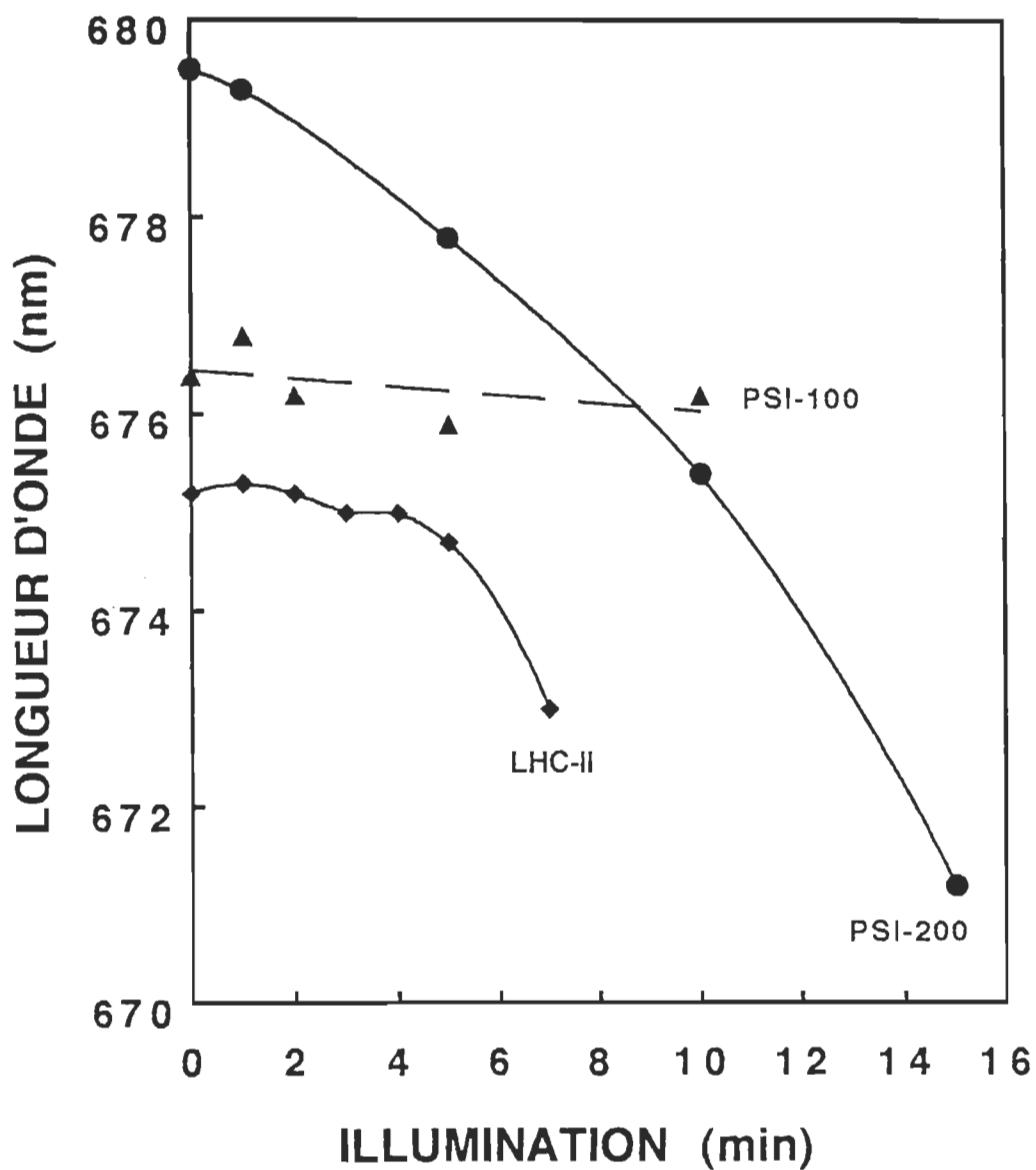
On remarque que les différentes particules membranaires étudiées n'ont pas le même contenu pigmentaire. Par contre, on peut se demander pourquoi un pigment bien caractérisé, en occurrence la chlorophylle-a, absorbe de façon variée, lorsqu'un traitement extrinsèque est appliqué. Plusieurs éléments de réponse nous viennent à l'esprit: la variation de l'environnement immédiat du pigment, la dégradation du pigment entraînant un changement d'absorbance, ou **plusieurs formes** de chlorophylles-a sont présentes à sensibilité distincte.

**L'environnement immédiat** du pigment est un facteur non-négligeable, compte tenu que le maximum d'absorption en absence de traitement pour les différentes particules, varie de manière significative (exemple:  $679.6 \pm 0.3$  pour le PSI-200 et  $675.2 \pm 0.3$  pour le LHC-II). Par contre, si les déplacements significatifs des pics en question variaient uniquement en raison des modifications de l'environnement du pigment, ce type d'expériences ne serait pas adapté au but escompté.

En ce qui à trait aux **produits de dégradation** du pigment qui pourraient entraîner un déplacement de la bande d'absorption, cet élément demeure négligeable, puisque ces produits, qui sont en quantité minime, n'absorbent pas dans la région immédiate de la chlorophylle-a native (Wieckowski et Majewska, 1990).

L'existence d'une ou plusieurs **formes de chlorophylles-a** mérite qu'on y prête attention. La Chl-a du PSI-200 présente un maximum d'absorption à environ 680 nm. Mais ce maximum se déplace vers le **bleu** en fonction du photobranchiment de ce pigment. La **figure 26** montre bien le déplacement des maxima d'absorption pour les trois types membranaires. Visualisant ainsi le déplacement sans équivoque

du maximum d'absorption des PSI-200 comparativement aux PSI-100 pour lequel aucun déplacement n'est remarqué, tandis que les LHC-II sont très stables sauf avec une illumination prolongée.

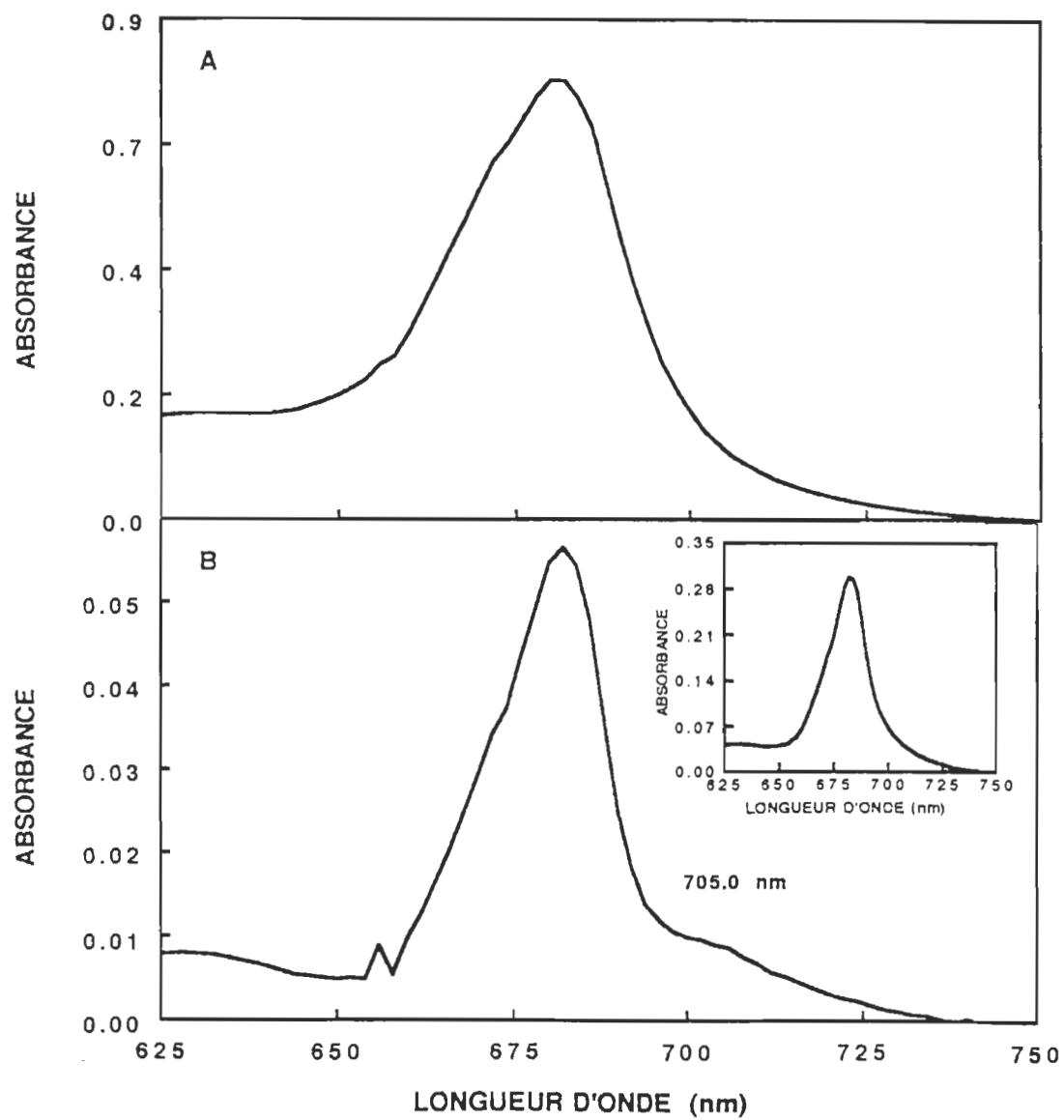


**FIGURE 26.** Déplacements des maxima d'absorption basés sur la dérivée première (Erreur maximale:  $\pm 0.4$ ). La durée d'illumination maximale pour chaque extrait correspond à 75 %, 80 % et 90 % de photoblanchiment pour le PSI-100, LHC-II et le PSI-200 respectivement.

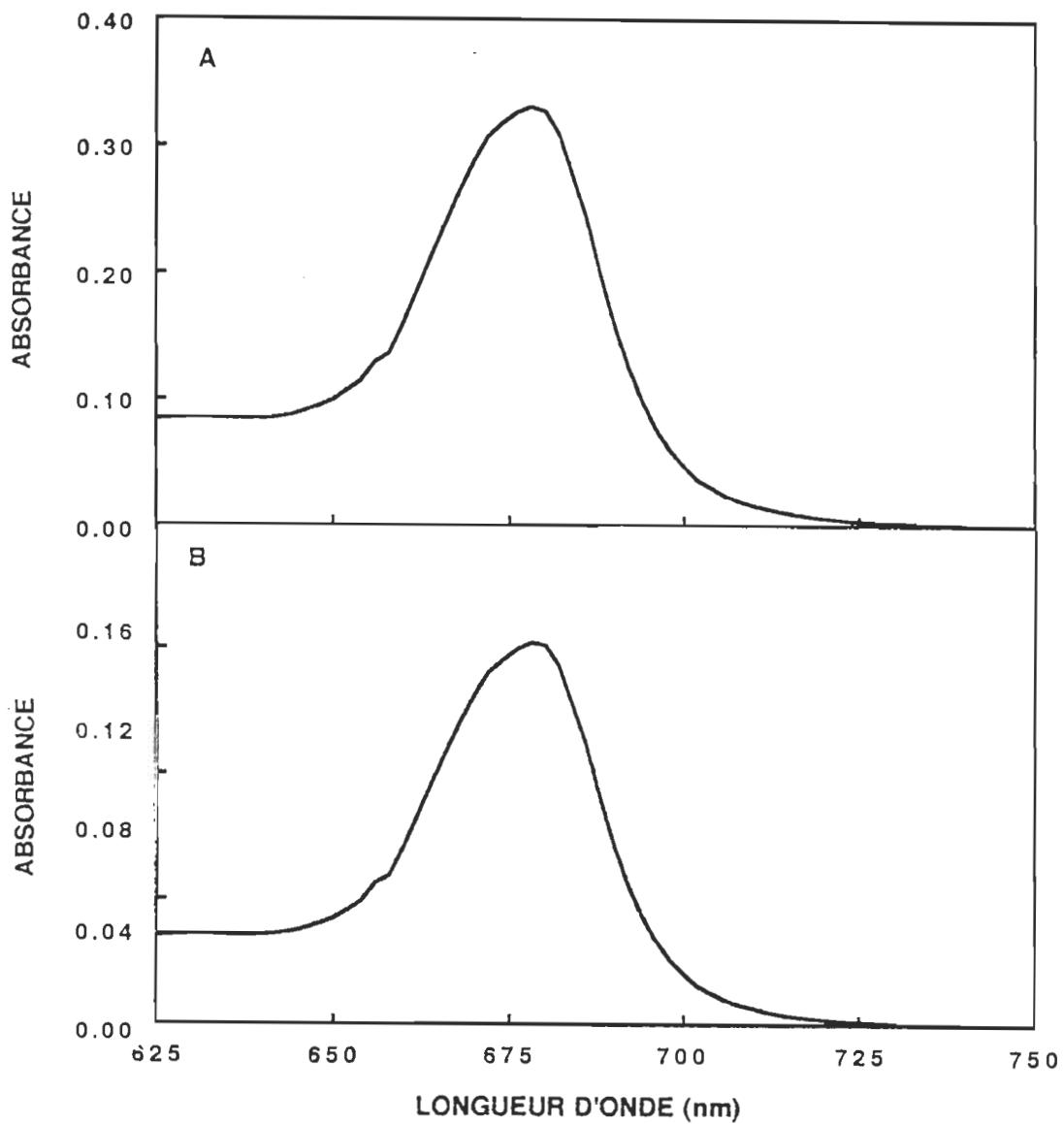
La littérature mentionne à quelques rares reprises l'existence théorique de formes de chlorophylles pouvant absorber à de plus grandes longueurs d'ondes que le maximum d'absorption (Shipman, 1980; Werst et al., 1992). Les spectres de soustraction nous renseigneront sur cette possibilité.

Le spectre de soustraction (contrôle moins 1 min d'illumination), dans la région d'absorption de la chlorophylle-a, des PSI-200, montre l'apparition d'un **pic à  $705 \text{ nm} \pm 0.9$**  (**figure 27B**). Ce pic expose explicitement la présence de chlorophylles, dont l'absence (dégradation) fait varier le maximum d'absorption. Ce pic (pigment) est très difficile à détecter, compte tenu que pour être visible sur ce type de graphique, il faut qu'il soit en moyenne **plus sensible** à la lumière que les autres pigments. Par contre, ce pic (forme de Chl-a) se dégrade très rapidement (**figure 27B en mortaise**).

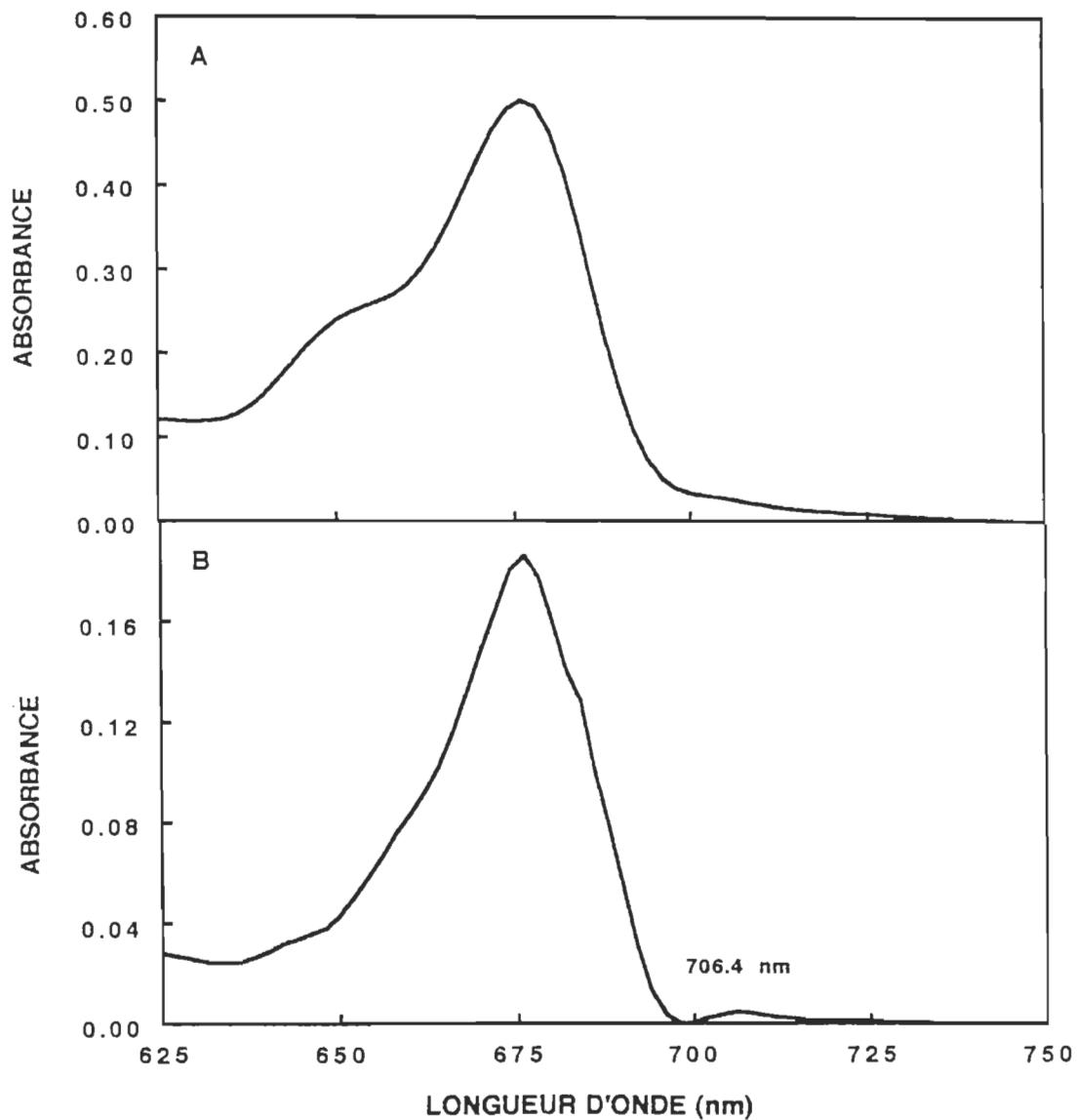
Par comparaison, la **figure 28B** ne dénote aucune différence chez les particules de PSI-100. Par contre, chez les LHC-II, cette même bande d'absorption, située à  **$706.6 \text{ nm} \pm 1.7$** , est présente avec la particularité de perdurer à travers les temps d'illumination (**figure 29B**). La présence de ce pic corrobore bien les résultats obtenus antérieurement (voir les figures 21 et 24).



**FIGURE 27. A)** Spectre d'absorption des PSI-200 contrôles, **B)** spectre de différence entre le spectre A et le spectre illuminé 1 min, et disparition du pic à 705 nm après 2 min spectre de différence, en mortaise.



**FIGURE 28. A)** Spectre d'absorption des PSI-100 contrôles, **B)** spectre de différence entre le spectre A et le spectre illuminé 1 minute.



**FIGURE 29. A)** Spectre d'absorption des LHC-II contrôles, **B)** spectre de différence entre le spectre A et le spectre illuminé 1 min.

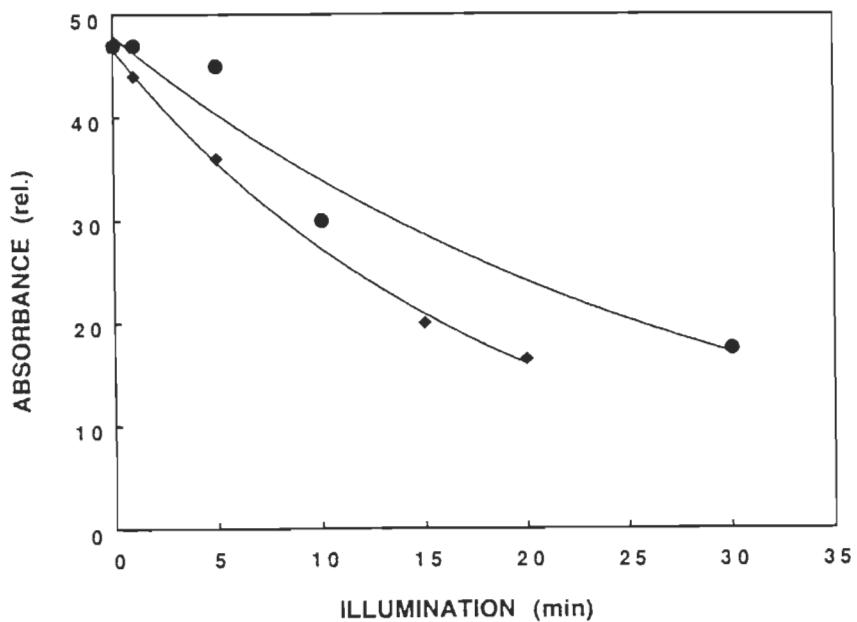
Les agrégats de chlorophylles absorbant à des longueurs d'ondes relativement longues, se photodégradent avant les holochromes qui absorbent à des longueurs d'ondes plus courtes (Brown et French, 1959; Thomas et Nijhuis, 1968; Thomas et al., 1976). La Chl-b est donc protégée durant le photoblanchiment, parce que le transfert d'énergie s'effectue d'une Chl-b vers une Chl-a (Sauer et Calvin, 1962; Thomas et Nijhuis, 1968; Thomas et al., 1976; Carpentier et al., 1986).

En guise de conclusion partielle, nous pouvons suggérer la présence d'une autre forme de chlorophylle, absorbant à des longueurs d'ondes relativement élevées (probablement vers 705 nm). Sur cette même lancée, sans toutefois avancer l'emplacement, Werst et ses collaborateurs (1992) ont émis l'hypothèse qu'un ou deux pigments "rouges" par P-700 (associés aux chlorophylles) seraient logés dans la région d'absorption entre 702 et 705 nm (voir aussi Tapie et al., 1984). Ces chlorophylles sont présentes chez les **PSI-200** et possiblement chez les **LHC-II** mais non chez les **PSI-100**. Comme mentionné dans une section antérieure, la différence structurale entre le **PSI-100** et le **PSI-200** se résume en la présence de l'antenne de pigments (**LHC-I**) chez ce dernier. Donc, ce type de chlorophylles serait également présent chez les **LHC-I**. Même si ces pigments semblent se comporter différemment face à l'illumination, ils nous apparaissent comme une affaire d'**antennes périphériques de pigments**.

### **3.2. RÉDUCTION DES CENTRES RÉACTIONNELS**

Afin d'avoir une juste idée de l'aspect **cinétique** (transport d'électrons à l'intérieur de...) des complexes protéiques, nous avon

s réduit le centre réactionnel de ceux-ci (mode chimique et photoréduction). La lumière a été utilisée comme mode de dégradation. Cette approche donne un bon aperçu de l'efficacité du transfert d'énergie entre les pigments de l'antenne et le P-700. Dans le chapitre précédent, nous avons introduit deux techniques pour réduire le centre réactionnel: chimique et directement par la lumière. Dans le cas qui nous intéresse, il faut premièrement évaluer le rendement de chacune d'elles dans un contexte identique. La **figure 30** montre la **très grande similarité** entre les deux méthodes de réduction, basées sur les particules membranaires de PSI-30.



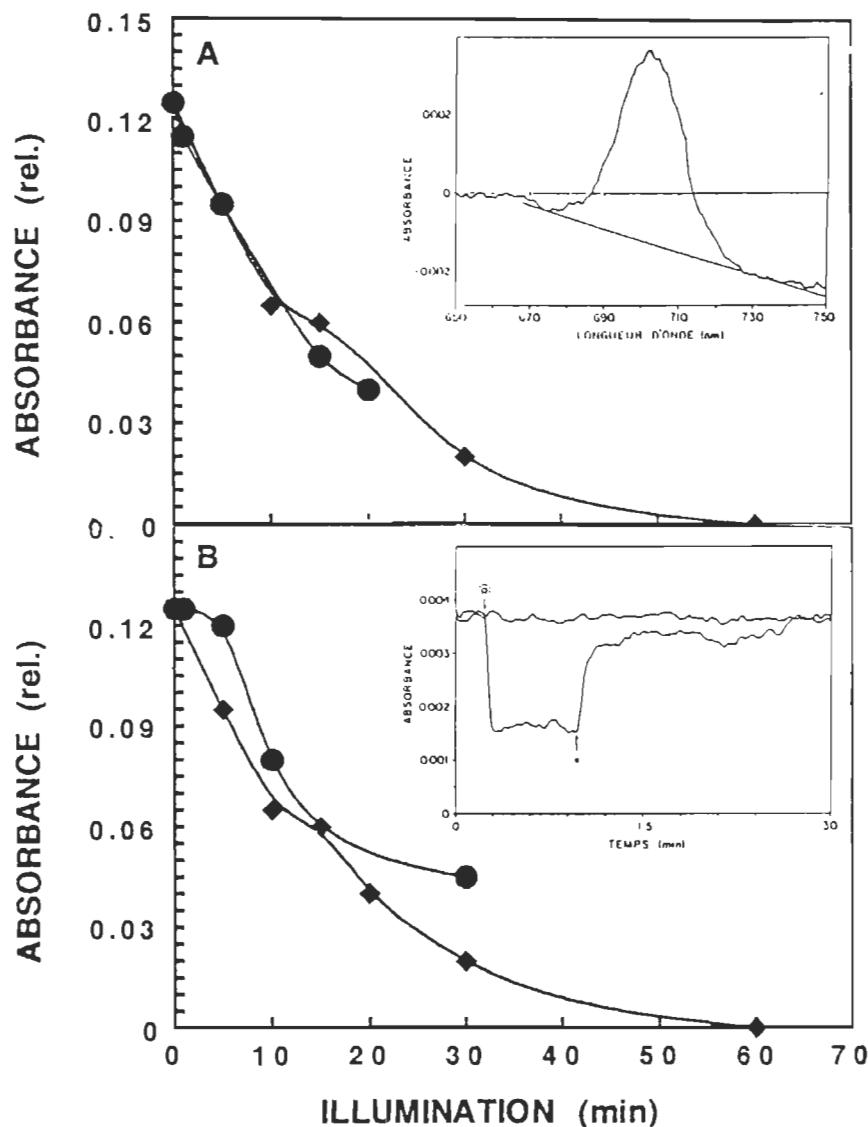
**FIGURE 30.** Réduction chimique (♦) et photoréduction (●) des PSI-30 en fonction du temps d'illumination. (Erreur maximale:  $\pm 2.1$ ).

Ces deux techniques convergent dans le même sens en ce qui a trait à la manière de détecter le transfert d'électrons du P-700.

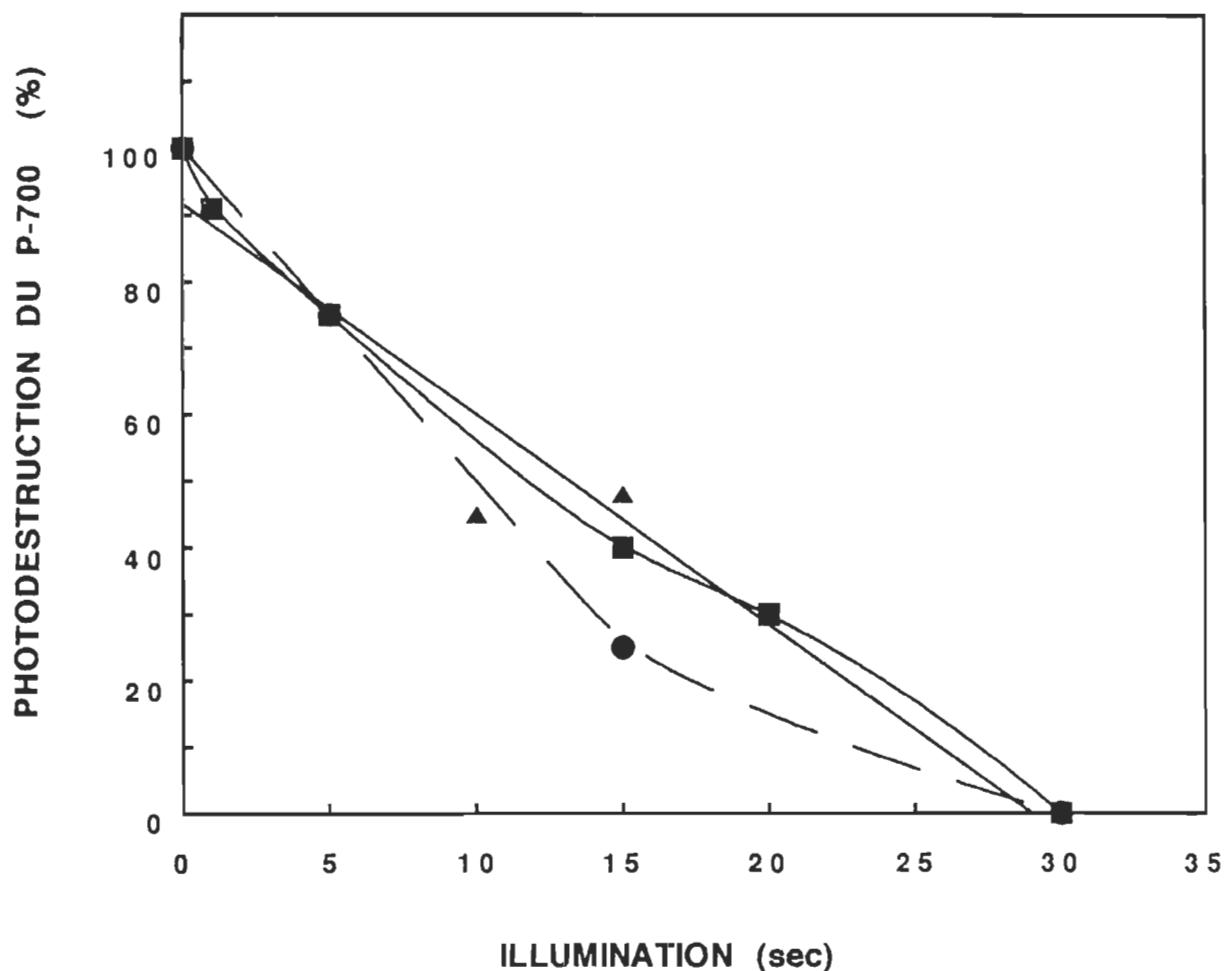
Sachant que le centre réactionnel du PSI est un monomère ou un dimère de Chl-a, il est capital de bien comprendre le mécanisme de dégradation des Chls du complexe en comparaison avec le P-700. En fonction du photoblanchiment, la dégradation des chlorophylles-a et du P-700 suit une cinétique semblable au cours des 30 premières min. d'illumination. Ces résultats s'appuient autant sur la réduction chimique, que sur la photoréduction (**figure 31**). Nous avons noté la même tendance chez les particules de PSI-100 et PSI-200.

Dans le but d'appuyer ces derniers résultats, la **figure 32** présente la réduction chimique relative du P-700 (en pourcentage) en fonction du temps d'illumination, et ce pour les trois types de particules membranaires. Une fois de plus la tendance se poursuit, la dégradation des P-700 est similaire d'une particule à l'autre.

Les résultats de cette section portent à croire que les chlorophylles-a (du complexe PSI-30) se dégradent de façon aléatoire, comme s'il s'agissait d'un amas pigmentaire. Ce type de comportement est contraire à ce que nous sommes habitués de rencontrer. Chez le PSII, le flux photonique suit une trajectoire dictée par le centre réactionnel (figure 7). Donc, via les antennes de chlorophylles et autres pigments, les photons sont acheminés vers le centre réactionnel (P-680). On pense que de cette façon, l'excès d'énergie lumineuse est transféré des antennes périphériques vers le centre réactionnel, ce qui conduit à la photoinhibition (Demeter et al., 1987; Jennings et al., 1989; Miller et Carpentier, 1991). Il en va tout autrement chez le photosystème I, puisque la taille de l'antenne n'influence pas le cheminement du transfert d'énergie (Owens et al., 1987).



**FIGURE 31. A)** Comparaison de la dégradation des Chl-a à 678 nm (♦) et de la **réduction chimique** des P-700 (●), et spectre de différence de la réduction chimique contrôle (en mortaise); **B)** Comparaison de la dégradation des Chl-a à 678 nm (♦) et de la photoréduction des P-700 (●), et spectre de **photoréduction** en fonction du temps incluant le spectre contrôle sans complexe membranaire (en mortaise) des PSI-30. Étant donné la différence d'absorbance de la chlorophylle-a très élevée comparativement à l'absorbance des deux types de réductions, un facteur d'équivalence a été calculé par rapport aux contrôles (0 minute), soit de 30:1 (Chl-a:P-700).



**FIGURE 32.** Résumé de la dégradation relative de la réduction chimique de P-700 des PSI-200 (●), PSI-100 (▲) et PSI-30 (■) en fonction du temps d'illumination. (Erreur maximale:  $\pm 5.1$ ).

Ce principe, quoique très récent en photosynthèse, à déjà été soulevé par une équipe de l'université de Chicago. Ces chercheurs ont employé le terme, "au hasard" (random) pour désigner le transfert d'énergie d'un pigment à l'autre, dans les complexes de PSI (Werst et al., 1992). Quoiqu'il faille pondérer ces affirmations, nos résultats portent à croire qu'il existe un flux énergétique non-directionnel. Ce qui implique que les excitons sont véhiculés, non pas obligatoirement vers le centre réactionnel, mais en fonction de l'arrangement pigments/protéines.

Le centre réactionnel du photosystème I possède deux propriétés photophysiques qui le distinguent (basées principalement sur les particules de PSI-30): **i)** les excitons sont distribués de façon aléatoire parmi tous les holochromes de Chl (Pearlstein, 1982; Purcell et Carpentier, 1993) et **ii)** le transfert d'énergie vers le centre réactionnel n'est pas favorisé comparativement au transfert entre les pigments de l'antenne (Owens et al., 1987, 1988).

Cette distribution homogène des excitons n'est pas due aux effets de détérioration lors de la procédure d'isolation, car il a été démontré que l'orientation des pigments chez le PSI est très similaire chez la membrane thylacoïdienne, et cela dans le cas de préparations enrichies en PSI, provenant de sources variées (Tapie et al., 1984). Les traitements de la membrane thylacoïdienne utilisant de fortes concentrations de surfactants, mènent à d'importants déplacements du maximum d'absorption vers le bleu (Markwell et Thornber, 1982). Donc, le type de préparations utilisées pour cette étude, est isolé avec une faible concentration de détergent. Par ailleurs, les extraits sont lavés et recentrifugés pour s'assurer que la concentration de détergent soit presque nulle afin d'éviter les effets à long terme des détergents.

Une conséquence importante prévaut sur la distribution homogène des excitons; c'est la protection relative du P-700 contre l'excès d'énergie lumineuse, et conséquemment contre la photodégradation.

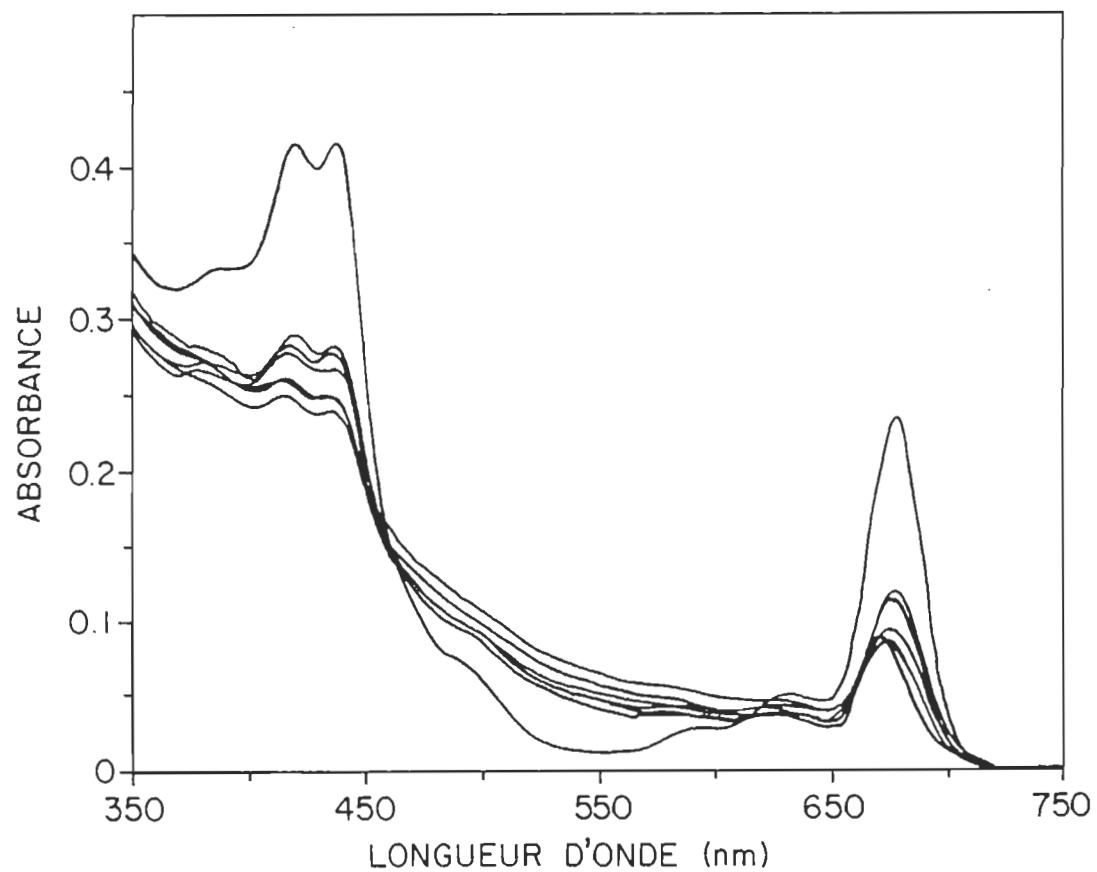
Ceci devrait compenser pour le pauvre taux de transfert d'énergie du P-700 vers les chlorophylles de l'antenne dû à la grande différence d'énergie entre le P-700 et les molécules de l'antenne (Shipman, 1980). Il a été calculé (avec une certaine marge d'erreur entre les auteurs) que chaque excitation nécessite de 1.4 à 1.9 visites (Gulotty et al., 1985), 2.4 visites (Owens et al., 1987) ou, au moins 3 visites (Turconi et al., 1993) au centre réactionnel pour qu'une séparation de charge effective se produise.

### **3.3. EFFETS DE LA TEMPÉRATURE SUR LES DIFFÉRENTS COMPLEXES PROTÉIQUES**

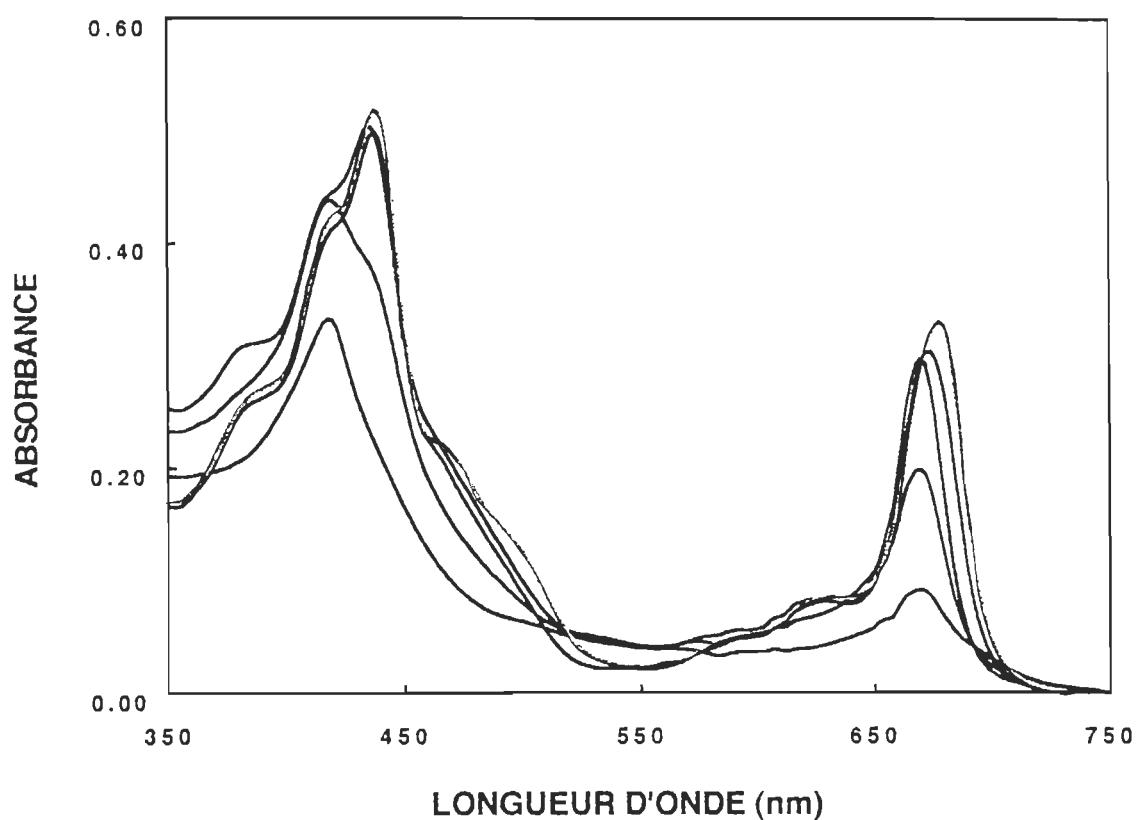
La section précédente a fait ressortir la particularité qu'a le flux photonique, au niveau du photosystème I, de parcourir un cheminement explicite mais non unidirectionnel. Explicite dans le sens où se sont les pigments (principalement les chlorophylles-a) qui dictent la voie à prendre et non pas le centre réactionnel.

Le but de la présente section est principalement d'évaluer un autre aspect de la dégradation des complexes; soit en utilisant la température. Les trois figures suivantes (**figures 33, 34 et 35**) proposent une visualisation représentative de la dégradation **pigmentaire** en fonction de la température, et cela pour le PSI-30, PSI-200 et LHC-II respectivement. Chacune des caractéristiques attribuées ultérieurement, correspond donc au comportement général des trois particules membranaires.

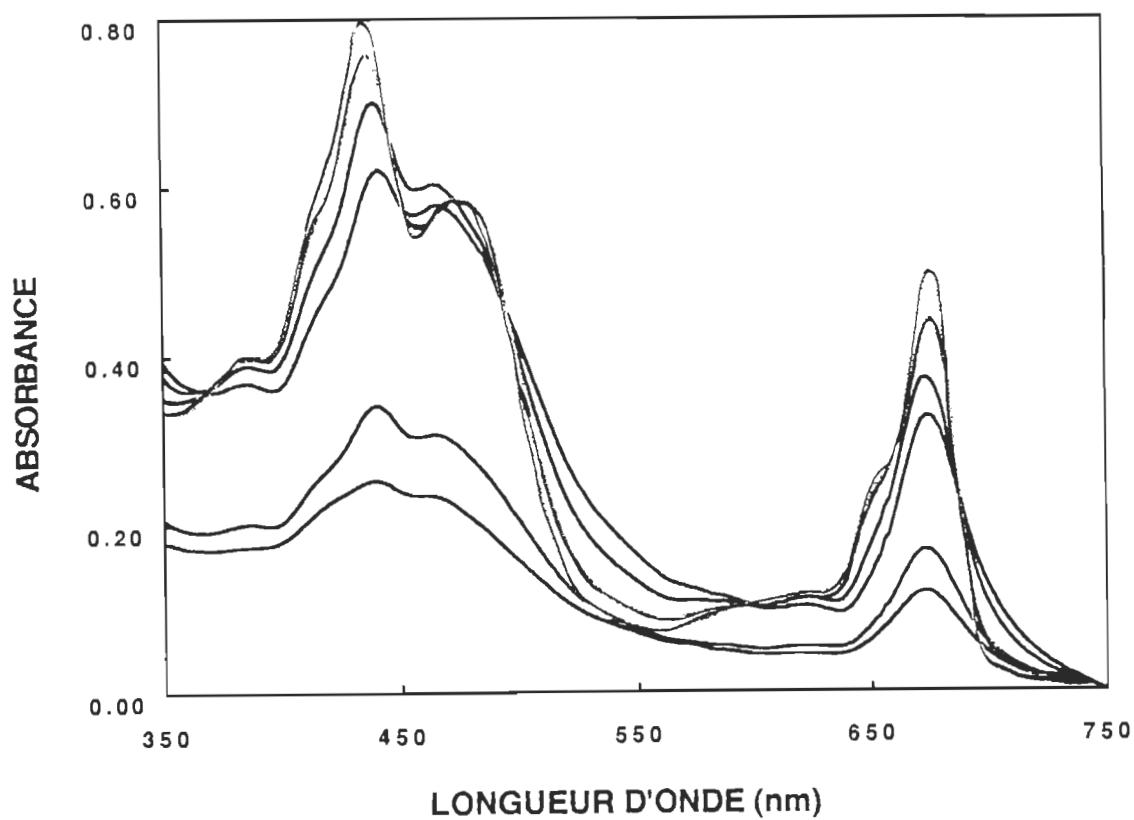
La littérature est très avare de commentaires en ce qui a trait au changement d'absorption des groupes de pigments en fonction de la température (Lyle et Struve, 1991). Par contre, un groupe de recherche étudiant les effets cinétiques et structuraux des cyanobactéries sur la stabilité thermique (sur l'intégrité photosynthétique), obtient des résultats concordant avec les nôtres (Sonoike et al., 1990). Par exemple, la stabilité cinétique du centre réactionnel (transport d'électrons) est affectée à partir de 50° C et inactivée à 50 % à 70° C (principalement au niveau de F<sub>A</sub>, F<sub>B</sub> et F<sub>X</sub>). L'équipe du professeur Hoshina (Hoshina et al., 1990) arrive aux mêmes conclusions en utilisant des PSI natifs (200 Chl/P-700 et toute les protéines) d'épinard contenant les LHC-I.



**FIGURE 33.** Spectres d'absorption des particules de **PSI-30** en fonction de la température (0, 40, 50, 60, 70 et 80°C).



**FIGURE 34.** Spectres d'absorption des particules de PSI-200 en fonction de la température (0, 50, 60, 70 et 80° C).



**FIGURE 35.** Spectres d'absorption des particules de LHC-II en fonction de la température (0, 40, 50, 60, 70 et 80° C).

Contrairement aux traitements de fortes illuminations, la température semble affecter les particules membranaires de façon similaire, et cela chez différents complexes membranaires.

Une première constatation, qui est corroborée par l'ensemble des résultats, démontre bien l'uniformité des complexes pigmentaires (en fonction des traitements à la chaleur). L'altération des pigments est **continue** (linéaire) en fonction de l'augmentation de température, mais aussi en comparant les pics d'absorption pour une même particule. Sauf dans le cas des PSI-200, où on retrouve des changements importants dans les spectres.

Si on met en relation la décoloration des deux pigments utilisés antérieurement (voir figure 19), absorbant à 410 et 678 nm, en fonction d'un contrôle, nous constatons une corrélation très forte entre ces deux pics (résultats non-présentés). Ce constat est renforcé par la régularité au niveau des trois figures ici mentionnées.

Une deuxième constatation réside dans le fait que ces complexes sont très résistants à la chaleur. Même après des périodes prolongées (jusqu'à 360 min), à 90° C, ils contiennent encore des quantités non-négligeables de pigments.

Et enfin, plusieurs **déplacements** des bandes d'absorption sont notés, avec la particularité qu'ils sont **désordonnés**.

Ces dernières affirmations suggèrent la température, comme une technique de dégradation pigmentaire **non-spécifique**, en ce sens qu'elle ne suit pas un mode déterminé. Si on compare cette méthode avec le photoblanchiment, on se rend compte, dans ce dernier cas, que la dégradation est véhiculée par les **pigments** uniquement. Une question reste cependant en suspens; comment se justifie cette spécificité de la lumière comparativement à la chaleur ? Sachant que la lumière est véhiculée par les pigments, la chaleur altère donc les

**protéines** en plus des pigments. Faute de l'aspect cinétique de la dégradation, ces résultats ne nous permettront pas, dans l'immédiat, de confirmer ce postulat avec assurance.

Ces types de travaux ont l'avantage de comparer deux modes de dégradation des complexes photosynthétiques très différents. La littérature tend à brouiller les cartes en ne distinguant pas l'effet de la cause. Par exemple, l'idée est véhiculée que sous des conditions réductrices (illumination intense), le premier effet constaté est l'altération de la structure des complexes Fe-S (Inoue et al., 1989). Une grave erreur d'interprétation est ainsi commise. Il est très probable que l'altération des complexes Fe-S ne soit qu'un processus **indirect** originant de la dégradation pigmentaire. De toute évidence, l'altération des pigments perturbe le transport d'électrons. Sur cette même note, une autre équipe japonaise affirme que la stabilité (de la membrane: dégradation pigmentaire et protéique) diminue lorsque le rapport Chl-a/P-700 régresse, et cela en fonction de la **température** (Ikegami et Katoh, 1991). Par contre, dans cette même étude ils mentionnent que ce résultat est obtenu si, et seulement s'il y a **ajout de lipides** au complexe membranaire. Ils vont même jusqu'à évaluer plusieurs types de lipides (PG, MGDG, PI, PC, DGDG...) en fonction de la protection du complexe. Ils concluent en attribuant à la **Chl-a** tout le crédit de la stabilité membranaire des photosystèmes I en fonction de la température (Ikegami et al, 1990; Ikegami et Katoh, 1991). Il est évident qu'on a extrapolé la nature de ces résultats en relation avec les pigments des complexes membranaires, quoique l'implication de la Chl-a sur la stabilité de la membrane soit indirecte.

La réduction chimique du P-700 des particules de PSI-30 en fonction de la température, tend à confirmer les effets non-spécifiques de ce type de dégradation chez le PSI-30 (tableau 6).

**TABLEAU 6.** Réduction chimique relative des P-700 de PSI-30 en fonction de la température. 100% = 0.009 d'absorbance. (Erreur maximale: 4.8 %).

RÉDUCTION CHIMIQUE (%)	TEMPÉRATURE (° C)
100	4 (contrôle)
100	30
66	50
57	60
54	70

La stabilité du P-700 à la chaleur proviendrait des chlorophylles-a, et il y aurait également deux chlorophylles-a' dans le centre réactionnel du PSI (Ikegami et Katoh, 1991; Ikegami, 1992; Maeda et al., 1992a, b). Les chlorophylles libres pourraient également être impliquées dans ce processus (Lebedev et al., 1992; Senge, 1993).

Le traitement du complexe de PSI-30 ( $30^{\circ}\text{C}$  pendant 10 min), n'est pas suffisant pour provoquer une dégradation de la masse pigmentaire. Par contre, en élevant la température à  $50^{\circ}\text{C}$  et plus, ce complexe semble affecté de façon modérée.

Dans le but d'obtenir une idée plus juste du comportement et du rôle des pigments dans le photosystème I, une étude plus approfondie et détaillée de ces pigments pris de façon séparée sera entreprise. La chromatographie liquide à haute performance nous procurera une idée plus juste de l'implication dans la photosynthèse, de chaque classe de pigments.

### **3.4 DÉGRADATION PIGMENTAIRE RÉVÉLÉE PAR LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE**

La chromatographie liquide à haute performance nous permettra de mieux comprendre l'implication de chacun des groupes de pigments, et de chacun des pigments pris individuellement, et cela au sein des différents extraits membranaires.

Une première information que nous pouvons tirer des expériences de chromatographie sur couche mince (voir le chapitre matériel et méthodes), est l'importance relative de chaque pigment dans un extrait. (tableau 7). Donc, la concentration d'un type pigmentaire en particulier, sera une source de renseignement important dans le but d'évaluer la réelle force d'implication d'un pigment.

Cette section débutera par l'étude du PSI-200, et se déroulera en tentant d'expliquer les différences fondamentales qu'offrent les complexes, dont les tailles d'antennes varient. Au cours de cette section, nous entreprendrons d'établir des liens avec les particules membranaires de plus en plus dépouillées en pigments (PSI-200 --> PSI-30...) comparativement au centre réactionnel.

**TABLEAU 7.** Concentration relative (nombre de molécules) des principaux pigments en fonction du centre réactionnel au sein des différentes particules membranaires, et pourcentage (entre parenthèses) de ceux-ci en fonction de l'extrait. L'erreur sur les mesures est au maximum de 7.4 % en valeur relative.

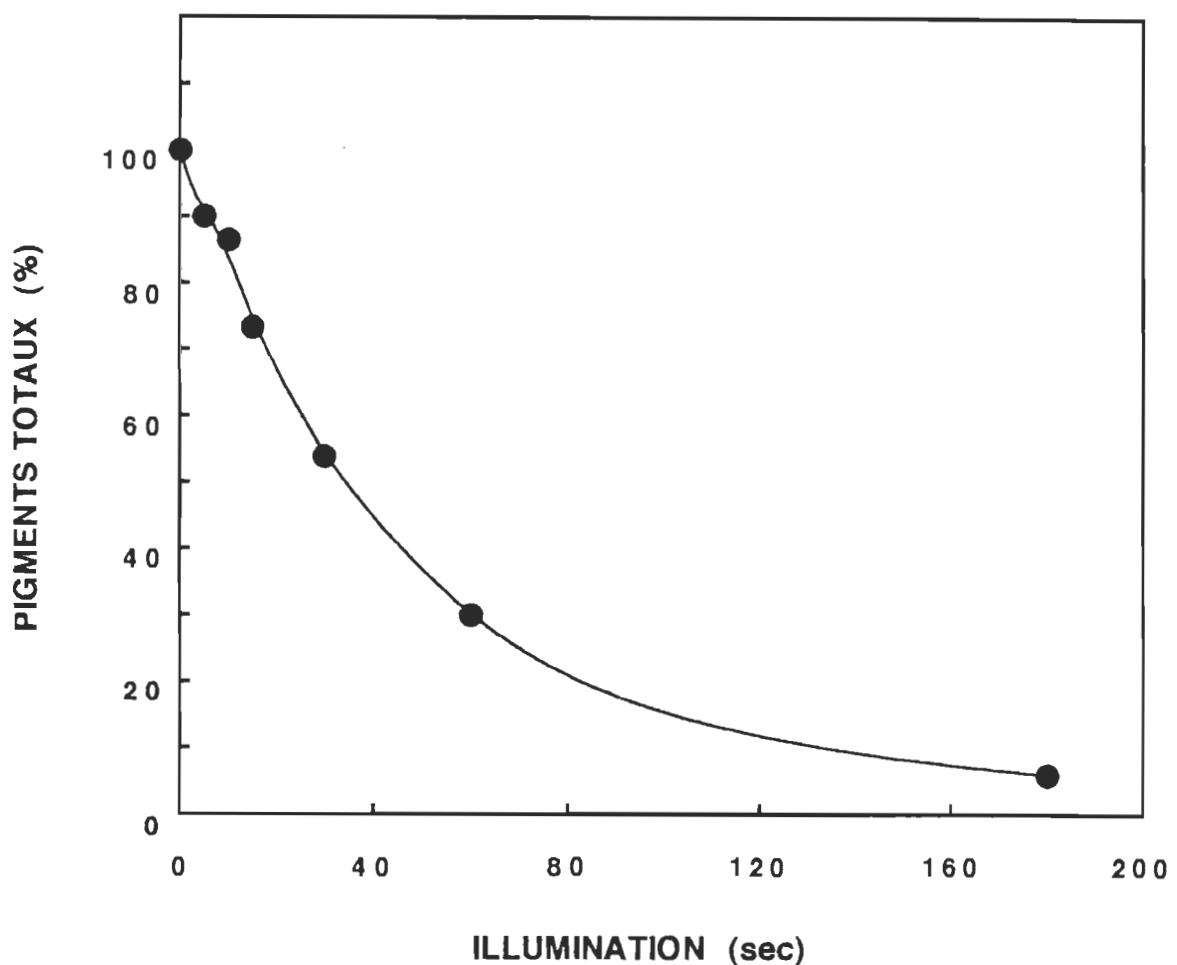
	<b>COMPLEXES MEMBRANAIRES</b>			
	PSI-200	PSI-100	PSI-30	LHC-II
Chl-a .	200 (58.8)	100 (63.7)	30 (69.8)	50 (52.6)
Chl-b	50 (14.7)	0	0	30 (31.6)
Lutéine	27 (8.0)	10 (6.5)	3 (7.0)	0
Néoxanthine	20 (5.9)	7 (4.4)	2 (4.6)	7 (7.4)
Violaxanthine	10 (2.9)	7 (4.4)	1 (2.3)	8 (8.4)
β-carotène	33 (9.7)	33 (21.0)	7 (16.3)	0
P-700	1	1	1	---

### 3.4.1 Photoblanchiment des PSI-200

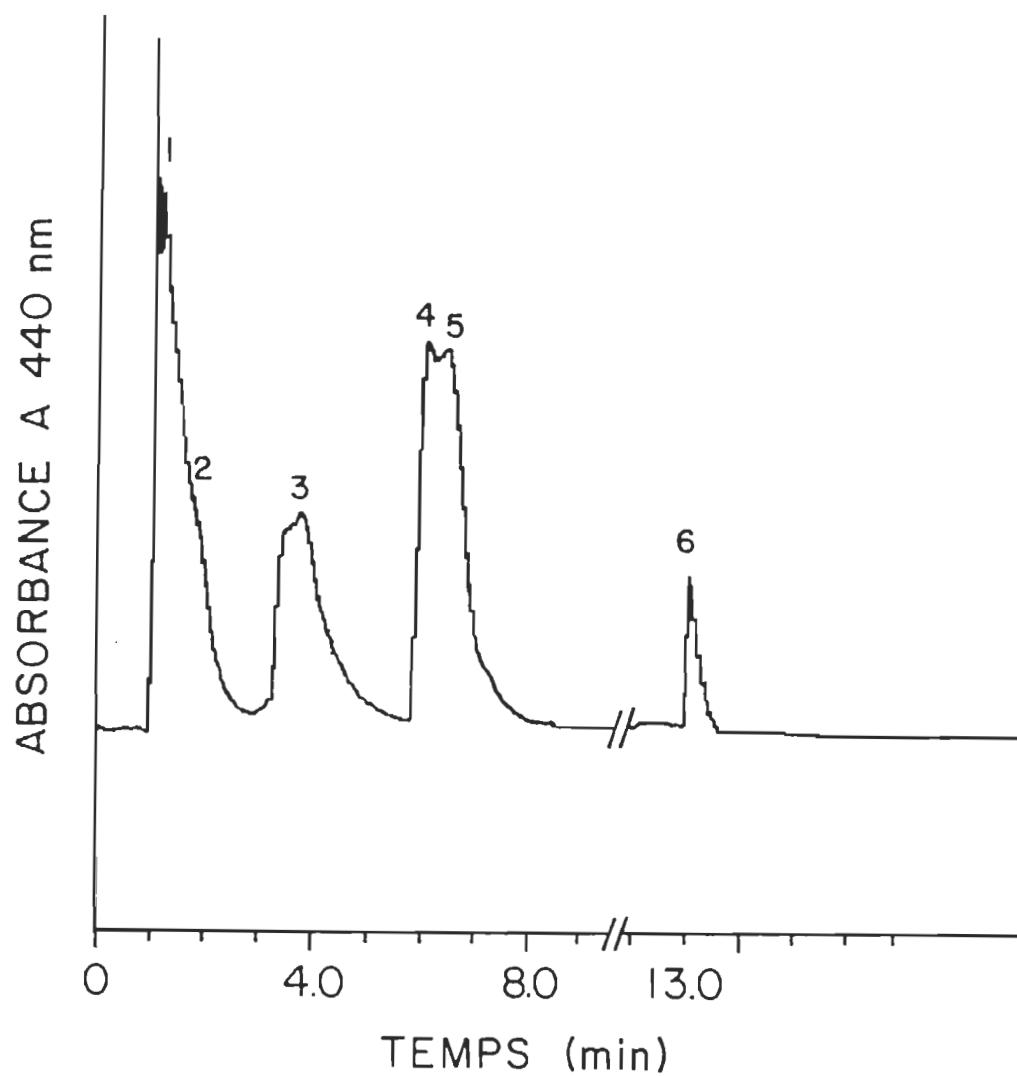
Compte tenu que nous utilisons un volume de traitement de beaucoup inférieur aux expériences antérieures ( $150 \mu\text{l}$ ), le temps pour altérer les pigments s'en trouve grandement diminué. Si on considère tous les pigments des PSI-200 ensemble, après environ 30 secondes, 50 % de ceux-ci sont dégradés (**figure 36**). Après 180 secondes, la grande majorité des pigments ont été touchés, comparativement au chromatogramme contrôle (**figure 37**).

En subdivisant les pigments par sous-groupes, il est possible de visualiser l'implication de chacun d'eux dans le complexe (**figure 38**). Les caroténoïdes semblent se dégrader très rapidement comparativement aux chlorophylles: après moins de 10 secondes, 50 % des caroténoïdes sont dégradés.

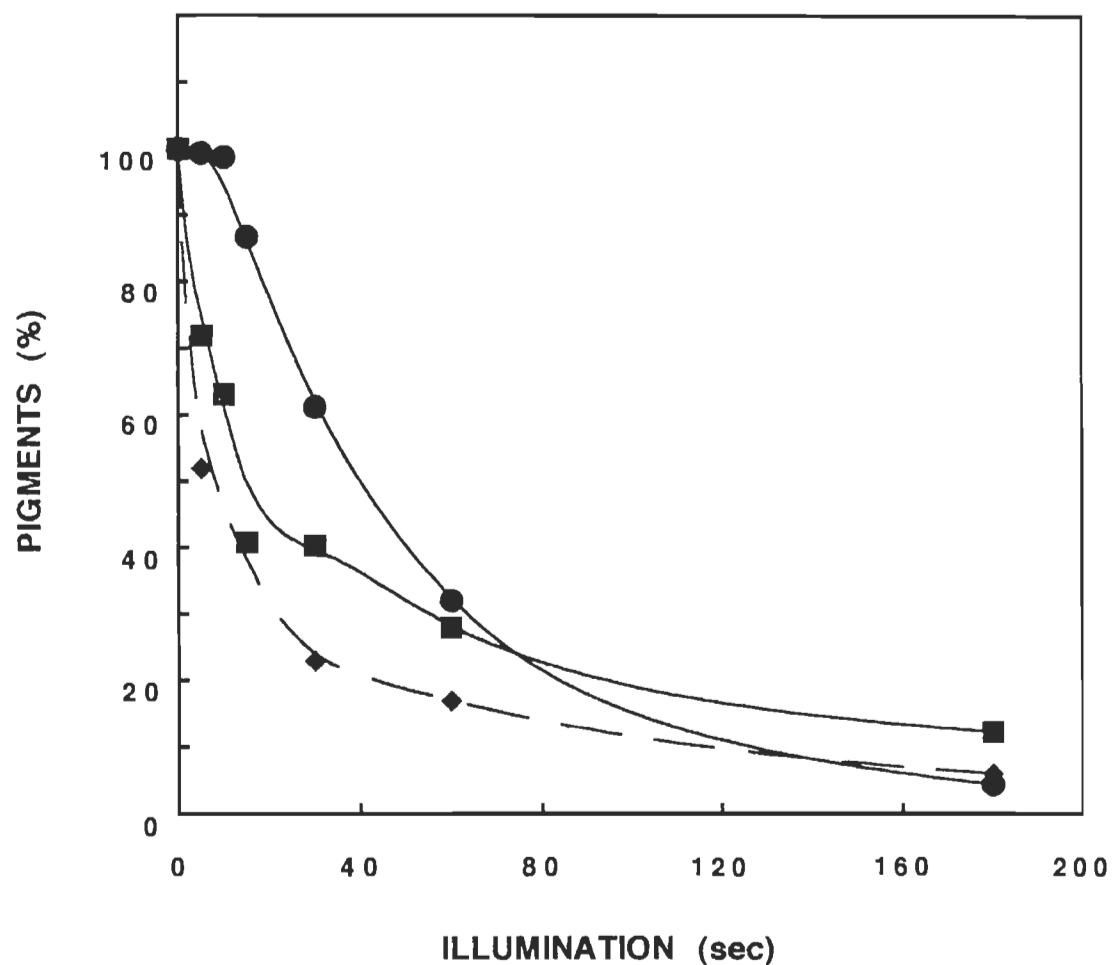
Un fait reste à souligner, le début du traitement des chlorophylles est caractérisé par une résistance à l'illumination. Ce constat concorde bien avec les résultats préalablement obtenus sur le déplacement des maxima d'absorptions vers le bleu, des PSI-200 (voir la section 3.1). Un holochrome chlorophyllien possiblement relié à un mécanisme de photoprotection et localisé au niveau des antennes collectrices de lumière (LHC-I), absorbant à des longueurs d'ondes élevées (~ 705 nm), est dégradé en premier lieu.



**FIGURE 36.** Dégradation relative des pigments totaux du PSI-200 en fonction de l'illumination, détectée par CLHP.



**FIGURE 37.** Chromatogramme par CLHP de la séparation des pigments des PSI-200 contrôle. 1 = néoxanthine; 2 = violaxanthine; 3 = lutéine; 4 = Chl-b; 5 = Chl-a; 6 =  $\beta$ -carotène.



**FIGURE 38.** Dégradation relative par groupes de pigments (Chls (●), xanthophylles (■) et Car (◆) des PSI-200 en fonction du temps d'illumination, détectée par CLHP.

Sachant qu'elles sont dégradées avant les autres types de chlorophylles, les chlorophylles 705 (C705) protègent vraisemblablement les autres chlorophylles ou les pigments adjacents, contenus dans les **LHC-I**.

Pour avoir une idée juste du rôle de chaque pigment, il est essentiel d'observer le comportement de ceux-ci, pris séparément. Le **tableau 8** montre, dans un premier temps, le pourcentage relatif de photodégradation de chacun des pigments, et dans un deuxième temps, le pourcentage d'abondance de ces mêmes pigments au sein du complexe de PSI-200 (entre parenthèses).

Les chlorophylles sont très résistantes comparativement aux autres pigments. Après 10 secondes d'éclairement, seulement 6 % des **Chl-b** sont altérées; ce rythme s'accentue après 15 secondes. Quant aux **Chl-a**, elles semblent légèrement plus résistantes à la photodégradation, 10 % seulement de celles-ci ayant été altérées après 15 secondes d'illumination.

Ce temps de latence prononcé chez les **Chl-a**, ainsi que le temps requis pour entamer une dégradation, concorde bien avec l'idée de **protection** de ce pigment par un holochrome qui absorberait à des longueurs d'ondes supérieures (C705). Donc cette protection serait principalement orientée vers les **Chl-a** de l'antenne collectrice de lumière du PSI.

Dans le cas des caroténoïdes, la photodégradation est plus uniforme. Par contre la **violaxanthine** est dégradée très rapidement et en quantité très appréciable (80 % après seulement 5 secondes). De plus, ce pigment se dégrade en une forme intermédiaire, et par la suite, leur dégradation est uniforme.

**TABLEAU 8.** Photodégradation relative des pigments et photodégradation en fonction de la quantité respective de chacun des pigments (entre parenthèses), au niveau du PSI-200. (100 % = 200, 50, 27, 20, 10, 33 et 1 pour la Chl-a, Chl-b, lutéine, néoxanthine, violaxanthine,  $\beta$ -carotène et le P-700 respectivement). L'erreur sur les mesures est au maximum de 5.7 % en valeur relative.

PIGMENTS	TEMPS D'ILLUMINATION (secondes)							
	0	5	8	10	15	30	60	180
Chl-a	100 (59)	100 (59)	100 (59)	100 (59)	90 (53)	63 (37)	33 (20)	4 (2)
Chl-b	100 (14.7)	97 (14)	94 (13.7)	94 (13.7)	74 (11)	54 (8)	29 (4.2)	6 (0.9)
Lutéine	100 (8.0)	100 (8.0)	84 (6.7)	44 (3.5)	43 (3.5)	32 (2.6)	0 --	
Néoxan.	100 (5.9)	65 (3.8)	61 (3.6)	53 (3.1)	52 (3.0)	35 (2.0)	35 (2.0)	
Viola.	100 (2.9)	< 9	11 4	9 2	7 2	5 0	3 0	0 --
$\beta$ -caro.	100 (9.7)	52 (5.0)			30 (2.9)	17 (1.7)	6 (0.6)	

Si on scrute davantage les autres pigments, on se rend compte que leur dégradation suit des phases. Par exemple, les **lutéines** sont très résistantes dans les premières secondes, et par la suite se dégradent rapidement. Au contraire, une très grande proportion des **néoxanthines** (35 %) se dégrade après seulement 5 secondes, et par la suite la dégradation est beaucoup plus lente. Même après 180 secondes d'éclairement, 35 % de ces pigments n'ont pas été altérés.

Quoique ces derniers pigments soient en quantité moindre que les chlorophylles au sein des PSI-200, il n'en demeure pas moins qu'ils contribuent pour une large part dans la distribution des excitons du complexe.

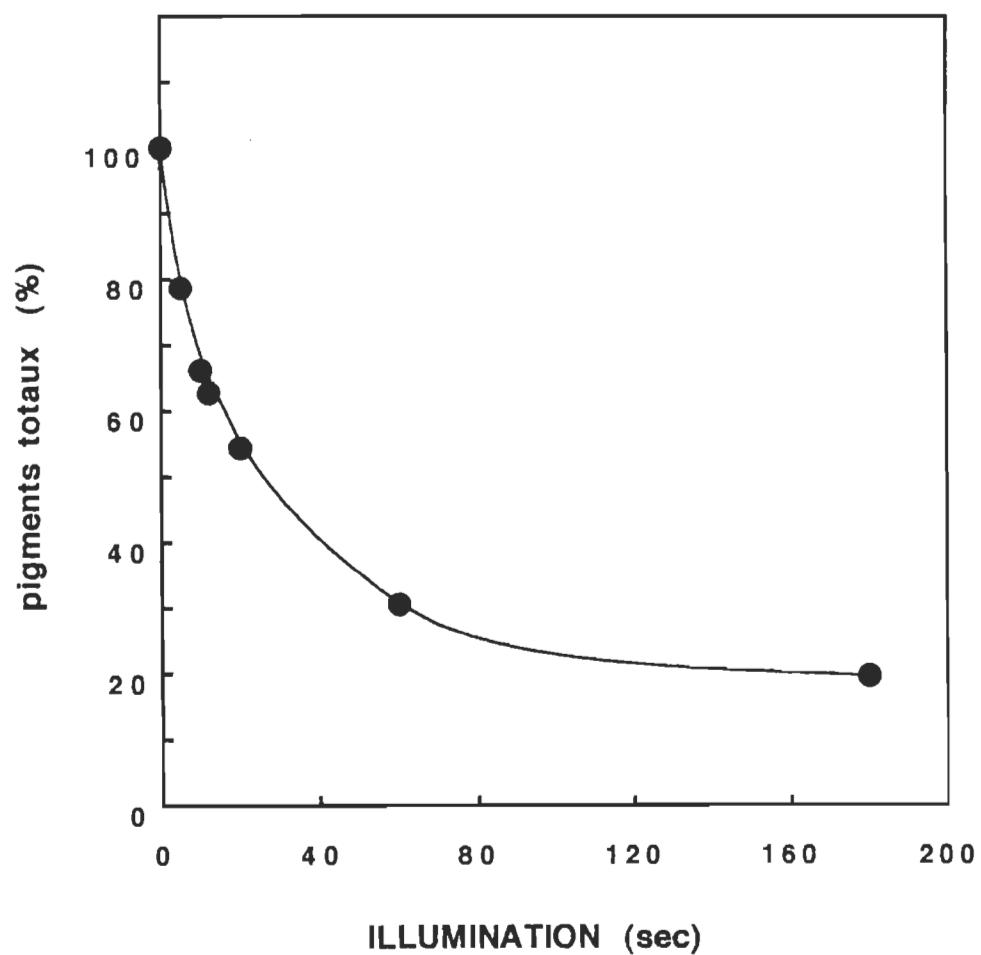
Les études ultérieures des complexes exempts d'antenne collectrice de lumière (PSI-100 et PSI-30), ainsi que le LHC-II, nous fourniront de précieuses informations sur le rôle de ces pigments.

### **3.4.2 Photodégradation des PSI-100**

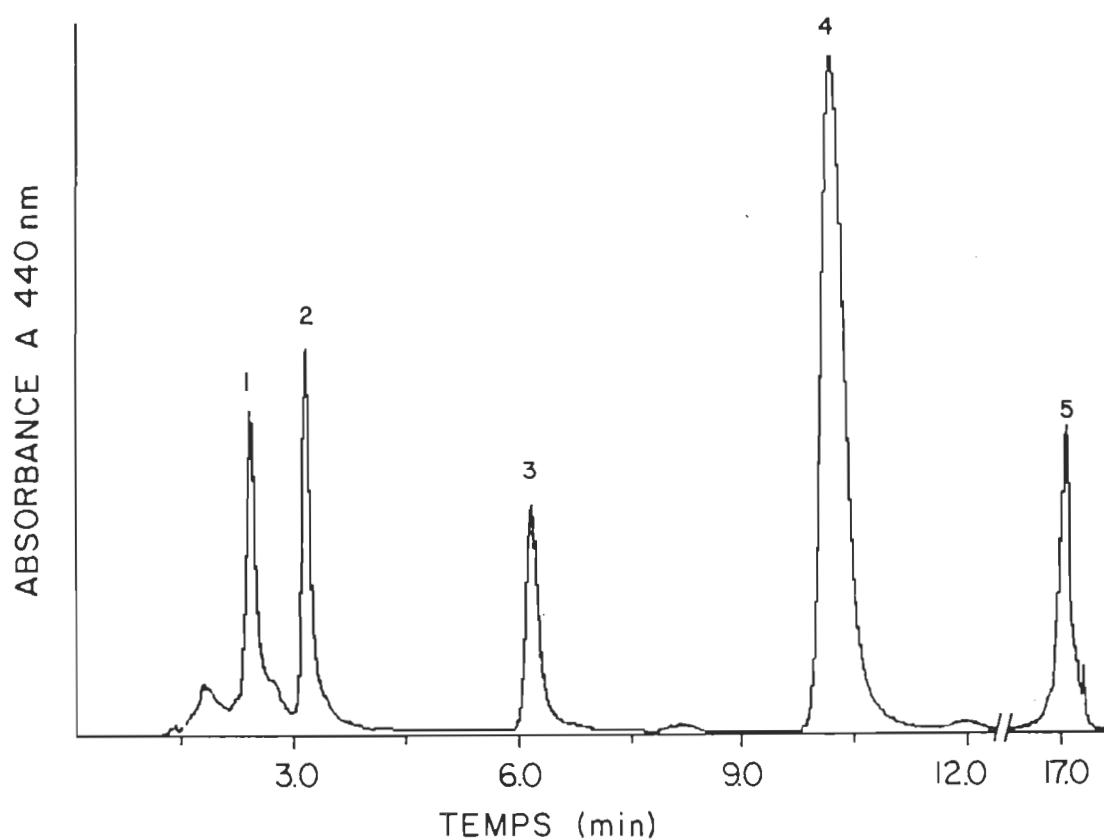
Ce type de particule permettra de mieux cerner le rôle et l'emplacement des différents pigments contenus dans le LHC-I du photosystème I. A la lumière de la **figure 39**, on constate que la dégradation pigmentaire, de façon générale chez le PSI-100, s'effectue uniformément, en relation avec le chromatogramme contrôle (**figure 40**). Le début de la cinétique de photodégradation, soit les trente premières secondes, est similaire aux particules de PSI-200 (voir **figure 36**). Par contre, il semble qu'il soit plus difficile de dégrader l'ensemble de ces pigments, puisqu'environ 25 % de ceux-ci résistent, après 180 secondes d'illumination intense, comparativement à moins de 10 % dans le cas des PSI-200. Seule la séparation, par groupes de pigments, peut lever le voile sur cette ambiguïté.

La **figure 41** démontre avec éloquence la photodégradation relative par groupes de pigments. Les **xanthophylles**, de façon générale se comportent de la même manière que chez les PSI-200; d'autant plus que leur abondance relative dans chaque particule est similaire (16.8 % chez les PSI-200 et 15.3 % chez les PSI-100).

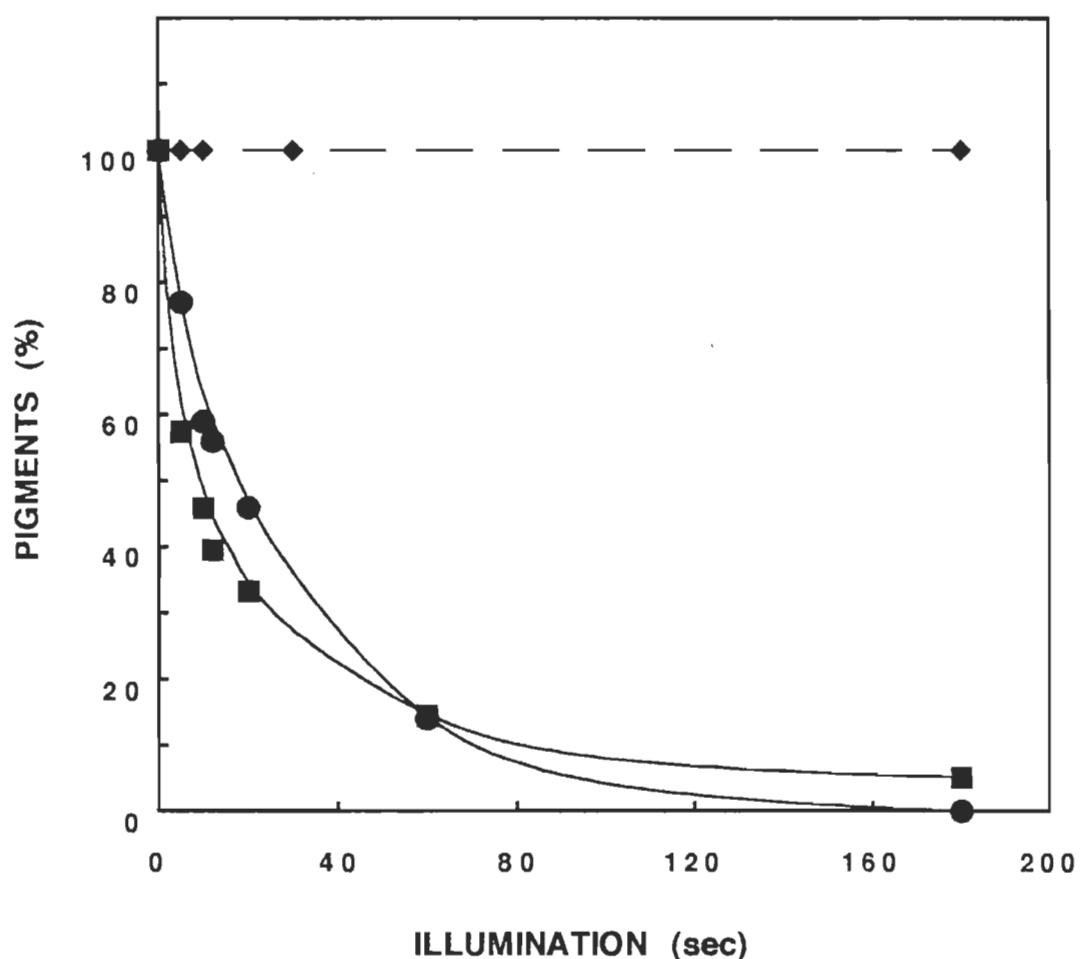
Dans le cas des **chlorophylles**, on n'observe pas de résistance au début de l'illumination comme pour les chlorophylles de l'antenne. Ainsi, le photoblanchiment est très rapide puisque nous croyons qu'aucune protection ne s'effectue par ce type de pigments. Les chlorophylles présentes ici sont entièrement représentées par les Chl-a, puisque les Chl-b se retrouvent uniquement dans les LHC-I. Près de 70 % (68.7 %) des pigments de ce complexe sont formés de Chl-a, comparativement à 73.5 % pour l'ensemble des chlorophylles du PSI-200. A la lumière de ces informations, on peut se demander comment s'effectue le transfert énergétique, sachant que la masse pigmentaire est similaire?



**FIGURE 39.** Dégradation relative des pigments totaux du PSI-100 en fonction du temps d'illumination, détectée par CLHP.



**FIGURE 40.** Chromatogramme par CLHP de la séparation des pigments des PSI-100 contrôles. 1 = néoxanthine; 2 = violaxanthine; 3 = lutéine; 4 = Chl-a; 5 =  $\beta$ -carotène.



**FIGURE 41.** Dégradation relative par groupes de pigments (Chls (●), xanthophylles (□) et Car (◆) des PSI-100 en fonction du temps d'illumination, détectée par CLHP.

La réponse à cette question réside peut-être dans l'élucidation des mécanismes énergétiques impliquant les **carotènes**. Cette dernière figure présente, de façon impérative, l'absence de photodégradation des carotènes, et cela même après 180 secondes à de fortes illuminations. Ce résultat est d'autant plus important, que ces pigments représentent 21.0 % des pigments totaux du complexe, par comparaison à 9.7 % pour les PSI-200. Sachant que les LHC-I ne contiennent pas de carotène (Preiss et al. 1993), tous ces pigments étaient également présents chez les PSI-200. Nous sommes en présence des mêmes pigments, dans des proportions égales, mais dont l'implication lors du transfert énergétique, est complètement différente...

Les chlorophylles de l'antenne du photosystème I sont très différentes des chlorophylles entourant le centre réactionnel. Pas seulement parce qu'une part importante est constituée de Chl-b, mais aussi au niveau du rôle qu'ils ont à jouer au niveau des thylacoïdes natifs. Le rôle bien connu des chlorophylles est de capter les photons, et de les retransmettre à un autre pigment (chlorophylle ou caroténoïde). Par contre, peu de choses ont été écrites sur les chlorophylles non-périphériques.

Suite aux présents résultats, nous pouvons avancer l'idée de dualité des chlorophylles-a. Le rôle premier de ceux-ci, dans les LHC-I et au niveau du centre réactionnel, soit de capter les photons, n'est pas modifié; par contre celui de transfert d'énergie, peut être différent entre ces deux emplacements tridimensionnels. La Chl-b favoriserait-elle davantage le transfert des photons vers les carotènes, que ne le feraient les Chl-a ? L'approfondissement de ce sujet ne peut être fait adéquatement sans la photodégradation des pigments pris séparément (**tableau 9**). De cette façon, l'implication de toutes les caroténoïdes s'en trouvera éclaircie.

**TABLEAU 9.** Photodégradation relative des pigments et photodégradation en fonction de la quantité respective de chacun des pigments (entre parenthèses), au niveau du PSI-100. (100 % = 100, 10, 7, 7, 33 et 1 pour la Chl-a, lutéine, néoxanthine, violaxanthine,  $\beta$ -carotène et le P-700 respectivement). L'erreur sur les mesures est au maximum de 4.5 % en valeur relative.

PIGMENTS	TEMPS D'ILLUMINATION (secondes)						
	0	5	10	12	20	60	180
Chl-a	100 (63.7)	77 (49.3)	59 (38.2)	56 (35.8)	46 (29.3)	14 (8.3)	0 --
Chl-b	0						
Lut.	100 (6.5)	82 (5.3) (0.9)	59 (3.4) (0.6)	59 (3.4) (0.5)	49 (3.1) --	16 (1.0)	5 (0.3)
Néo.	100 (4.4)	40 (1.8)	40 (1.8)	26 (1.2)	24 (1.0)	20 (0.9)	6 (0.2)
Viola.	100 (4.4)	40 (1.8) (0.5)	33 (1.5) (0.3)	25 (1.2) (0.2)	20 (0.9) (0.2)	7 (0.3) (0.15)	4 (0.2) --
$\beta$ -caro.	100 (21.0)						>

Les **chlorophylles-a** de ce complexe ne peuvent transférer efficacement l'énergie aux caroténoïdes; ils se font donc dégrader graduellement par la lumière. Ce transfert d'énergie vers un autre pigment, semble épargner complètement les  $\beta$ -carotènes, comparativement aux xanthophylles (lutéines, néoxanthines et la violaxanthines). Ces derniers pigments semblent être durement touchés par les fortes illuminations.

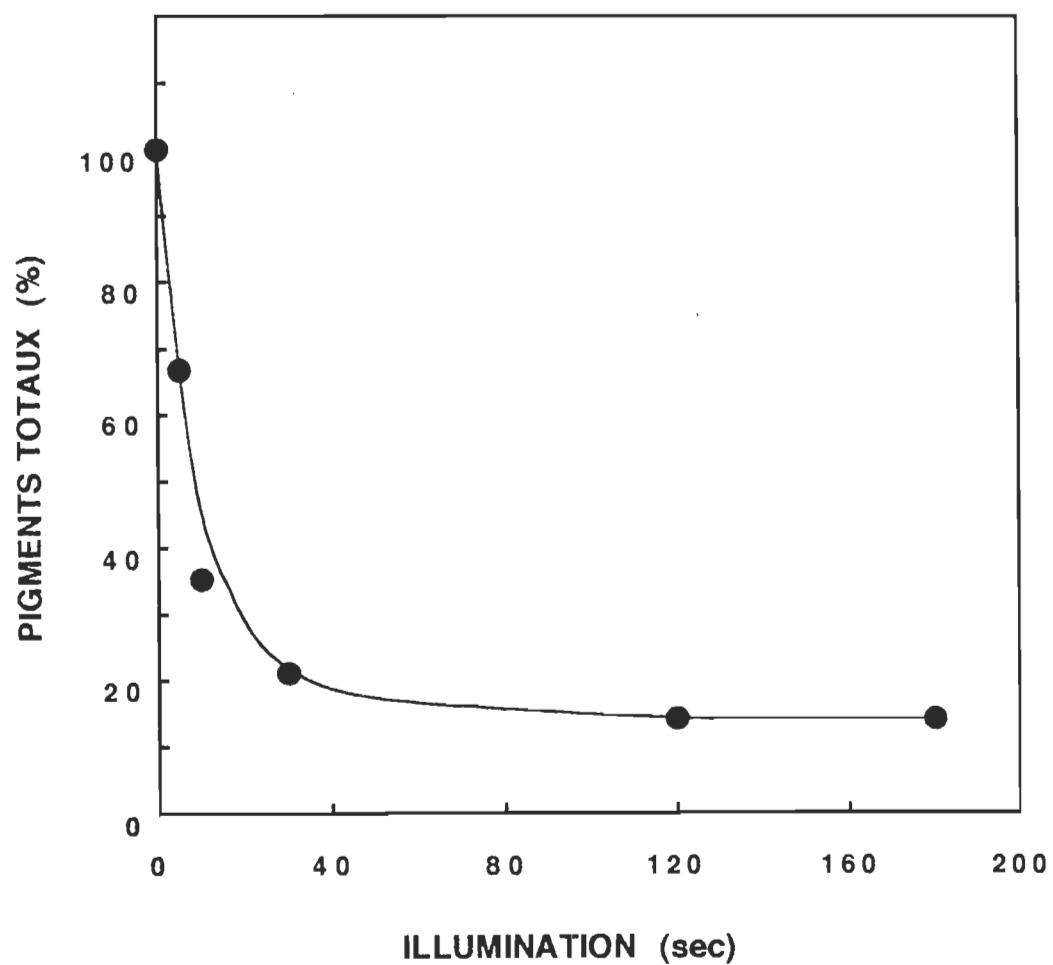
La **violaxanthine**, quoiqu'en quantité similaire, se dégrade moins rapidement chez le PSI-100 que chez le PSI-200. Cette photodégradation est également caractérisée par un produit secondaire qui est aussi sensible à l'illumination. De leur côté, les **lutéines** et les **néoxanthines** se dégradent uniformément. Si on observe les proportions de ces deux pigments au sein du complexe (tableau 7) en valeur absolue, environ les **deux tiers** sont logés dans le **LHC-I**; par contre, environ 70 % des violaxanthines sont au coeur du complexe. Ces constatations semblent converger vers un postulat voulant que les pigments secondaires soient au service des chlorophylles. Avec la prochaine particule membranaire (PSI-30), qui est grandement dénudée en pigments, on tentera de vérifier cette spéculation.

### **3.4.3 Photodégradation des PSI-30**

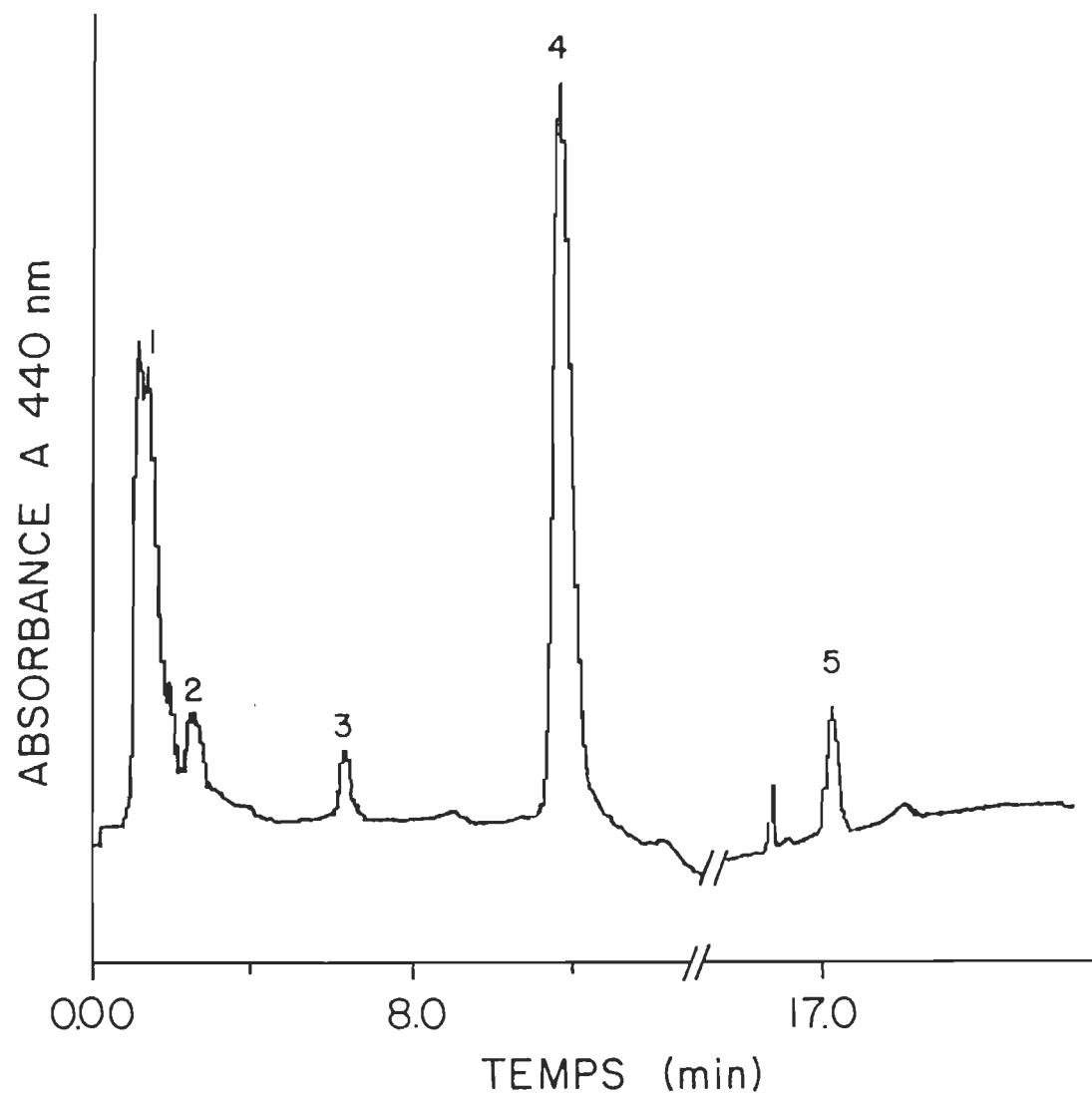
Ce type de particule membranaire est grandement dépouillé, et cela pour tous les groupes de pigments (tableau 7). En observant les trois complexes jusqu'ici présentés, on note une augmentation de la quantité **relative de chlorophylles-a**, passant de 58.8 à 69.8 %, à mesure qu'on diminue la taille de l'antenne. Ce pigment serait probablement localisé en grande partie, près du centre réactionnel (P-700), comparativement aux caroténoïdes, qui sont principalement localisés dans le LHC-I et en périphérie du complexe.

La **figure 42** nous montre la photodégradation très rapide, caractéristique des complexes membranaires présentés jusqu'ici. Cette dégradation est même plus rapide, et semble biphasique. Après seulement 10 secondes de photoblanchiment, il ne reste plus que 40 % des pigments totaux, alors que chez les autres particules, 68 et 82 % des pigments des PSI-200 et PSI-100 respectivement, ont résisté. Ceci nous indique que la grande quantité de **chlorophylle-a**, a largement influencé l'altération pigmentaire du PSI-30. Par contre, après 30 secondes (lorsque la Chl-a est complètement dégradée ?), la masse pigmentaire se stabilise. Ces mesures sont basées sur le chromatogramme contrôle (**figure 43**).

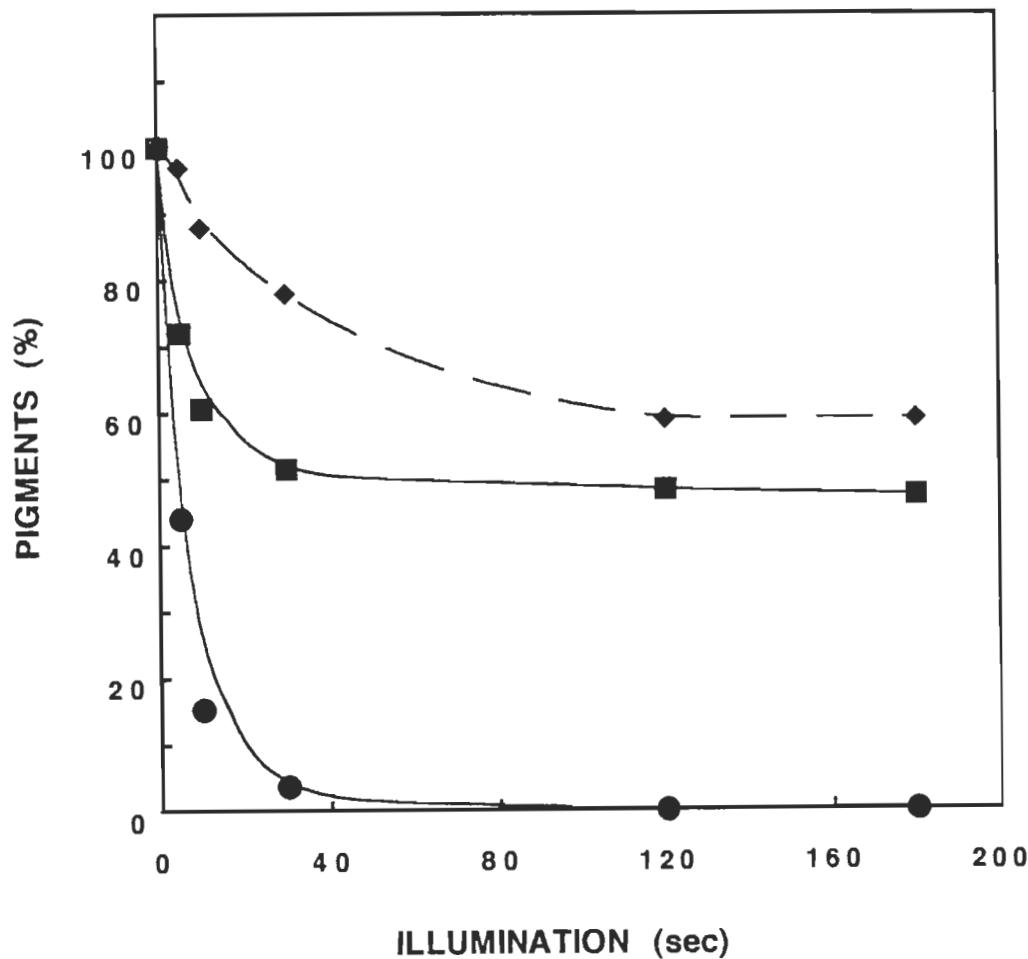
La photodégradation par groupes de pigments confirme les spéculations précédentes, voulant que la Chl-a soit détériorée en premier lieu (**figure 44**). Après seulement 30 secondes, il ne reste presque plus de trace de ce pigment. Par contre, le plateau de la figure précédente, est justifié par la relative résistance des **caroténoïdes** (qui compte pour plus de 25 % des pigments totaux), aux fortes illuminations.



**FIGURE 42.** Dégradation relative des pigments totaux du PSI-30 en fonction du temps d'illumination, détectée par CLHP.



**FIGURE 43.** Chromatogramme par CLHP de la séparation des pigments des PSI-30 contrôle. 1 = néoxanthine; 2 = violaxanthine; 3 = lutéine; 4 = Chl-a; 5 =  $\beta$ -carotène.



**FIGURE 44.** Dégradation relative par groupes de pigments (Chls (●), xanthophylles (■) et Car (♦) des PSI-30 en fonction du temps d'illumination, détectée par CLHP.

Ceci nous amène à constater que le rôle des pigments est fonction de leur **emplacement tridimensionnel**. L'extraction des PSI-30 en comparaison avec celle des PSI-100, a permis de retirer plus de 75 % des caroténoïdes. Cette petite quantité de caroténoïdes rattachée au PSI-30, transfère l'énergie de façon très efficace. De tous les  **$\beta$ -carotènes** présents dans le complexe du PSI, la faible quantité de ceux-ci, que nous avons isolés dans le PSI-30 (environ 20 %, soit 7/33, voir le tableau 7), se comporte différemment en comparaison avec l'ensemble du complexe, puisqu'ils sont moins résistants que dans les PSI-100 mais plus résistants que dans les PSI-200. Cette constatation s'applique également aux **xanthophylles**, qui constituent 25 % (3 + 2 + 1/10 +7 +7, voir le tableau 7), du complexe de PSI-100. La résistance de ces petits groupes de pigments était noyée lors de la photodégradation des complexes de PSI-100.

Ces deux exemples corroborent de façon claire le rôle allégué par la localisation différentielle chez les types de pigments. Maintenant, dans le but de comprendre le comportement dualiste de ce type de pigment, il est capital de cerner le ou les pigments en cause.

Le **tableau 10** montre le contenu de chaque pigment au sein du complexe de PSI-30. Pour la première fois, on constate que la photodégradation de la **chlorophylle-a**, initie la formation d'un produit secondaire, et cela dès le début. Ce dernier résultat suggère une dégradation extrêmement rapide schématisée à la figure 44. A l'exception des **lutéines** (qui comptent pour environ 50 % des xanthophylles de ce complexe), qui se dégradent très rapidement (mais qui comportent un produit de dégradation secondaire), les **néoxanthines** et les **violaxanthines** sont extrêmement résistantes aux fortes illuminations. Ces pigments sont d'excellents transporteurs d'excitons, ou ils sont extrêmement bien protégés et ne participent pas au flux de photons; ou encore ils sont physiologiquement et moléculairement mieux adaptés aux stress lumineux.

**TABLEAU 10.** Photodégradation relative des pigments et photodégradation en fonction de la quantité respective de chacun des pigments (entre parenthèses), au niveau du PSI-30. (100 % = 30, 3, 2, 1, 7 et 1 pour la Chl-a, lutéine, néoxanthine, violaxanthine,  $\beta$ -carotène et le P-700 respectivement). L'erreur sur les mesures est au maximum de 8.0 % en valeur relative.

PIGMENTS	TEMPS D'ILLUMINATION (secondes)					
	0	5	10	30	120	180
<hr/>						
Chl-a	100 (69.8)	47 (32.8) 100 (10.4)	18 (12.5)	4 (2.8)	0	---
Chl-b	0		(2.9)	0	--	
Lut.	100 (7.0)	44 (3.1) 100 (1.2)	22 (1.5)	6 (0.5)	0	
Néo.	100 (4.6)	----->				
Viola.	100 (2.3)	100 (2.3)	100 (2.3)	92 (2.1)	92 (2.1)	83 (2.0)
$\beta$ -caro.	100 (16.3)	97 (16.0) 100 (0.2)	88 (14.5)	78 (12.9)	59 (9.7)	59 (9.7)
			(0.5)	(1.2)	(1.2)	(0.9)

La résistance un peu timide des  $\beta$ -carotènes que révélait la figure 44, comparativement à la figure 41 (chez les PSI-100), s'éclaircit en partie, à la lumière des résultats du tableau 10. En se dégradant ce pigment génère une forme intermédiaire, dont le pourcentage relatif complète une part de sa perte. Ce qui en fait également un pigment similaire aux néoxanthines et aux violaxanthines.

Avant d'aborder une discussion approfondie sur le rôle des pigments via leur emplacement respectif, l'étude d'un dernier complexe membranaire viendra compléter le tableau: les particules de l'antenne collectrice de lumière du PSII (LHC-II) phosphorylées et localisées du côté du PSI.

### **3.4.4 Photodégradation des LHC-II**

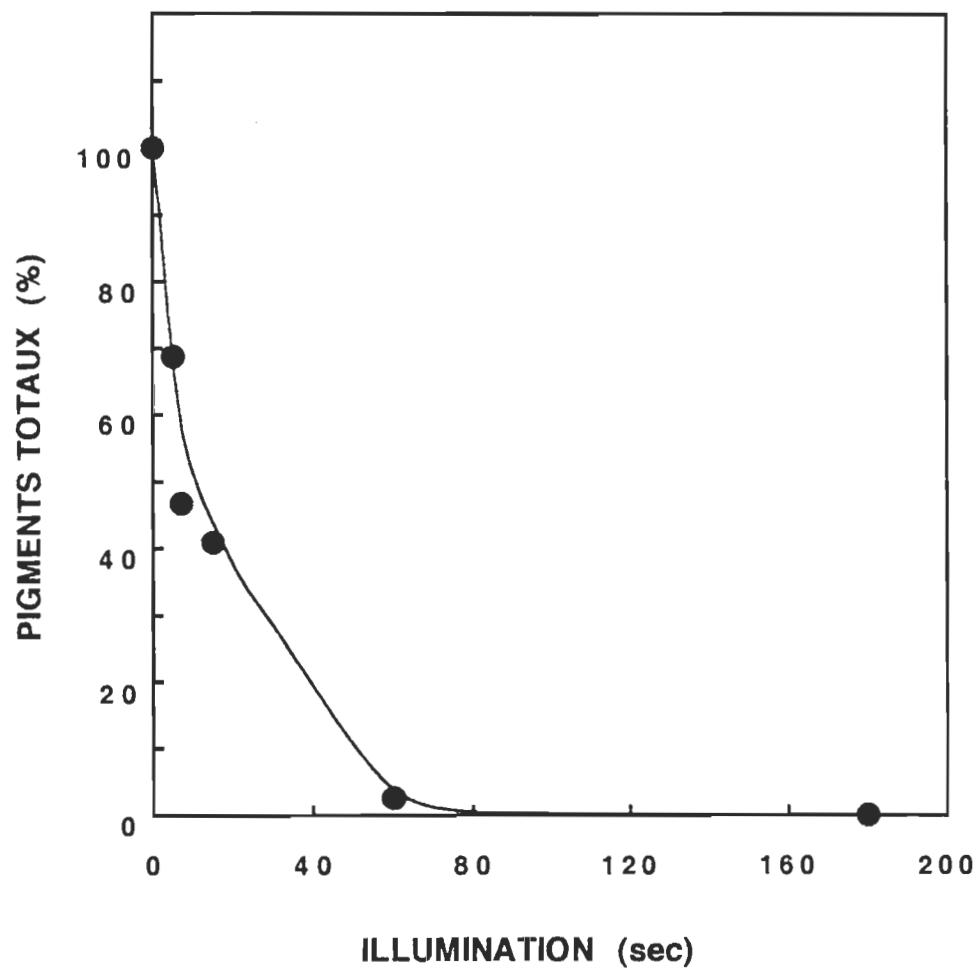
Le LHC-II en tant que complexe membranaire ne fait pas partie intégrante du photosystème I, mais y est intimement relié dans le cas où il y a un excès de photons absorbés par le photosystème II. Cette antenne collectrice de lumière est mobile (par phosphorylation/déphosphorylation), et donc, l'implication au sein du PSI est capitale (voir le chapitre 1).

Ce complexe, dont la quantité de pigments est basée presque exclusivement sur l'expérimentation (Dahlin, 1988), n'est pas normalisé en fonction du centre réactionnel. Compte tenu de l'absence de P-700, le LHC-II pris de façon isolée, semble très sensible à la lumière (**figure 45**). La photodégradation est très rapide pour l'ensemble des pigments, puisqu'après 60 secondes, il ne reste que des traces de ceux-ci.

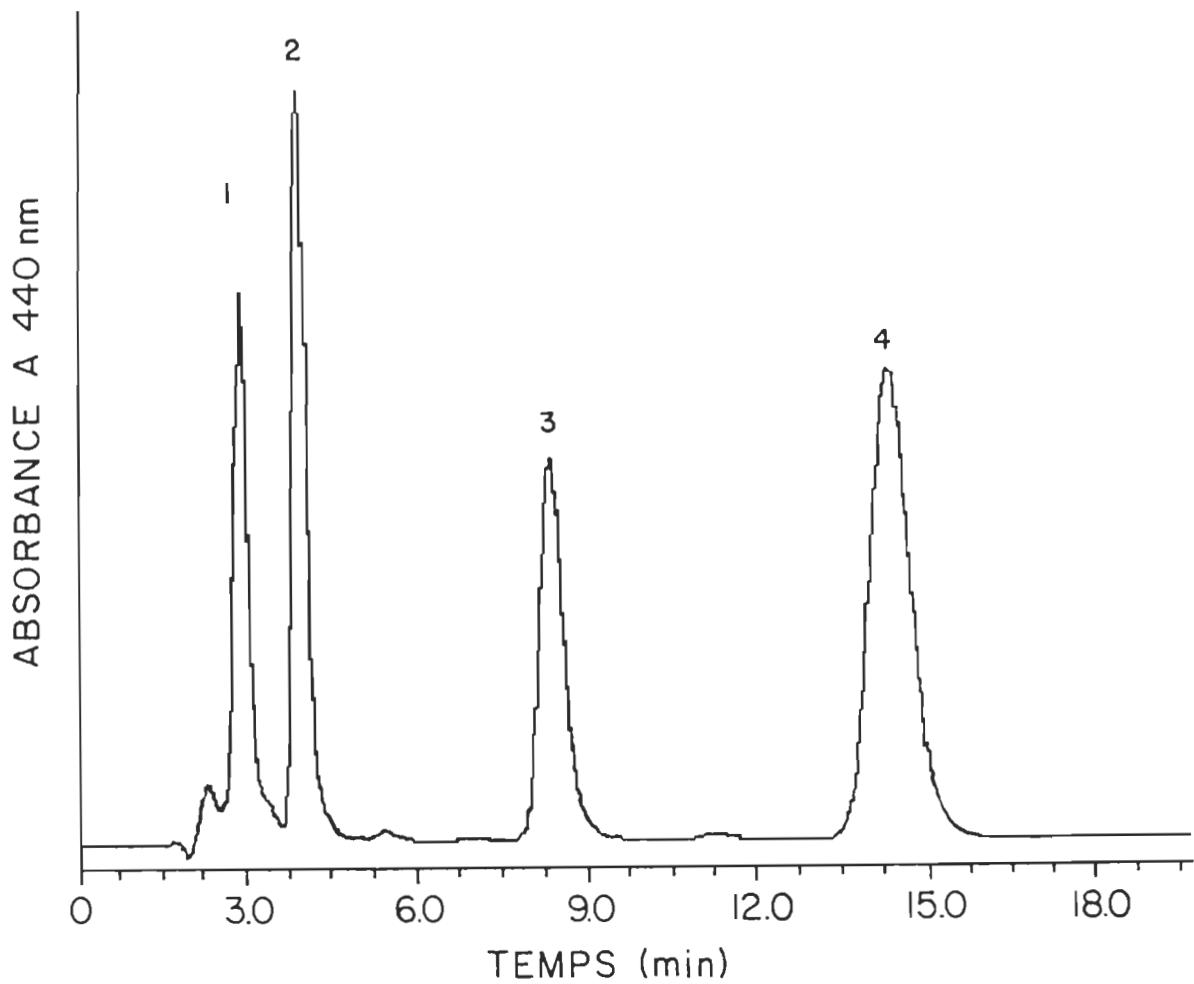
On constate que la garniture pigmentaire de ce complexe est passablement mince. Aucune trace de  $\beta$ -carotène ni de lutéine (tableau 7, **figure 46**) n'a été décelée. L'étude des extraits précédents nous a

appris que ces deux pigments avaient, règle générale, un comportement antagoniste. Le  $\beta$ -carotène a démontré un caractère très résistant (en absence de LHC-I), et serait donc probablement impliquée lors de l'efficacité du transfert d'énergie. Tandis que l'absence de la lutéine, occasionne une carence en transporteurs de photons en bout de chaîne. Les autres xanthophylles présentes ont une lourde tâche dans les LHC-II isolés, d'autant plus qu'il n'y a pas de P-700 pour initier une séparation de charge, engorgeant ainsi le système.

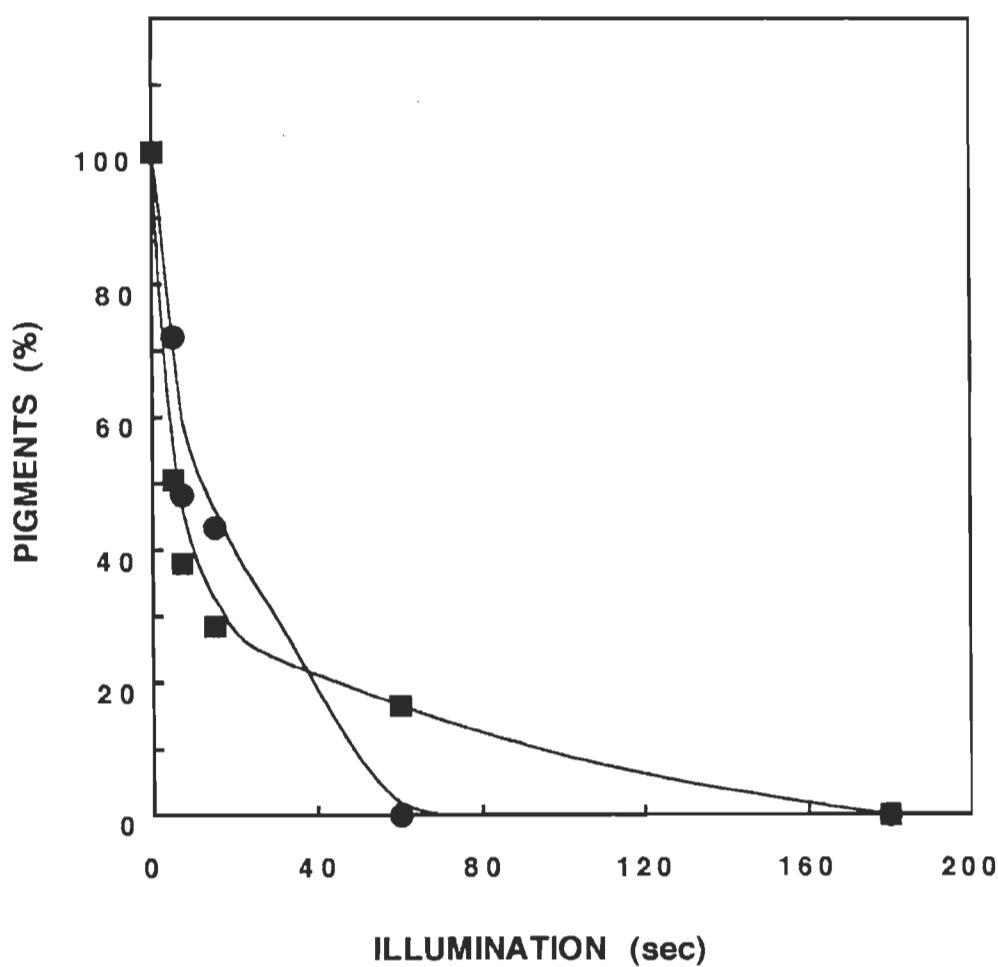
En séparant les groupes de pigments, on constate une fois de plus que les chlorophylles sont plus sensibles à la photodégradation que les xanthophylles (**figure 47**).



**FIGURE 45.** Dégradation relative des pigments totaux du LHC-II en fonction du temps d'illumination, détectée par CLHP.



**FIGURE 46.** Chromatogramme par CLHP de la séparation des pigments des LHC-II contrôle. 1 = néoxanthine; 2 = violaxanthine; 3 = Chl-b; 4 = Chl-a.



**FIGURE 47.** Dégradation relative par groupes de pigments (Chls (●) et xanthophylles (■) des LHC-II en fonction du temps d'illumination, détectée par CLHP.

Par contre, en l'absence de  $\beta$ -carotène (et de centre réactionnel), qui sont en quantité appréciable au niveau du cœur du complexe, les xanthophylles résistent peu aux fortes illuminations.

Au niveau des Chl-a et -b, il n'y a pas de grande surprise, leur photodégradation est uniforme et très rapide (**tableau 11**). Par contre, ce qui est particulièrement intéressant, c'est la façon dont sont altérées les xanthophylles. La **violaxanthine** et surtout la **néoxanthine**, sont légèrement plus résistantes que les chlorophylles, malgré une dégradation initiale plus rapide. Ces affirmations sont consolidées par la manière dont ces pigments se défendent et s'adaptent à la nouvelle demande du milieu en formant des intermédiaires plus stables.

Le tableau 11 montre clairement que plusieurs produits de dégradation sont formés à la suite de l'altération des xanthophylles. Si on additionne les valeurs de pourcentage réelles pour chaque pigment, cela confirme la très grande résistance de ces deux holochromes. De plus ces résultats attestent l'importance capitale des xanthophylles au sein des complexes protéiques en vue de la distribution des excitons.

Il est à noter que les produits de dégradation sont assujettis **arbitrairement**, étant adjacents aux pigments principaux. Par contre, il n'est pas exclu que ces produits soient à ce point différents qu'ils soient plus ou moins retenus par la colonne (voir la section suivante).

**TABLEAU 11.** Photodégradation relative des pigments et photodégradation en fonction de la quantité respective de chacun des pigments (entre parenthèses), au niveau du LHC-II. (100 % = 50, 30, 7, 8 pour la Chl-a, Chl-b, néoxanthine, violaxanthine respectivement). L'erreur sur les mesures est au maximum de 4.1 % en valeur relative.

PIGMENTS	TEMPS D'ILLUMINATION (secondes)					
	0	5	7	15	60	180
Chl-a	100 (52.6)	68 (35.8)	45 (23.7)	40 (21.0)	0 --	---
Chl-b	100 (31.6)	79 (25.0)	54 (17.1)	49 (15.5)	0 --	---
Lut.	0					
Néo.	100 (7.4)	58 (4.3) (3.0)	49 (3.6) (3.0)	38 (2.8) (1.4)	31 (2.3) (1.4)	0 --
Viola.	100 (8.4)	44 (3.7) (0.9) (1.0)	28 (2.4) (0.5) (1.0)	20 (1.7) (0.4) (0.8)	3 (0.3) (0.4) (0.8)	0 -- --
β-caro.	0					

### **3.5 DUALISME PIGMENTAIRE: ANTENNE COLLECTRICE DE LUMIÈRE/PHOTOPROTECTION ?**

Cette section a pour objectif premier de faire une récapitulation des résultats obtenus antérieurement (3.4), et cela en considérant la littérature comme point de repère. Les pigments scrutés à la loupe ont des fonctions spécifiques en relation avec leur environnement immédiat et leur emplacement tridimensionnel.

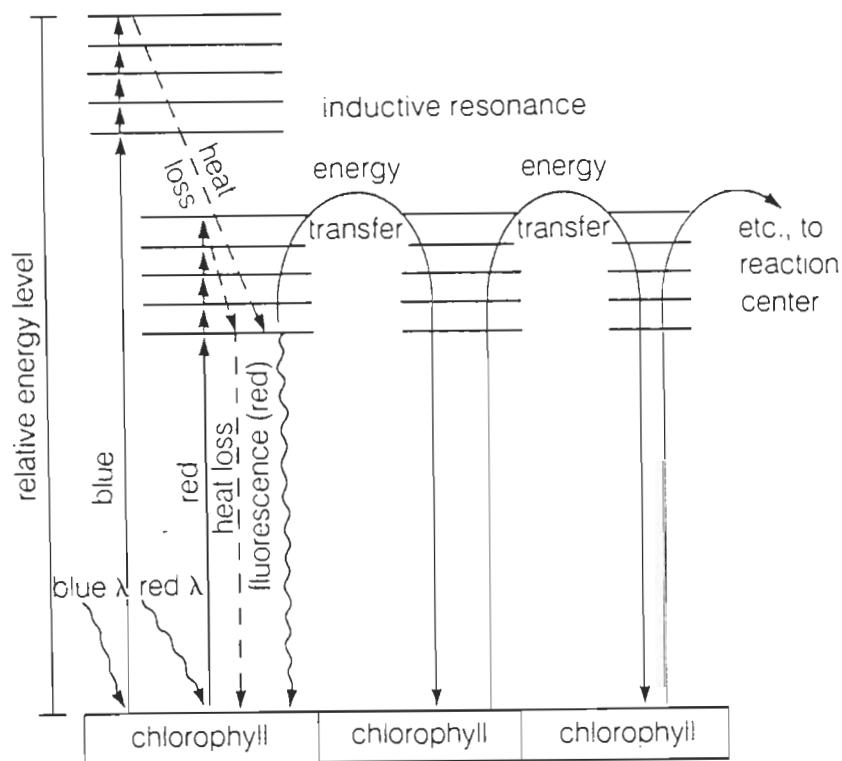
#### **3.5.1 Flux photonique**

Les chlorophylles, principalement la Chl-a, sont reconnues pour être d'excellents capteurs de photons, et ainsi initier le transfert énergétique jusqu'au centre réactionnel (voir l'introduction). Par contre le jeu subtil qu'ils entretiennent avec les caroténoïdes est particulièrement obscur.

Nous aurons l'occasion de revenir sur l'implication des chlorophylles, mais pour comprendre les interactions de la masse pigmentaire, il est primordial de bien suivre les **caroténoïdes** et de comprendre leurs rôles respectifs en fonction de leur organisation. Nous commencerons cette section par une brève incursion au niveau de la fonction d'antenne collectrice de lumière par les pigments. Par la suite, nous appliquerons ces notions dans le but d'introduire la fonction la plus représentative des caroténoïdes: la photoprotection.

La lumière peut être considérée de nature ondulatoire ou particulaire. La nature particulaire de la lumière est exprimée en quanta ou **photons**: ce sont des paquets d'énergie dont chacun a une longueur d'onde spécifique. L'énergie de chaque photon est inversement proportionnelle à sa longueur d'onde. Une molécule (pigment) ne peut absorber qu'un photon à la fois, et ce photon ne peut exciter qu'un seul électron.

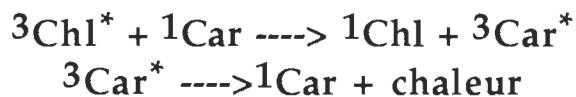
L'électron dans son état **fondamental**, peut être excité à une distance correspondant à l'énergie exactement égale à l'énergie d'un photon absorbé. Le pigment est maintenant dans un état **excité** (singulet ou triplet), et l'énergie d'excitation est utilisée lors du processus de la photosynthèse (**figure 48**).



**FIGURE 48.** Modèle simplifié du transfert énergétique (excitation et dé-excitation; Salisbury et Ross, 1992).

Les caroténoïdes ne sont pas seulement impliqués dans l'assemblage (Senger et Straßberger, 1978; Braumann et al., 1984; Humbeck et al., 1989) des photosystèmes, mais aussi comme **photoprotecteurs** et comme **antenne collectrice de lumière**, comme nous le verrons dans les lignes qui suivent.

**3.5.1.1 La fonction de photoprotection des caroténoïdes** inclut le transfert d'énergie de la Chl dans son état triplet ( $^3\text{Chl}^*$ ) vers une caroténoïde dans son état fondamental ( $^1\text{Car}$ ), et la dissipation de l'énergie à travers une relaxation non-radiative de la caroténoïde résultante ( $^3\text{Car}^*$ ) (Krinski, 1979; Cogdell, 1985; Siefermann-Harms, 1987; Frank et al., 1991; Mimuro et Katoh, 1991; Young, 1991):



Le "quenching" de la  $^3\text{Chl}^*$  prévient la génération de l'oxygène singulet et des superoxydes (qui sont produits par l'accumulation de l'excès d'énergie) en favorisant la  $^3\text{Car}^*$  (Mathis et Schenck, 1982), cette fonction est particulière aux caroténoïdes (Koyama, 1991). L'oxygène singulet et les superoxydes peuvent également être formés du côté réducteur du PSI. Une grande quantité est convertie en peroxyde d'hydrogène et en oxygène par la superoxyde dismutase (Takahashi et Asada, 1988). La fonction principale de ces pigments associés au complexe du centre réactionnel est d'accepter l'énergie (triplet) des chlorophylles, et de la dissiper en chaleur.

Le tableau 8 démontre bien que la présence de  $\beta$ -carotène au sein du centre réactionnel dans le PSI-200, c'est-à-dire lorsque le LHC-I est présent, facilite le transfert d'énergie  $^3\text{Chl}^* \rightarrow ^1\beta\text{-carotène}$ . Ce phénomène protège grandement la chlorophylle-a et -b du LHC-I. En absence de l'antenne collectrice de lumière (ou lorsque l'excès de lumière est tel, que les pigments périphériques du centre réactionnel

prennent la relève), la Chl-a n'est pas protégée et se dégrade de façon graduelle (tableau 9). Ce phénomène peut s'expliquer de deux manières: 1° soit que le  $\beta$ -carotène ne participe pas au transfert d'énergie dû au manque d'affinité de l'état d'énergie des Chl, ou 2° soit que le  $\beta$ -carotène serve d'antenne, au même titre que la Chl et les xanthophylles de l'antenne, et de cette façon, ce pigment n'est jamais en bout de chaîne énergétique. Cette dernière affirmation corrobore davantage les hypothèses mentionnées dans la littérature, et suggère la grande versatilité de ce pigment.

Il y aurait trois voies pour générer la  $^3\text{Car}^*$ : 1° la recombinaison de charges dans le centre réactionnel, 2° l'homofission (singulet) entre les caroténoïdes et 3° le transfert énergétique (triplet) d'une Chl vers une Car chez les LHC. Les voies 2° et 3° indiquent un rapport étroit (proximité) entre les caroténoïdes (Car-Car) et les chlorophylles (Chl-Chl) chez les LHC (Kingma et al., 1985a et b). L'homofission a d'ailleurs été révélée dans plusieurs cas de caroténoïdes (Nuijs et al., 1985; Hayashi et al., 1990; Naruse et al., 1991). Le transfert énergétique entre caroténoïdes s'effectue dans l'ordre de la femtoseconde (Owens et al., 1992), ce qui pourrait expliquer la versatilité de ce type de pigment.

Le cœur du centre réactionnel du PSI (PSI-30) est très dépouillé en pigment (tableau 7), mais le contenu en Chl-a est de plus en plus important quand on approche du P-700 (69.8 %). Ce que l'on constate en observant la photodégradation de ce complexe, c'est la grande sensibilité de la Chl-a (altération), sachant que les quantités sont les mêmes (en valeurs absolues) que dans les complexes de PSI-200 et PSI-100 (tableau 10). De plus, on observe la formation d'un produit secondaire à la Chl-a survenant lors de sa détérioration.

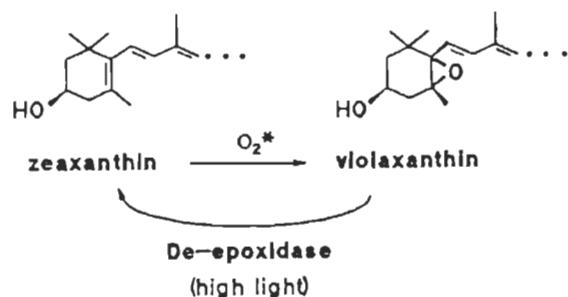
La **néoxanthine** et la **violaxanthine**, qui sont en quantité minimale dans ce complexe, ne sont aucunement ou très peu modifiées par l'illumination. Ces deux pigments sont probablement associés au

transfert indirect (ou direct ?) au P-700 puisque la population périphérique était très affectée par la lumière.

Le  $\beta$ -carotène semble confirmer son rôle d'antenne et de photoprotection. Dans ce cas, peu de xanthophylles peuvent pallier cette dernière fonction, puisqu'ils sont trop près du centre réactionnel. Par contre, si on additionne la quantité (en pourcentage) de dégradation secondaire, la valeur totale de photoblanchiment du  $\beta$ -carotène est minimisée.

Pour chaque extrait membranaire, la lutéine est bien représentée, et semble avoir une vocation inflexible de collecteur de photons dans le complexe de PSI-200... Par ce fait, ce pigment pourrait être le lien électronique entre l'antenne (LHC-I) et le PSI-100, tel que suggéré par Gillbro et ses collaborateurs (1993).

Le pigment le mieux connu, faisant partie du processus de photoprotection est la zéaxanthine. A forte illumination, l'appareil photosynthétique dé-époxyde la violaxanthine via l'anthéraxanthine en zéaxanthine (Siefermann-Harms, 1977; Yamamoto, 1979; Hager, 1980; Bilger et al. 1989; Bilger et Björkman, 1990; Bilger et Schreiber, 1990; Demmig-Adams, 1990). A l'obscurité ou à faible irradiance, la réaction inverse prend place (Demmig-Adams et al., 1987, 1990; Bilger et al. 1989). Les réactions du cycle des xanthophylles sont catalysées par deux enzymes: la dé-époxydase et l'époxydase. La dé-époxydase est activée par des conditions réductrices (NADPH, ascorbate réduit) et un pH dans le lumen des thylacoïdes d'environ 5 (Choudhury et al., 1993):

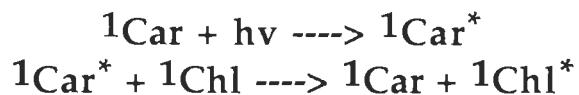


Dans ces conditions, la biosynthèse de la zeaxanthine augmente également, et que ces deux phénomènes sont indépendants (Lichtenthaler et Schindler, 1992; Eickmeier et al., 1993).

L'identification des produits de dégradation n'ont pas été incorporés au pigment principal car le résultat de cette dégradation n'est pas nécessairement juxtaposé (temps de rétention) au pigment principal lors de la CLHP. Par exemple, la dégradation de la violaxanthine dans les complexes de PSI-200 et PSI-100 (tableaux 8 et 9), serait probablement un **époxyde de lutéine** (Siefermann-Harms, 1988). Par contre, toujours en s'appuyant sur les travaux de Siefermann-Harms, le produit de dégradation adjacent à la lutéine dans les complexes de PSI-100 et PSI-30 (tableaux 9 et 10), serait de la **zéaxanthine** provenant de la dégradation de la violaxanthine. Dans une même lancée, lorsque les moyens échappatoires aux fortes illuminations sont restreints (PSI-30), la Chl-a se dégrade en **phéophytine-a**, et cela dans une proportion importante; mais ce pigment est rapidement dégradé à son tour (voir la section 1.1.5 3°, Siefermann-Harms, 1988; Maeda et Watanabe, 1992). Il est à noter que des pics minimes, dont la détection est à la limite de l'appareil, et qui pourraient être attribués à la **Chl-a'**, ont été décelés (Maeda et Watanabe, 1992; Maeda et al., 1993).

Bien que le phénomène de photoprotection lié à la zéaxanthine, comme mentionné antérieurement, soit principalement effectif au niveau du complexe du centre réactionnel, l'époxydase est retrouvée également dans les préparations de LHC-II (non-mobile) (Gruszecki et Krupa, 1993).

**3.5.1.2 La fonction d'antenne collectrice de lumière chez les caroténoïdes,** s'observe lorsqu'il y a absorption de l'énergie lumineuse par une  $^1\text{Car}$  pour générer un état d'excitation singulet  $^1\text{Car}^*$ , et puis le transfert d'énergie à une Chl dans son état fondamental (Larkum et Barrett, 1983; Siefermann-Harms, 1985; Owens et al., 1992):



Les caroténoïdes peuvent donc servir d'antenne collectrice de lumière dans les régions où la Chl n'est pas très efficace (Wasielewski et al., 1986; Trautman et al., 1990). Sachant que la quantité de  $\beta$ -carotène (le seul pigment détecté, absent des LHC-I) est stable au niveau de l'extraction des PSI-200 et PSI-100 (33/P-700), nous pouvons affirmer que la perte de pigments (libres) est minimisée (tableau 7).

Les Chl-b absorbent l'énergie au sein du LHC-I, et la retransmettent aux Chl-a ou aux Car de façon très efficace. Ces pigments sont très résistants aux fortes illuminations, et cela jusqu'à environ la quinzième seconde. Compte tenu qu'il n'y a pas de  $\beta$ -carotène dans ce complexe, les trois autres caroténoïdes doivent pallier à l'absorption des photons en ces conditions extrêmes. Quoique faiblement représentée dans l'antenne de pigment (3/10), la **violaxanthine** est la plus durement touchée: après seulement 5 secondes elle est dégradée à environ 80 % (tableau 8). En observant ce pigment exclusivement dans le centre réactionnel (tableau 9), on constate une altération moins prononcée, indiquant qu'elle participe à l'absorption directe des photons dans le LHC-I. Ce pigment est d'ailleurs le seul à se photodétruster en une forme intermédiaire (nous aurons l'occasion de revenir sur ce sujet).

Les deux autres xanthophylles présentes sont beaucoup plus résistantes que la violaxanthine. La **néoxanthine**, dont la grande

majorité se trouve dans le LHC-I (13/20), se dégrade très rapidement (45 % dans le PSI-200), et cela seulement après 5 secondes. Par contre, cette baisse rapide est également observée chez les complexes de PSI-100 (60 % après 5 secondes). Cela nous indique que l'altération de ce pigment est principalement localisé au niveau du centre réactionnel, et donc qu'il ne participerait que de façon accessoire à l'absorption des photons au niveau de l'antenne. De plus, les néoxanthines du LHC-I du PSI-200 sont moins touchées par de fortes illuminations prolongées (180 secondes) comparativement au PSI-100, ce qui corrobore son implication négligeable lors de l'absorption lumineuse (voir les tableaux 8 et 9). Enfin, la **lutéine** se comporte différemment au niveau des PSI-100, principalement du fait qu'elle se dégrade en formant des produits secondaires. Suite à ces observations, nous ne pouvons pas avancer, pour le moment, de conclusion trop hâtive sur ce pigment.

Le comportement du  **$\beta$ -carotène** dans le centre réactionnel, est spectaculaire. Quoiqu'elle constitue 21.0 % des pigments de ce complexe, elle n'est aucunement affectée par l'illumination (tableau 9). On constate clairement que le  $\beta$ -carotène joue un rôle très différent, selon qu'il est logé dans l'antenne ou au coeur du complexe, puisque la dégradation est très prononcée chez le PSI-200, donc dans l'antenne de pigment du PSI. Ce pigment est le caroténoïde le plus abondant du complexe de PSI-200 (environ 10 %). Lors du transfert d'énergie faisant intervenir le  $\beta$ -carotène, la **Chl-b** pourrait jouer une rôle non-négligeable.

Dès caroténoïdes, il semble que les **lutéines** et les  **$\beta$ -carotènes** soient ceux qui démontrent la plus grande affinité à l'absorption lumineuse de façon accessoire (voir la section 3.5.1.1). Par contre, lorsque ces pigments sont absents du complexe, les autres pigments n'ont d'autre choix que d'accomplir cette fonction. C'est ce que nous observons en présence d'antenne collectrice de lumière isolée (tableau 11). Les **LHC-II** (mobile) ont pour fonction première de distribuer l'énergie du PSII en excès vers le PSI (voir le chapitre 1). Il semblerait que les

xanthophylles du LHC-II répertoriées chez les bactéries photosynthétiques, auraient un rôle structural, mais il en est tout autrement chez les LHC-II mobiles (Tadros et al., 1989; Zurdo et al., 1993), car elles participent aux transferts d'excitons. L'absence de ces deux pigments (lutéine et  $\beta$ -carotène) inhiberait la possibilité que des photons supplémentaires soient absorbés et transférés (singulet-singulet) en excès au centre réactionnel. D'après les travaux de Bassi et ses collaborateurs (Dainese et al., 1992), le LHC-II (non-mobile) ne contient pas de  $\beta$ -carotène, mais contrairement au complexe étudié ici, il contiendrait beaucoup de lutéine (77 % des caroténoïdes), expliquant ainsi les différences fondamentales entre les fonctions de ces deux complexes.

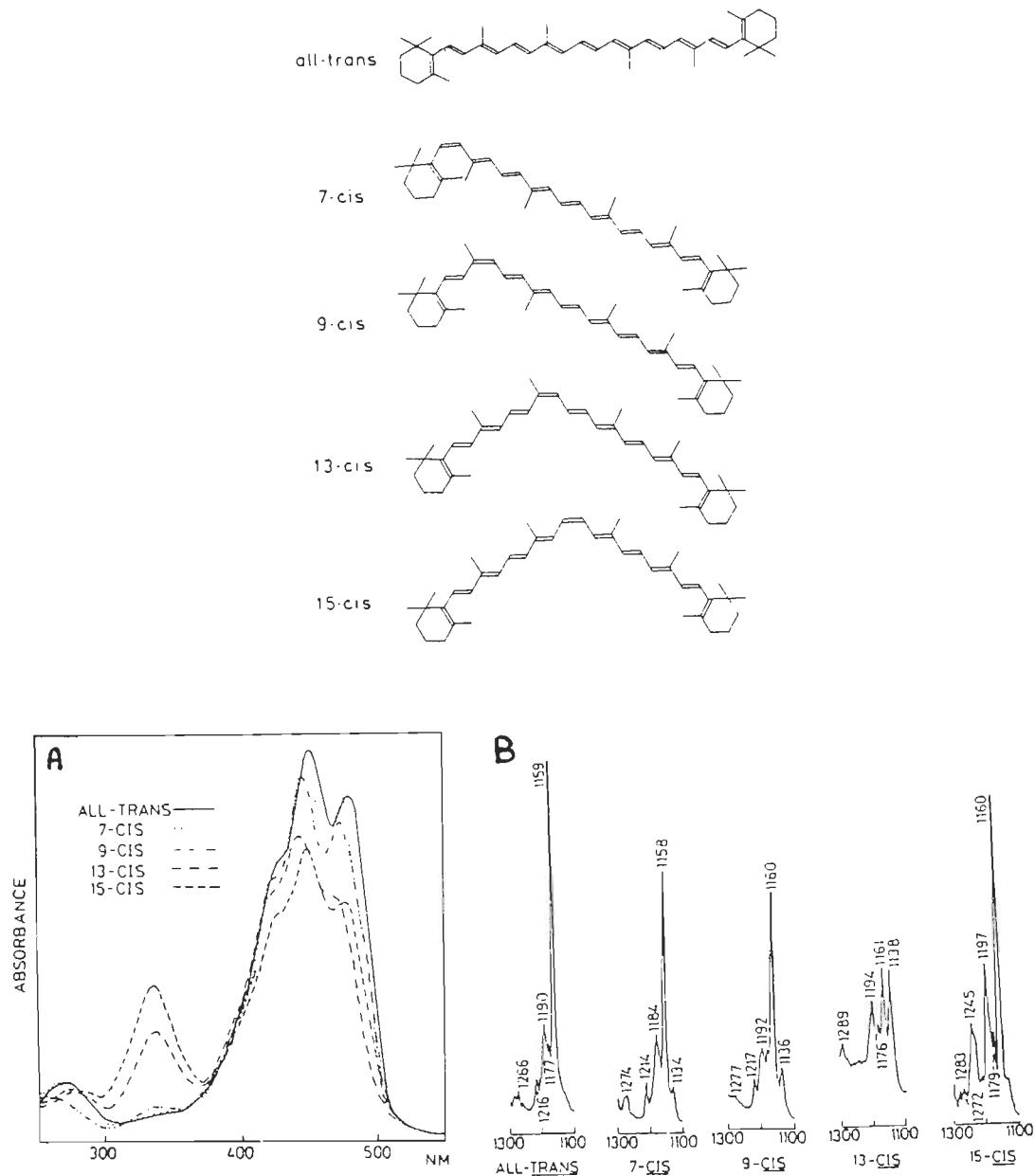
On se rend compte que tous les pigments contenus dans l'antenne mobile (LHC-II), se dégradent uniformément. Mais ce qui semble encore plus caractéristique, c'est que la **néoxanthine** et la **violaxanthine** se dégradent en engendrant une ou plusieurs formes de produits secondaires. Il est évident qu'aucune excitation photonique ne résulte en une séparation de charge au niveau du P-700, alors les pigments qui, en temps normal, distribuent leur énergie directement au centre réactionnel, sont restreints. Ces deux pigments, précisément dans ce complexe, auraient peut-être les mêmes fonctions qu'au niveau du PSI-30, soit en contact avec le P-700. La néoxanthine et la violaxanthine pourraient être, autant dans le LHC-II mobile qu'au cœur du complexe, la **terminaison du flux d'excitation**, suggérant ainsi un nombre précis de pigments pour protéger le P-700. Très récemment, ce type de résultat a été formulé par l'équipe de recherche du professeur Barber (de las Rivas et al. 1993): voulant qu'un couple de  $\beta$ -carotènes protègeraient le P-680 au niveau du PSII.

L'efficacité du transfert énergétique de façon générale (Car --> Chl), est très variable, quoique très rapide: de 3 ps  $\pm$  1 (Gillbro et al., 1988) et 3.8 ps (Shreve et al., 1991). Plusieurs points peuvent être émis pour expliquer cette variabilité: 1° la proximité (essentiellement des

liaisons de van der Waals) entre les caroténoïdes (donneurs) et les chlorophylles (accepteurs), 2° un bon chevauchement spectral entre l'émission du donneur et l'absorption de l'accepteur pour ainsi conserver l'énergie du processus de transfert et 3° une faible capacité de conversion interne ( $S_1 \rightarrow S_0$ ) chez les caroténoïdes (Cogdell et Frank, 1987; Frank et al., 1992).

Dans cette même optique, les dernières années ont été prolifiques dans l'élucidation de la spécificité hypothétique des caroténoïdes (photoprotection, absorption et transferts énergétiques) via leur emplacement dans le complexe membranaire. Les études ont porté principalement sur la conformation des pigments. Les caroténoïdes garderaient une conformation **tout-trans** dans les LHC, d'où l'association avec la fonction de collecteur de lumière (Iwata et al., 1985; Koyama et al., 1988; Koyama, 1990). Tandis que les caroténoïdes du complexe du centre réactionnel adopteraient une conformation **cis**, associée aux fonctions de photoprotection (Lutz et al., 1976, 1978; Cogdell et al., 1976; Agalidis et al., 1980).

Le  $\beta$ -carotène, par exemple, peut prendre plusieurs configurations d'isomères, qui peuvent être facilement détectées par spectroscopie d'absorption ou Raman (**figure 49**).



**FIGURE 49.** Configurations de différents isomères du  $\beta$ -carotène (en haut), Spectres d'absorption (A), et spectre Raman (B), de ces isomères dans une solution d'hexane (Koyama, 1990).

La forme tridimensionnelle **tout-trans** offre à ce type de pigment plusieurs fonctions complémentaires: capter, transférer et emmagasiner l'énergie. Cette configuration est avantagee pour ces fonctions, car elle a un coefficient d'extinction molaire plus élevé. Cet avantage se résume à l'absorption lumineuse et au transfert d'énergie singulet-singulet. De plus, l'état triplet tout-trans des caroténoïdes peut emmagasiner de l'énergie triplet, car il ne peut la dissiper efficacement. Cela pourrait expliquer la grande **versatilité fonctionnelle** du  $\beta$ -carotène, avec et sans l'antenne collectrice de lumière.

Plusieurs facteurs peuvent influencer l'absorption lumineuse des caroténoïdes, mais une d'entre elle attire notre attention compte tenu qu'il est possible, par ce fait de les particulariser. L'excitation directe par l'absorption d'un photon dans l'état singulet ( $S_1$ ) est interdite (transfert d'énergie limité) de par leur symétrie, mais est possible pour l'état  $S_2$  (Snyder, et al., 1985; Cosgrove et al., 1990; Katoh et al., 1990; Mimuro et al., 1991; Frank et al., 1993). Par contre Concernant les pigments dont le nombre de double liaison conjuguée ( $C=C$ ) de la chaîne d'électrons  $\Psi$  est en deça de 9, la transition énergétique est très peu efficace. Donc plus le nombre de ces liaisons est élevé, plus le transfert énergétique est efficace, soit de préférence, égale ou supérieure à 9 (Frank et al., 1992; Gillbro et al., 1993).

Les pigments que nous avons isolés ont tous **au moins 9 doubles liaisons conjuguées** (figure 10A). La **néoxanthine** et la **violaxanthine**, qui en ont tous deux 9, prouveraient le transfert énergétique (singulet-singulet) moyennement efficace comparativement aux autres pigments isolés. Ce qui corroborerait leur faible implication au niveau de l'absorption de la lumière. Par contre, la **lutéine**, qui a 10 doubles liaisons conjuguées, est davantage impliquée lors de ce processus (voir les tableaux 8, 9 et 10). Mais ce qui est d'autant plus intéressant, c'est que le  **$\beta$ -carotène**, que nos résultats démontrent comme faisant partie intégrante de la contribution à l'absorption lumineuse autant avec

antenne collectrice qu'en son absence, comporte 11 doubles liaisons conjuguées. Cette affirmation est renforcée par la constatation de la présence probable de **zéaxanthine** au sein du cœur de complexe du PSI (voir le tableau 10), et qui a également 11 doubles liaisons conjuguées. Il est donc très probable que la violaxanthine se pourvoit d'un tel mécanisme pour pallier sa faible versatilité, et d'autres pigments comme les lutéines qui produisent un époxyde qui pourrait bien remplir un rôle dualiste...

En résumé, il y a trois processus et mécanismes nécessaires au fonctionnement des caroténoïdes en étroite relation avec les chlorophylles. 1° **L'absorption lumineuse**; le point culminant est le déplacement dans le rouge des maxima d'absorption des composés, ce qui semble être un processus d'adaptation pour harmoniser le niveau et le transfert énergétique. 2° **Transfert énergétique**; il y a deux mécanismes proposés pour expliquer ce phénomène, mais que nous nous limiterons seulement à mentionner car les aspects dynamiques sont encore inconnus: l'interaction dipôle-dipôle (Förster, 1959), et l'interaction d'échanges électroniques (Dexter, 1953). 3° **La dissipation**; c'est le point dominant de l'aspect dynamique du transfert d'énergie triplet-triplet (T-T) dans le complexe du centre réactionnel. Le transfert T-T est connu pour survenir par un mécanisme d'échange d'électrons (Dexter, 1953), et ce processus est intimement relié à la formation d'une grande population d'état singulet.

En guise de conclusion partielle, nous pouvons affirmer que **chaque pigment a un rôle spécifique** en relation avec son **emplacement**. Donc, pour un même type holochromique (exemple:  $\beta$ -carotène), il est possible qu'il intervienne au début (antenne), comme intermédiaire ou encore à la fin (donneur au P-700) du flux énergétique.

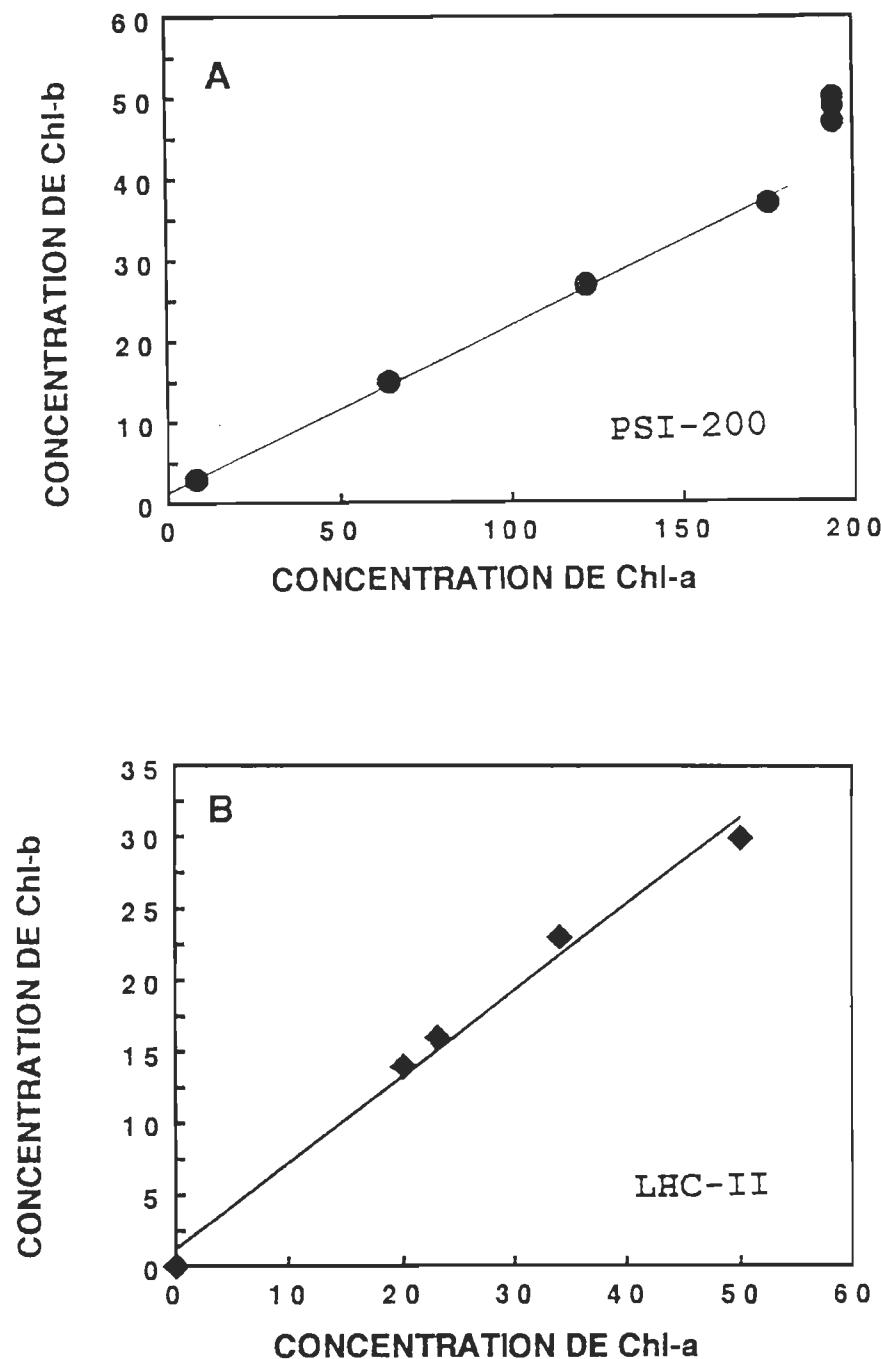
De plus, comme mentionné au début de ce chapitre, le flux d'excitons au sein du PSI, emprunte une voie très différente de celle utilisée dans le PSII. Pas seulement par le comportement de la

chlorophylle-a (voir la section 3.2), mais aussi par celui des caroténoïdes. Nous avons vu que les néoxanthines et violaxanthines jouent un rôle important au niveau du cœur du centre réactionnel du PSI; contrairement à cela, le centre réactionnel du PSII est dénudé de ces deux pigments (Dainese et al., 1992).

### **3.5.2 Interactions entre les pigments**

Nous avons peu discuté de l'interaction entre les pigments, puisqu'il est difficile de répertorier les liens qui existent entre deux pigments, dans un bassin où il en coexiste plusieurs. Par contre, nous pouvons avoir une idée de cela en visualisant sur graphique la dégradation d'un pigment (ou plus) en fonction d'un autre à des temps d'illumination identiques basés sur les valeurs du tableau 7.

Les deux pigments reconnus dans la littérature, comme étant intimement reliés, sont la Chl-a et -b. La **figure 50** nous donne un **aperçu** de la relation physique établie entre ces deux pigments ou de la participation similaire au flux photonique au sein des complexes de PSI-200 et de LHC-II. On remarque une très grande **corrélation fonctionnelle** chez les deux extraits, sauf au début de l'illumination chez le PSI-200, où la Chl-a est davantage résistante que la Chl-b.

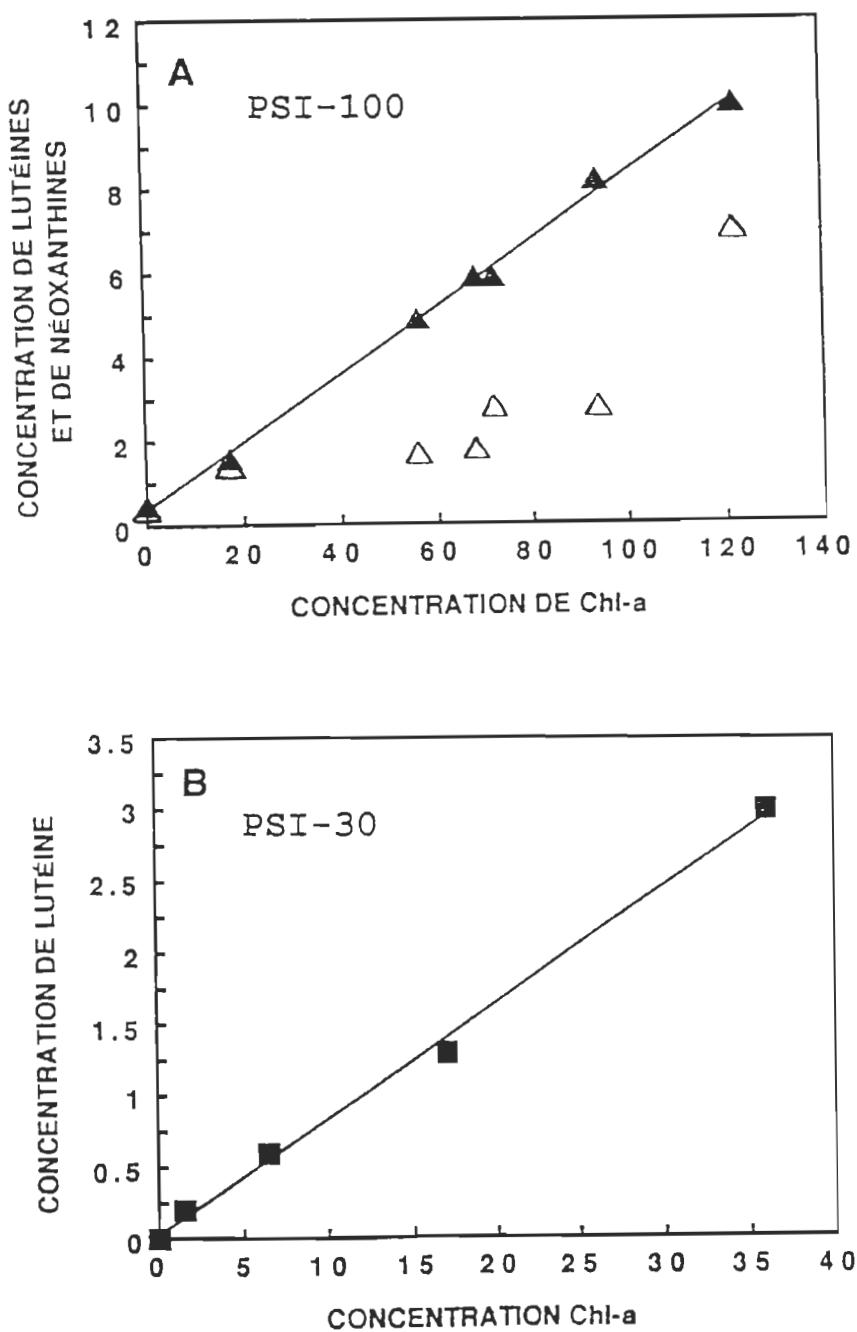


**FIGURE 50.** Corrélation fonctionnelle entre la chlorophylle-a et la chlorophylle-b en fonction de l'illumination chez les complexes A) de PSI-200 et B) de LHC-II.

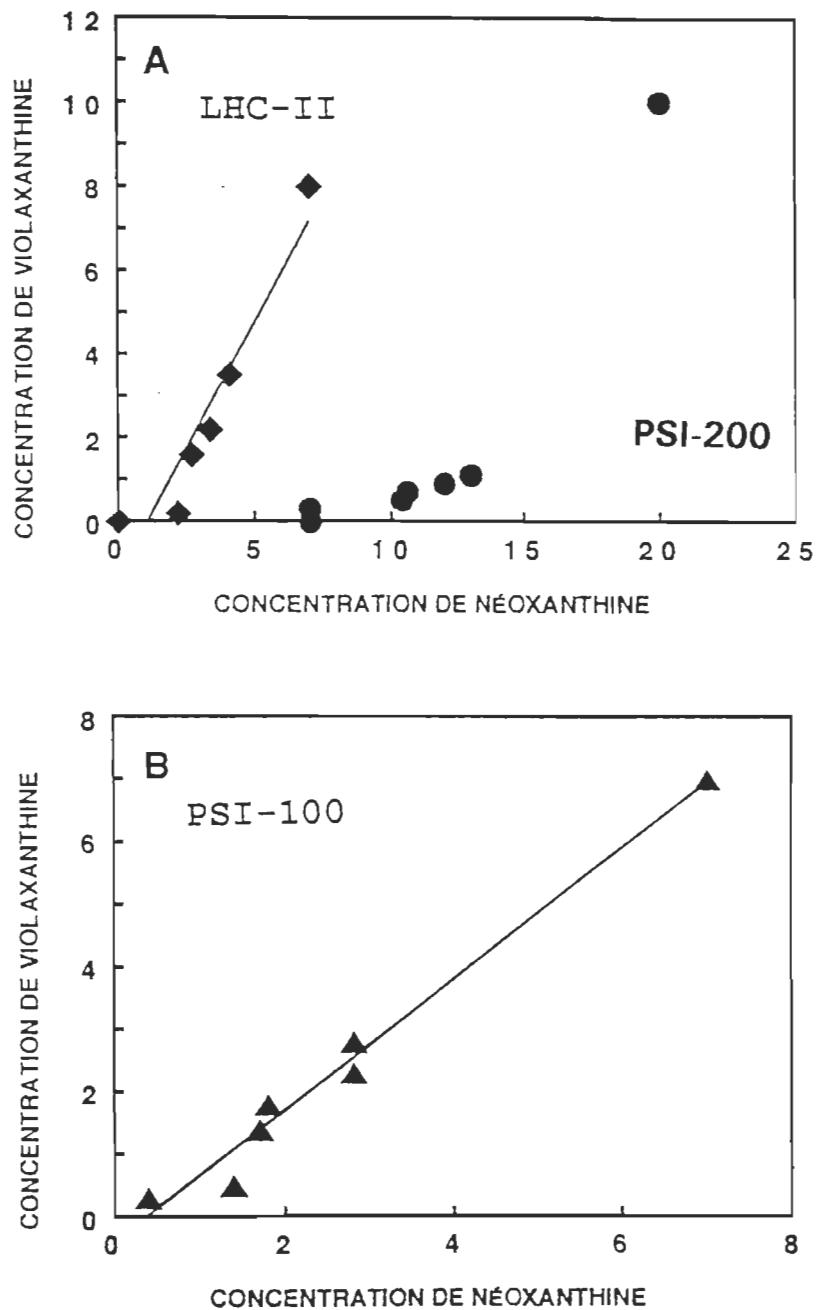
Ceci peut s'expliquer par la présence de deux **populations** de Chl-a, l'une au niveau de l'antenne et l'autre dans le centre réactionnel.

Ce qui nous intéresse particulièrement dans cette étude, c'est la relation entre les caroténoïdes et la Chl-a. Les caroténoïdes sont davantage impliqués lors des transferts énergétiques singulets et triplets. La **figure 51** nous montre la relation étroite entre la Chl-a et la **lutéine** chez les complexes de PSI-100 et PSI-30. La nature (physique) de ce dernier pigment corrobore les spéculations avancées antérieurement voulant qu'elle pourrait jouer le rôle "d'accepteur" de l'énergie triplet de la Chl-a, du complexe. Aucune réciprocité n'a été observée chez les complexes contenant l'antenne collectrice de lumière (PSI-200), en relation avec la Chl-a. La photodégradation des autres caroténoïdes ne présente pas une corrélation linéaire avec celles de la Chl-a (voir l'exemple pour la néoxanthine de la **figure 51A**).

Un dernier aspect reste à élucider: la possible relation entre la **néoxanthine** et la **violaxanthine**, compte tenu qu'elles sont toutes deux reliées au cœur du centre réactionnel, et qu'elles sont également résistantes aux fortes illuminations dans les mêmes extraits. Comme on pouvait s'y attendre, ces deux pigments sont fonctionnellement ou physiquement reliés entre eux. Cette affirmation est confirmée pour les particules de PSI-100 et les LHC-II (**figure 52**), et également pour les PSI-30, où ces pigments sont tous deux extrêmement résistants (résultats non-présentés). Une fois de plus, ce type de relation n'est pas imité chez les extraits du PSI-200 (**figure 52A**). Ceci expliquerait peut-être la dualité fonctionnelle de ces pigments ou encore que ce mode d'évaluation ne peut s'appliquer lorsqu'on est en présence de deux populations de pigments (antenne et centre réactionnel).



**FIGURE 51.** Corrélation fonctionnelle entre la Chl-a et la lutéine en fonction de l'illumination chez les complexes de A) PSI-100, lutéine ( $\blacktriangle$ ), néoxanthine ( $\Delta$ ) et B) de PSI-30.



**FIGURE 52.** Corrélation fonctionnelle entre la néoxanthine et la violaxanthine en fonction de l'illumination chez les complexes de A) LHC-II (◆), PSI-200 (●) et de B) PSI-100.

A la lumière de ce type de manipulation, il n'existerait aucune autre forme de corrélation aussi claire, entre les pigments.

### **3.6 ÉVALUATION DES COMPLEXES PIGMENTS/PROTÉINES EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE PAR LA SPECTROSCOPIE INFRAROUGE PAR TRANSFORMÉE DE FOURIER**

Pour faire suite aux observations de la section 3.3, sur la non-spécificité de la température par la photodégradation des pigments, nous allons scruter davantage cet aspect au niveau des protéines et leurs interactions avec les pigments. Le complexe de PSI-30 fera l'objet des présentes expériences et une brève incursion sur les effets de la lumière sera proposée à la fin.

#### **3.6.1 Introduction**

Nous avons déjà mentionné aux chapitres 1 et 2, que la principale difficulté lors de la prise de spectres infra-rouges comme présentés dans cette étude, est de préserver le maximum d'intégrité native des complexes extraits.

Le problème majeur réside dans le fait qu'il faut sécher l'échantillon de nombreuses heures (~ 40 h), à la température de la pièce (à l'obscurité), afin d'avoir un rapport protéine/eau le plus élevé possible. Cette contrainte est essentielle si on utilise des fenêtres de **BaF<sub>2</sub>** comme support (voir la section 1.4.1). Nous avons donc évalué l'intégrité de cette technique en comparant un contrôle avec un échantillon séché 40 h à la température de la pièce (à l'obscurité) dans un dessicateur. Quelques gouttes seulement sont déposées à la fois. Le fait que la solution d'extrait utilisée soit de faible concentration (10 µg Chl/ml, dans le but de comparer avec les expériences de la section 3.3), prolonge l'évaporation de l'eau (tampon).

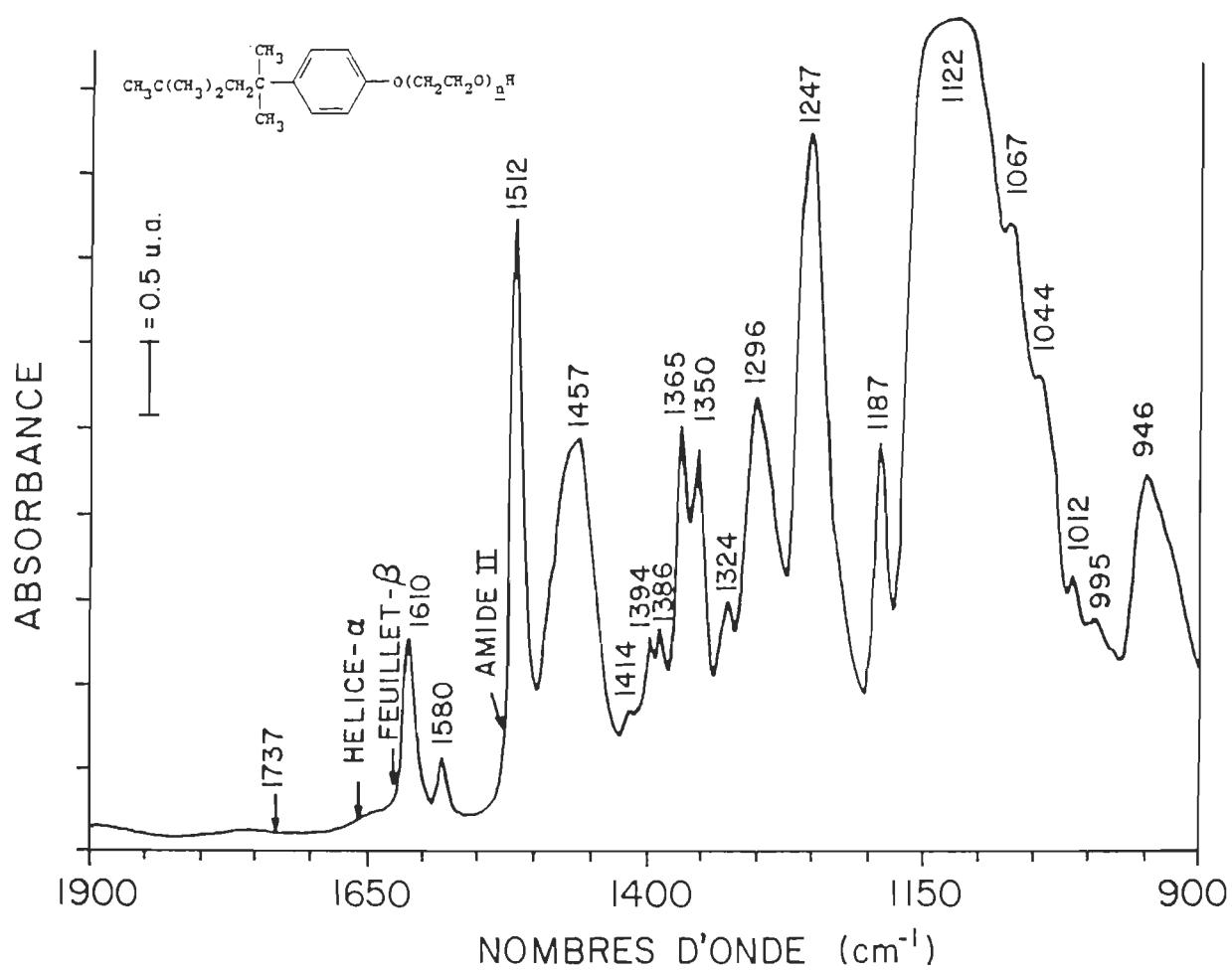
On constate aisément l'altération des membranes au niveau des protéines, pour le PSI-30 séché (figure 15). Si on concentre l'étude sur l'amide I (vibrations élastiques C=O), le pic à 1628 cm<sup>-1</sup>, représenté

par les feuilles  $\beta$ , est complètement nivellé par ce traitement. Il est possible de détecter la Chl à  $1737\text{ cm}^{-1}$  (Nabedryk et al., 1990b), mais compte tenu de la faible concentration des échantillons ( $10\text{ }\mu\text{g Chl/ml}$ ), sa dégradation n'est pas perceptible. Ce pic est également affecté par le séchage de l'échantillon. Ce résultat démontre que cette technique est mal adaptée aux types d'études que nous avons entrepris. Il est donc **inacceptable** d'utiliser ce mode d'évaluation des membranes biologiques, pour obtenir un aperçu de l'intégrité protéique.

Nous nous sommes donc tournés vers la technique de l'ATR (voir la section 2.9.3).

Le triton X-100 n'affecterait pas l'intégrité des membranes du photosystème I lors de son extraction (Tapie et al., 1984), mais peut tout de même se retrouver parmi les pics à l'étude. Quoique l'échantillon est lavé à plusieurs reprises (voir la section matériel et méthodes), nous avons effectué un spectre du détergent pour comparer les différents pics d'absorption (**figure 53**).

Pour la région qui nous intéresse, seul le pic à  $1610\text{ cm}^{-1}$  est près du feuillet  $\beta$ . Par contre, l'étude de l'amide II (vibrations de flexions NH) peut causer des problèmes, puisque l'important pic à  $1512\text{ cm}^{-1}$ , vibre très près de celle-ci. Cette bande peut facilement être confondue avec la tyrosine, qui est localisée environ à  $1515\text{ cm}^{-1}$  (He et al., 1991).



**FIGURE 53.** Spectre infrarouge par transformée de Fourier du triton X-100, et sa structure chimique (en mortaise).

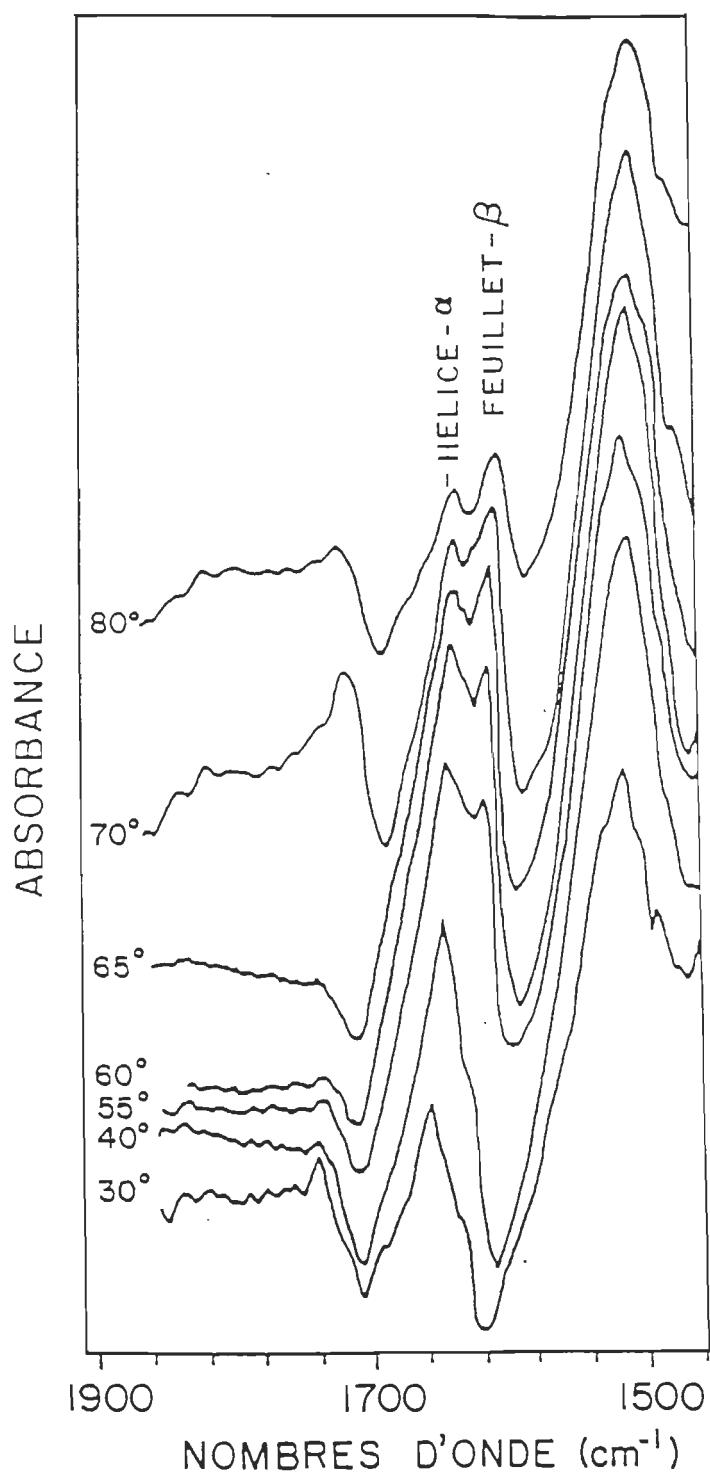
### **3.6.2. Changements conformationnels des protéines en fonction de la température**

Lors des traitements à la chaleur des complexes de PSI-30, les changements majeurs survenus, sont localisés principalement au niveau de l'amide I. Nous nous concentrerons donc sur les hélices  $\alpha$  ( $1658\text{ cm}^{-1}$ ) et les feuillets  $\beta$  ( $1628\text{ cm}^{-1}$ ).

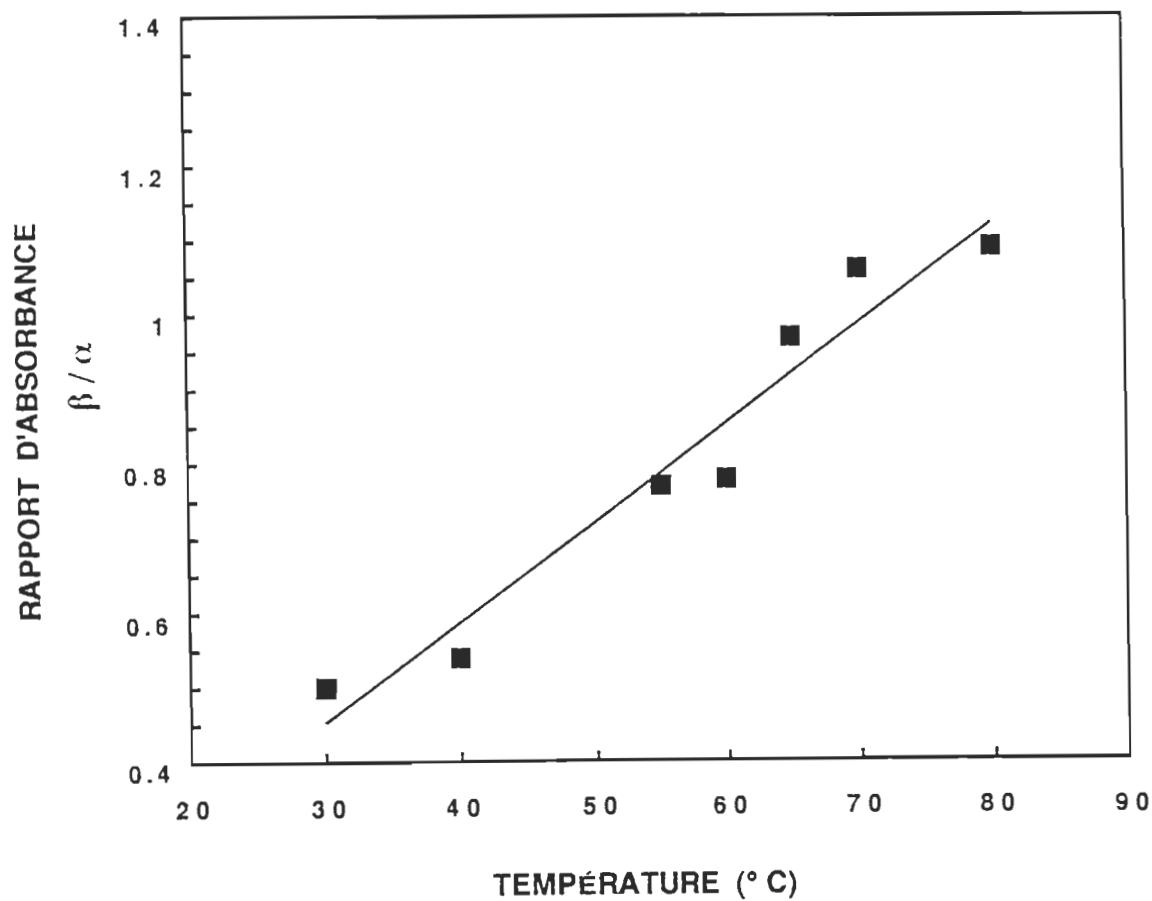
La **figure 54** montre le changement de conformation des deux structures de l'amide I. A  $30^\circ$  et à  $40^\circ\text{ C}$ , on note déjà une légère baisse du feuillet  $\beta$  (voir la figure 15A). Par contre à partir de  $55^\circ\text{ C}$ , la proportion des feuillets  $\beta$  s'accroît comparativement aux hélices  $\alpha$ . Ces changements conformationnels ont déjà été observés chez des extraits de PSII (He et al., 1991).

Il est très difficile de comparer deux pics qui varient probablement en même temps ( $1628\text{ cm}^{-1}$  et  $1658\text{ cm}^{-1}$ ), puisque la ligne de base et le début du pic (sa base) peuvent différer légèrement en fonction de la soustraction de l'eau. Donc, pour avoir une idée juste des modifications survenues à ces structures, nous les avons étudiées en établissant un **rapport** de pics. La **figure 55** montre l'augmentation du rapport des feuillets  $\beta$  sur les hélices  $\alpha$  ( $\beta/\alpha$ ). A ce stade ci, il est difficile d'évaluer quelles structures ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) sont réellement influencées par la température. Par contre, nous croyons que le traitement à la chaleur est non-spécifique à une structure précise, mais influence directement la conformation protéique. L'analyse conformationnelle des membranes thylacoïdiennes révèle qu'il y aurait  $56 \pm 4\%$  d'hélice  $\alpha$  et seulement  $44 \pm 7\%$  dans les LHC (Nabedryk et al., 1984). Cela suggère que les "quantités" de structures secondaires (protéiques) distribuées dans les membranes, pourraient être reliées aux fonctions respectives des différents complexes.

Ce constat suggère peut-être une interaction distincte entre l'une des ces structures secondaires et un ou plusieurs pigments.



**FIGURE 54.** Spectres infrarouges par transformée de Fourier des complexes de PSI-30 en fonction de la température.



**FIGURE 55.** Rapport de l'absorbance des feuillets  $\beta$  sur les hélices  $\alpha$  ( $\beta/\alpha$ ) en fonction de la température, pour les complexes de PSI-30, révélé par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier. (Erreur maximale:  $\pm 0.08$ ).

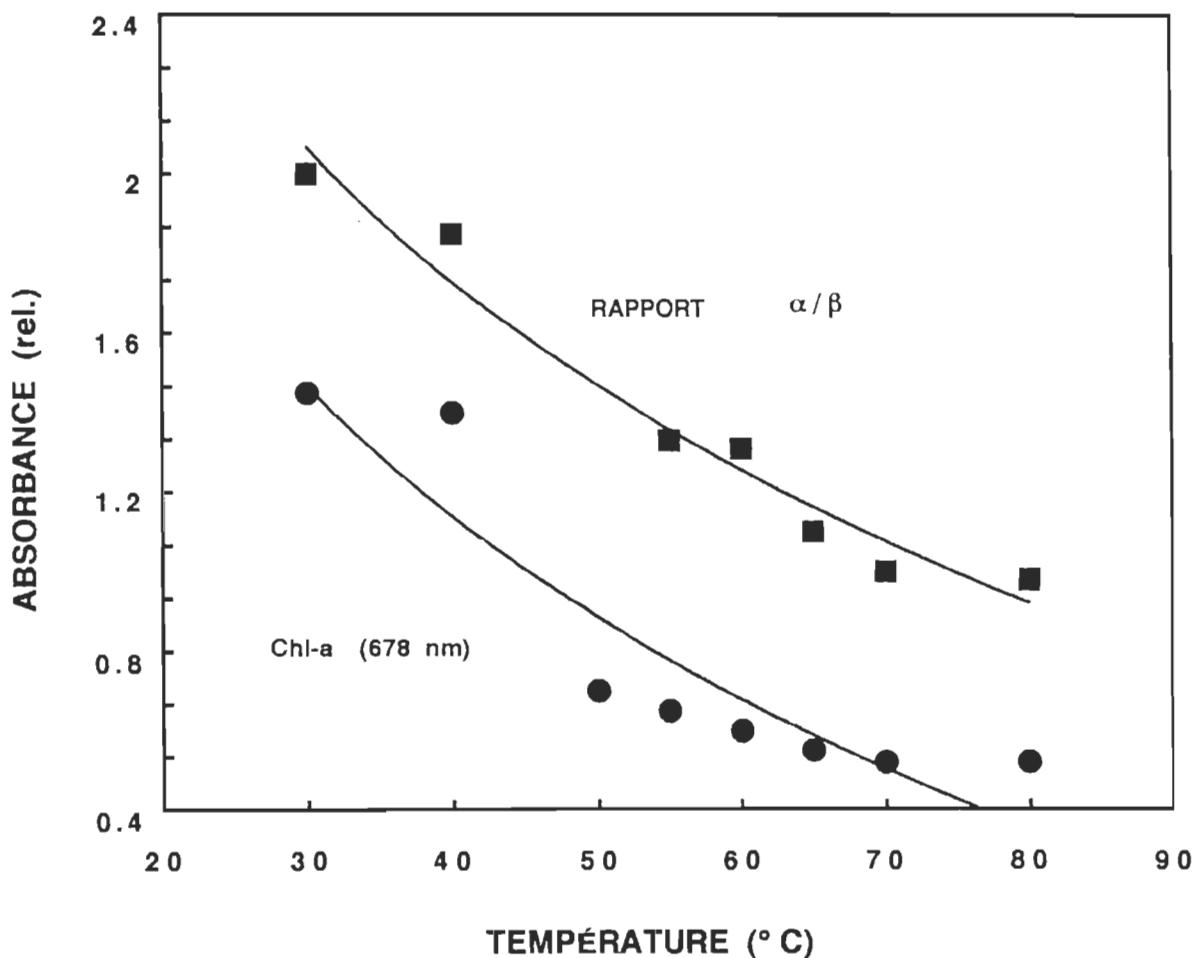
### **3.6.3 Interaction entre les structures secondaires des protéines et la Chlorophylle-a.**

La Chl-a, qui compte pour près des trois quarts de la concentration pigmentaire du PSI-30, fera l'objet de cette première investigation.

La figure 56 nous renseigne sur l'étroite relation qui existe entre la Chl-a et l'augmentation relative des feuillets  $\beta$  d'une ou plusieurs protéines du complexe, lors du traitement aux températures élevées. Pour les besoins de la cause, le rapport feuillet  $\beta$ /hélices  $\alpha$  a été inversé ( $\alpha/\beta$ ) pour suivre la **dégradation** de la Chl-a.

La Chl-a pourrait être liée aux hélices  $\alpha$ , compte tenu que leur diminution (dégradation) **relative** suit un schéma similaire. D'un autre côté, ce pigment pourrait également être associé aux feuillets  $\beta$ , afin de **protéger** la Chl-a des interactions physiques dues aux température élevées.

Des recherches plus en profondeur sur le sujet, dans le cadre d'une autre étude, pourrait être entreprises afin d'élucider les mécanismes lancés dans cette section. Connaissant le caractère versatile des caroténoïdes au point de vue fonctionnel, il est très probable qu'elles puissent être reliées, et donc fluctuer au même rythme que les structures secondaires des protéines... Dans cette même lancée, il a été mentionné que les lutéines seraient liées aux hélices  $\alpha$  chez les bactéries photosynthétiques (Mimuro et Katoh, 1991). Il reste donc encore beaucoup à faire pour bien saisir les interactions des protéines et des pigments suite aux fluctuations de leur environnement.



**FIGURE 56.** Comparaison entre les fluctuations des structures secondaires des protéines (■) et la dégradation des Chl-a (●) du complexe de PSI-30. Les valeurs pour la Chl-a ont été tirées de la figure 33. Un facteur d'équivalence, entre ces deux données a été calculé à 4° C.

### **3.6.4 Influence de la lumière sur les structures secondaires des protéines**

Comme la dernière section le révèle, la température influence de façon non-sélective les pigments mais désorganise les protéines qui y sont liées. La question qu'on est en droit de se poser, concerne l'influence que pourrait avoir la lumière sur les structures secondaires des protéines.

L'expérience puisée du rapport des feuillets  $\beta$  sur les hélices  $\alpha$  en fonction du temps d'illumination, ne révèle aucune prépondérance dans le cas du complexe de PSI-30 (tableau 12).

**TABLEAU 12.** Rapport de l'absorbance des feuillets  $\beta$  sur les hélices  $\alpha$  ( $\beta/\alpha$ ) en fonction du temps d'illumination des complexes de PSI-30, révélé par la spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier.

TEMPS D'ILLUMINATION (minutes)	RAPPORT $\beta/\alpha$ ( $\pm 0.05$ )
0	0.60
5	0.61
10	0.71
30	0.67

Ces données corroborent l'idée que la lumière est véhiculée par les pigments dont l'influence ne concerne que ses intermédiaires. De la même façon, la chaleur dénature les complexes photosynthétiques en premier lieu, par l'intermédiaire des protéines.

Il est à noter que par cette méthode, il est très difficile de quantifier les structures secondaires (hélices  $\alpha$  et feuillets  $\beta$ ) en fonction d'un traitement aux températures élevées. Donc, le rapport  $\beta/\alpha$  n'est calculé que dans le but de le comparer avec le comportement en fonction des températures élevées. Ce qui nous permet de visualiser de façon grossière la réaction de ces structures.

## CHAPITRE IV

### CONCLUSION

A la lumière des résultats présentés dans cette étude, il est possible de tirer certaines conclusions et d'émettre certaines hypothèses.

Dans un premier temps, les extractions sélectives (diminution de l'antenne pigmentaire) ont permis, sans altérer la composition et l'intégrité fonctionnelle des complexes protéiques, d'étudier le comportement et la localisation des pigments au sein du photosystème I.

Dans un second temps, les traitements de dégradation sublétale (fortes illuminations et températures élevées), se sont avérés bien adaptés et reproductibles, dans le but de "suivre" l'altération sélective (lumière) ou non-sélective (température) des pigments. A cet égard, l'illumination prolongée est une technique nous permettant de saisir avec une plus grande exactitude les contraintes et les systèmes palliatifs. Ces deux premiers points cadrent bien avec les objectifs préalablement lancés à la section 1.3.

Une première constatation émerge des résultats: suite aux fortes illuminations les pigments se **dégradent à des vitesses variables** (chlorophylles et caroténoïdes). Cet élément constitue la pierre angulaire et le point de départ des expériences visant une meilleure compréhension des mécanismes régissant le flux énergétique à travers l'antenne collectrice de lumière et le complexe du centre réactionnel, de la périphérie jusqu'au P-700.

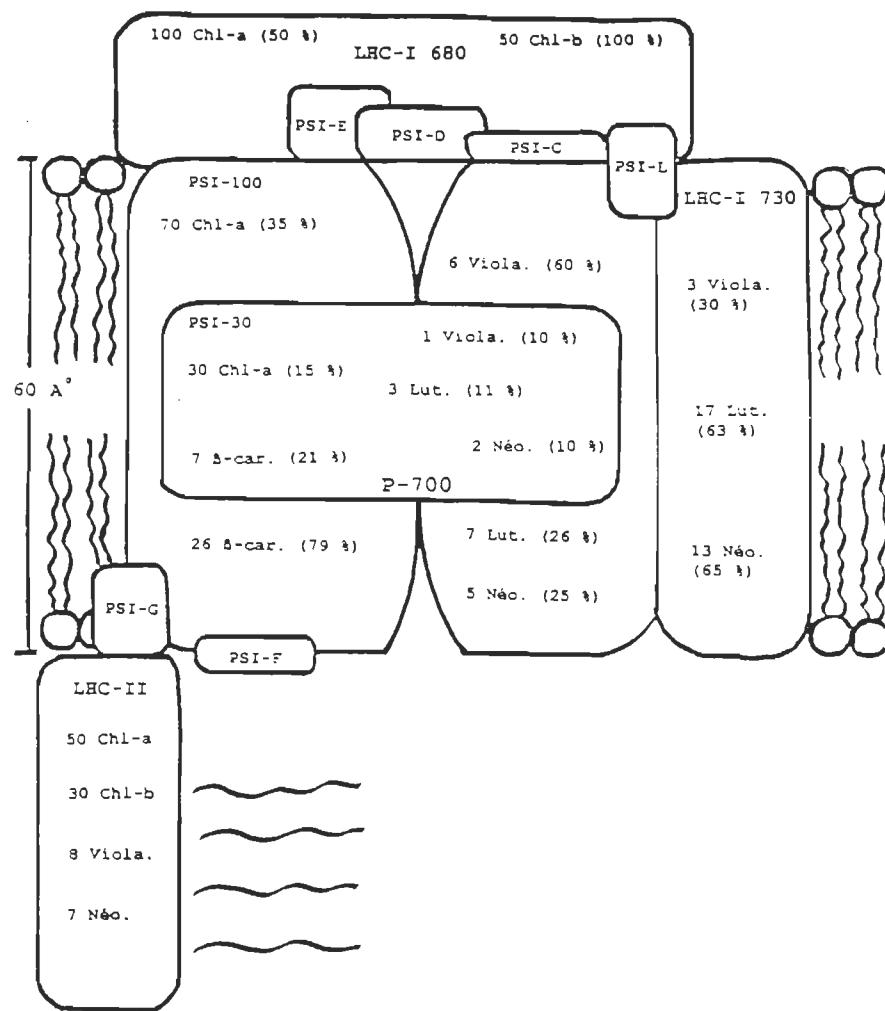
Se basant sur les spectres d'absorption des différents extraits membranaires, nous avons constaté la présence d'une **forme de**

chlorophylle-a absorbant à des longueurs d'onde élevées (environ 705 nm), que nous avons localisée au sein de l'antenne collectrice de lumière du PSI (LHC-I). Cet holochrome est aussi présent chez le LHC-II mobile. La chlorophylle C705 a donc été décelée par le déplacement (vers le bleu) de la bande d'absorption de la Chl-a (dans le rouge) et caractérisée plus en détail par les spectres de différence. Cette forme de chlorophylle pourrait participer à la **photoprotection** d'autres formes de pigments, sachant qu'elle se photodégrade très rapidement (voir la section 3.1).

L'étude du transfert d'électrons par la réduction du P-700, nous a permis de vérifier l'activité photosynthétique, donc l'intégrité fonctionnelle des différents complexes extraits. Par le biais de ces résultats, nous sommes en mesure de confronter le modèle du flux énergétique au niveau du PSII émis par l'équipe de Bassi et Dainese (1989). Ce modèle suggère un transfert énergétique directionnel, en ce sens que le centre réactionnel (P-680) est le but ultime d'arrivée des excitons, en passant par les différents transporteurs pigmentaires. Au niveau du PSI, il semble que les excitons sont redistribués aux pigments du complexe dans le cas où le P-700 est engorgé, et cela de façon indépendante de la taille de l'antenne. Ceci confirme l'hypothèse d'Owens et ses collaborateurs, sur la distribution aléatoire des excitons au sein du PSI (Werst et al., 1992). Cette affirmation se doit d'être nuancée car nous savons que les pigments, et cela à tous les niveaux d'extraction, sont affectés différemment suite à l'absorption lumineuse. Ce qui suggère que la protection du PSI face aux fortes illuminations, est dépendante de la distribution sélective des photons à travers la garniture pigmentaire, et donc permet une visite non-excessive au P-700. De plus, le centre réactionnel surexcité, peut redistribuer son énergie en aval, afin de lui permettre de conserver ses capacités de séparation de charge (voir la section 3.2). Ces dernières affirmations concordent bien avec les hypothèses formulées antérieurement.

Les expériences de chromatographie liquide à haute performance (CLHP) nous ont permis de localiser avec une plus grande précision les différents pigments photosynthétiques (chlorophylles et caroténoïdes) des complexes de PSI (figure 57). Cette étude vient compléter le tableau brossé par Bassi et Simpson (1987) qui se limitait à l'emplacement des chlorophylles (voir la section 1.1.2). De plus, la position et la concentration relative des caroténoïdes, a été attribuée pour la première fois aux différentes tailles d'antennes du complexe du PSI. Sans inventorier chaque pigment de chaque complexe, nous pouvons faire ressortir les caractéristiques originales et les différents points saillants qui nous serviront à mieux comprendre le flux énergétique, et les moyens de photoprotection qu'utilise le PSI: il est à noter que le  $\beta$ -carotène est absent des antennes collectrices de lumière, par contre cette lacune est bien compensée par l'abondance des xanthophylles, notamment la lutéine (63 %) et la néoxanthine (65 %). Ce même pigment ( $\beta$ -carotène) est présent en grande quantité en périphérie du complexe du centre réactionnel (79 %), remédiant ainsi à l'absorption photonique lorsque l'antenne est absente (ou surexcitée, voir la section 3.5).

La distribution précise des différents pigments nous permet d'avoir une approche plus globale du flux énergétique et de la photoprotection que les complexes mettent en branle pour pallier à la surexcitation.



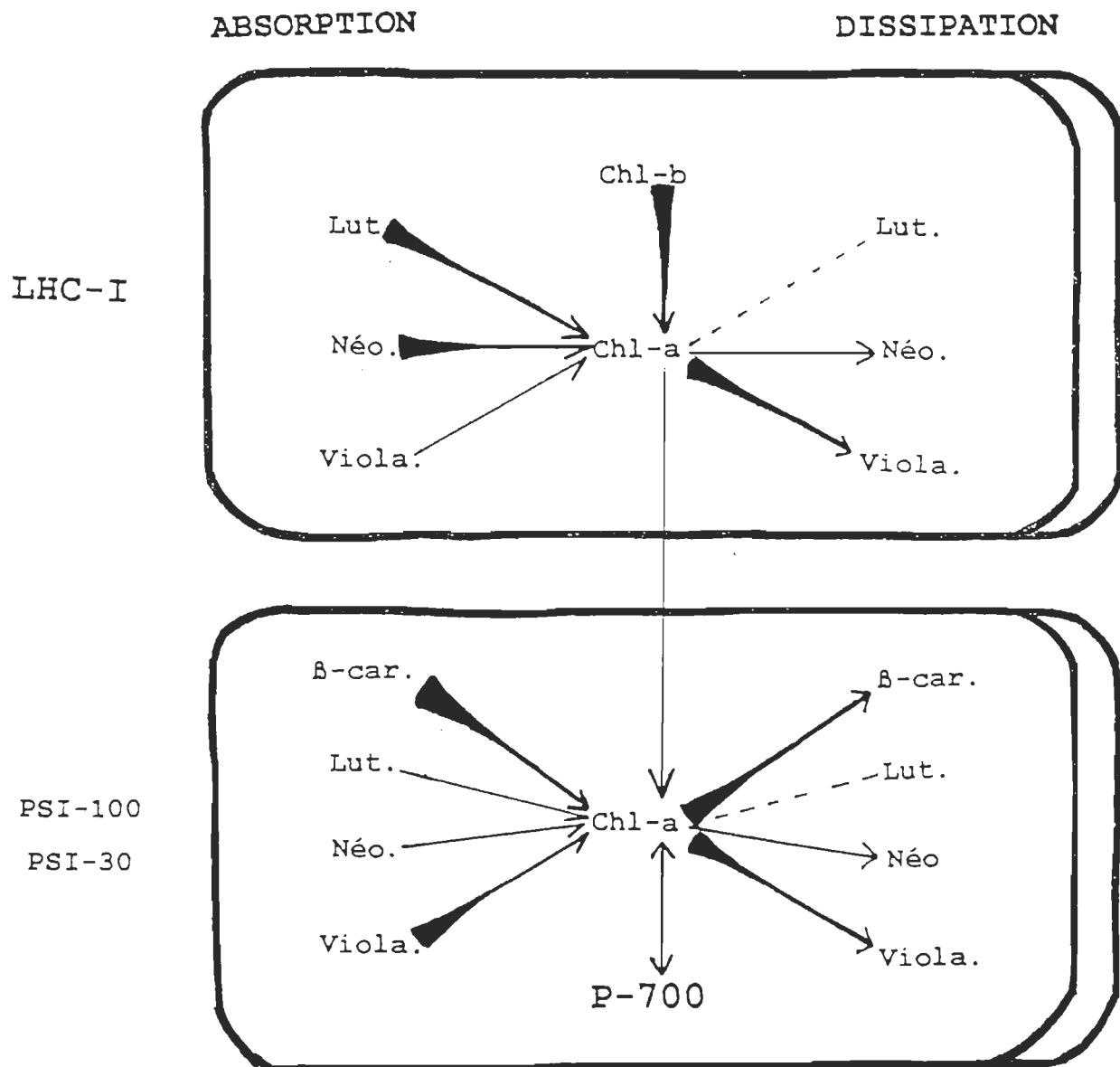
**FIGURE 57.** Localisation et proportion relative des pigments au sein des complexes de PSI-200, PSI-100, PSI-30 et de LHC-II. Les rapports en pourcentage de chaque pigment en fonction de son emplacement tridimensionnel sont indiqués entre parenthèses. La localisation des polypeptides est basée sur la littérature (Scheller et Moller, 1990). La distinction des deux antennes collectrices de lumière du PSI (LHC-I 680 et 730) est sous forme d'organigramme schématique, sachant que le PSI-200 contient les deux sous-unités et que le PSI-100 en est dénué. Il en va de même pour le LHC-II dont l'emplacement est relative.

Le **PSI-200** (contenant le LHC-I) réagit de façon particulière dans le cas d'un excès de photons. Au niveau de l'antenne, l'absorption lumineuse est assurée par les chlorophylles mais également par les xanthophylles (principalement les lutéines et les néoxanthines), pour ainsi retransmettre les excitons aux Chl-a (transferts singulet-singulet), dans une large proportion. Par contre, au niveau du complexe du centre réactionnel, le  $\beta$ -carotène et la violaxanthine prennent rapidement le contrôle de l'absorption (avec la Chl-a) compte tenu que les autres caroténoïdes sont minoritaires (**figure 58**).

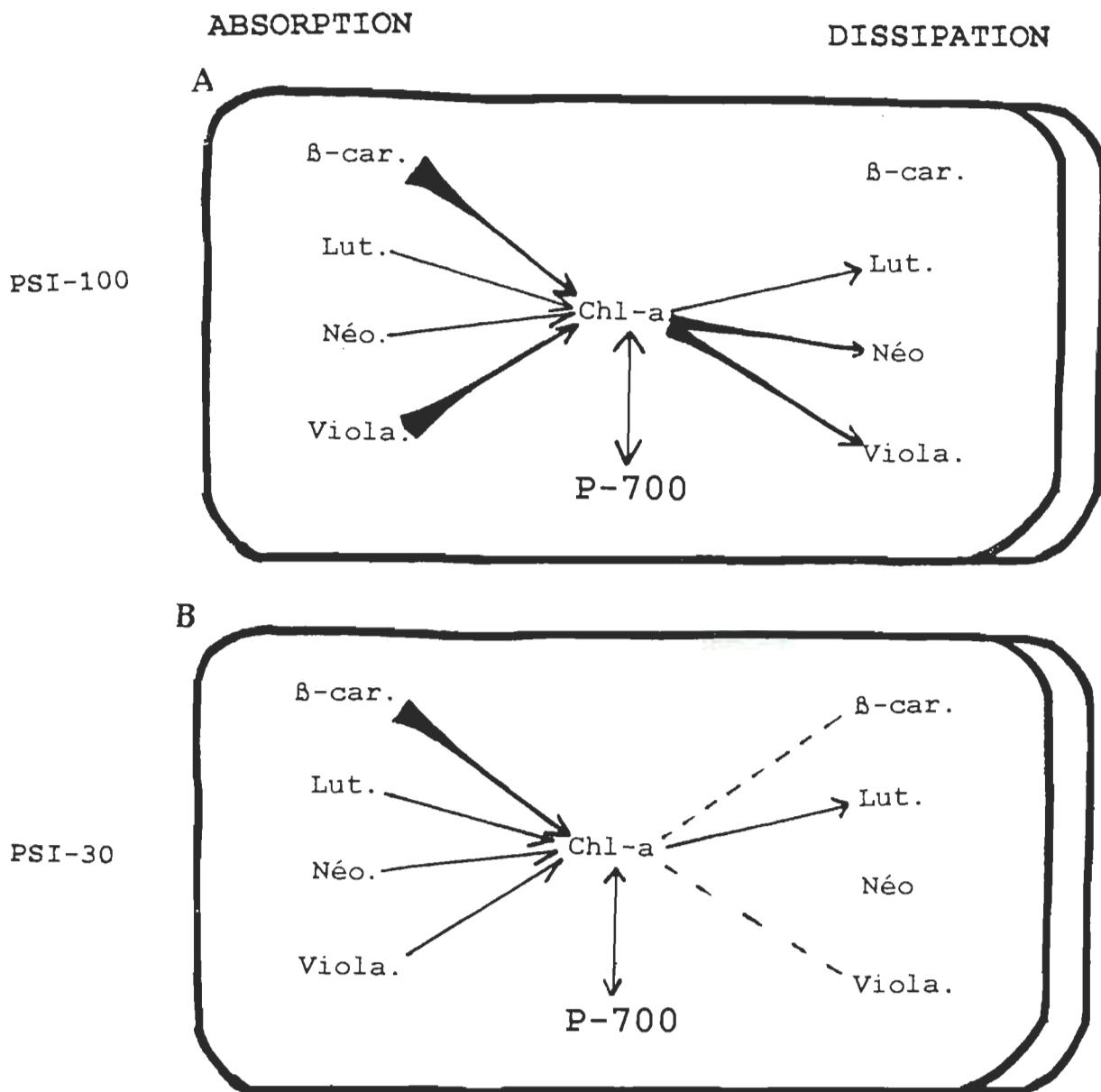
Dans ce cadre-ci (PSI-200), la dissipation énergétique (transferts triplet-triplet) est assurée principalement par le  $\beta$ -carotène et de façon moins importante, par la violaxanthine. La néoxanthine et principalement la lutéine sont très résistantes aux fortes illuminations: ils ne participent donc que très peu à la dissipation énergétique. La  $\beta$ -carotène et la violaxanthine pourraient protéger la Chl-a lors de surexcitations (**figure 58**).

En absence de LHC-I (ou lorsqu'il est sursaturé en photons), le flux énergétique (du **PSI-100**) prend une toute autre allure. La principale caractéristique de ce complexe réside dans le fait que le  $\beta$ -carotène, qui est en quantité appréciable, ne participe nullement à la dissipation énergétique (**figure 59A**). Cette constatation met en doute la fonction de photoprotecteur du  $\beta$ -carotène véhiculée dans la littérature (Lichtenthaler 1987). Ce modèle suggéré par la figure 59A confirme l'ordre d'efficacité de la transition énergétique chez les caroténoïdes en fonction du nombre de double liaisons conjuguées (voir la section 3.5.1.2):

**$\beta$ -carotène > lutéine > néoxanthine  
violaxanthine**



**FIGURE 58.** Modèle suggéré identifiant les transferts énergétiques dans le PSI natif (PSI-200). La largeur des flèches est fonction de la quantité de pigments impliqués ou de l'efficacité relative des transferts d'énergie.



**FIGURE 59.** Modèle suggéré identifiant les transferts énergétiques dans le PSI, dont l'antenne est réduite à A) 100 Chl-a/P-700 (PSI-100) et à B) 30 Chl-a/P-700 (PSI-30). La largeur des flèches est fonction de la quantité de pigments impliqués ou de l'efficacité des transferts d'énergie.

L'étude du flux énergétique au sein du **PSI-30** est plus délicate à interpréter puisque le nombre de pigments a grandement diminué. La **figure 59B** nous donne tout de même une idée de l'absorption et de la dissipation de l'énergie.

Pour terminer, nous pouvons considérer les **températures élevées** comme un mode de dégradation non-spécifique. En ce sens, les altérations provoquées sont désordonnées et aléatoires (voir la section 3.3). De plus, les changements de conformations (quoique difficilement quantifiables) des protéines du complexe PSI-30, en présence de températures élevées, en comparaison avec le traitement à de fortes illuminations (tableau 12), suggèrent une variation des hélices  $\alpha$  et des feuillets  $\beta$  (voir la section 3.6). Outre cela, il existerait une relation entre la dégradation des Chl-a et ces changements conformationnels.

En scrutant davantage les rôles et fonctions des différents pigments qui constitue le PSI, cela non seulement nous renseigne sur les **implications photosynthétiques** de ceux-ci, mais pourrait par ailleurs nous fournir un bon indice de la dégradation infligée aux plantes.

**"SCIENCE IS SPECTRUM ANALYSIS,**

**ART IS PHOTOSYNTHESIS"**

**(KARL KLAUSS 1874-1936)**

## BIBLIOGRAPHIE

- Agalidis, I., Lutz, M., et Reiss-Husson, F. Binding of carotenoids on reaction centers from *Rhodopseudomonas sphaeroides* R 26. Biochim. Biophys. Acta. 1980, 589, 264-274.
- Al-Khatib, K., et Weist, S.C. Solution effects on the thermostability of bean chloroplast thylakoids. Crop Sci. 1990a, 30, 90-96.
- Al-Khatib, K., et Weist, S.C. Heat-induced reversible and irreversible alterations in the structure of *Phaseolus vulgaris* thylakoid proteins. J. Therm. Biol. 1990b, 15, 239-244.
- Allen, J.F., Bennet, K.E., Steinback, et Arntzen C.J. Chloroplast protein phosphorylation couples plastoquinone redox state to distribution of exitation energy between photosystems. Nature 1981, 291, 25-29.
- Allen, J.F. Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. Biochim. Biophys. Acta. 1992a, 1098, 275-335.
- Allen, J.F. How does protein photophorylation regulate photosynthesis ? Trends Biochem. Sci. 1992b, 17, 12-17.
- Almeda, L.; Fernandez-Lopez, J.A., et Lopez-Roca, J.M. High-performance liquid chromatography-diode-array detection of photosynthetic pigments. J. chromatogr 1992, 607, 215-219.

- Alvarez, J., Haris, P.I., Lee, D.C., et Chapman, D. Conformational changes in concanavalin A associated with demetallization and a-methylmannose binding. Biochim. Biophys. Acta. 1987, 916, 5-12.
- Anandan, S., Vainstein, A., et Thornber, J.P. Correlation of some published aminoacid sequences for photosystem I polypeptides to a 17 kDa LHC I pigment-protein and to subunit 3 and 4 of the core complex. FEBS Lett. 1989, 256, 150-154.
- Andersen, B., Koch, B., Scheller, H.V., Okkels, J.S., et Moller, B.L. Nearest neighbour analysis of the photosystem I subunits in barley and their binding of ferredoxin. Proc. VIIth Internat. Congr. Photosynth. (Baltscheffsky M. ed.) 1990, II, 671-674.
- Andersen, B., Koch, B., et Scheller, H.V. Structural and functional analysis of the reducing side of photosystem I. Physiol. Plant. 1992a, 84, 154-161.
- Andersen, B., Scheller, H.V., et Moller, B.L. The PSI-E subunit of photosystem I binds ferredoxin: NADP<sup>+</sup> oxidireductase. FEBS Lett. 1992b 311, 169-173.
- Anderson, I.C., et Robertson, D.S. Role of carotenoids in protecting chlorophylls from photodestruction. Plant Physiol. 1960, 35, 531-534.

Anderson, J.M. P-700 content and polypeptide profile of chlorophyll-protein complexes of spinach and barley thylakoids. Biochim. Biophys. Acta. 1980, 591, 113-126.

Anderson, J.M., et Andersson, B. Structure and molecular organization of the photosynthetic apparatus. Photosynthesis (G. Akyunoglou, ed.) 1981, III, 23-31.

Andersson, B., et Haehnel, W. Location of photosystem I and photosystem II reaction centers in different thylakoid regions of stacked chloroplasts. FEBS Letters 1982, 146, 13-17.

Andreasson, E., Svenson, P., Weibull, C., et Albertsson, P.-A. Separation and characterization of stroma and grana membranes-evidence for heterogeneity in antenna size of both photosystem I and photosystem II. Biochim. Biophys. Acta. 1988, 936, 339-350.

Andreasson, E., et Albertsson, P.-A. Heterogeneity in photosystem I - the larger antenna of photosystem I\* is due to functional connection to a special pool of LHCII. Biochim. Biophys. Acta. 1993, 1141, 175-182.

Argyroudi-Akoyunoglou, J. Correlation between the "low"-salt-induced increase in the F730/F685 fluorescence emission ratio at 77 K in isolated chloroplasts, and the organization of chlorophyll in photosystem I pigment-protein complexes of thylakoids. Arch. Biochem. Biophys. 1991, 286, 524-532.

- Armond, P.A., Bjorkman, O., et Staehelin, L.A.  
Dissociation of supramolecular complexes in chloroplast membranes: a manifestation of heat damage to the photosynthetic apparatus. Carn. Inst. Wash. Yrbk 1979, 78, 153-157.
- Arnon, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts.  
Polyphenoloxidase in *Bata vulgaris*. Plant Physiol. 1949, 24, 1-15.
- Arnon, D.I. The discovery of ferredoxin: the photosynthetic path. Trends Biochem. Sci. 1988, 13, 30-33.
- Aronoff, S., et Mackinney, G. The photo-oxidation of chlorophyll. J. Am. Chem. Soc. 1943, 65, 956-958.
- Asada, K., et Takahashi, M. Protection and scavenging of active oxygen in photosynthesis: Photoinhibition. (Kyle, D.J., Osmond, C.B., Arntzen, C.J. eds) 1987, 227-287.
- Asada, K., Heber, U., et Schreiber, U. Pool size of electrons that can be donated to  $P700^+$ , as determined in intact leaves: donation to  $P700^+$  from stromal components via the intersystem chain. Plant Cell Physiol. 1992, 33, 927-932.
- Asada, K., Heber, U., et Schreiber, U. Electron flow to the intersystem chain from stromal components and cyclic electron flow in maize chloroplasts, as detected in intact leaves by monitoring redox change of  $P700$  and chlorophyll fluorescence. Plant Cell Physiol., 1993, 34, 39-50.

Astashkin, A.V., Dikanov, S.A., et Tsvetkov, Y.D. The structure of the primary electron donors P865 and P700 of bacterial and plant photosynthesis based on magnetic resonance data. Chem. Phys. Lett. 1988, 152, 258-264.

Barr, R., Pan, R.-S., Crane, F.L., Brightman, A.O., et Morré, D.J. Destruction of vitamin K<sub>1</sub> of cultured carrot cells by ultraviolet radiation and its effect on plasma membrane electron transport reactions. Biochemistry Internation. 1992, 27, 449-456.

Bassi, R., et Dainese, P. The role of light harvesting complex II and the minor chlorophyll a/b proteins in the organization of the photosystem II antenna system. Prog. Photosynth. Res. 1989, 2, 209-216.

Bassi, R., et Simpson, D.J. Chlorophyll-proteins of barley photosystem I. Eur. J. Biochem. 1987, 163, 221-230.

Bengis, C., et Nelson, N. Purification and properties of photosystem I reaction center from chloroplasts. J. Biol. Chem. 1975, 250, 2783-2788.

Bengis, C., et Nelson, N. Subunit structure of chloroplast photosystem I reaction center. J. Biol. Chem. 1977, 252, 4564-4569.

Bilger, W., Björkman, O., et Thayer, S.S. Light-induced spectral absorbance changes in relation to photosynthesis and the epoxidation state of xanthophyll cycle components in cotton leaves. Plant Physiol. 1989, 91, 542-551.

Bilger, W., et Björkman, O. Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. Photosynth. Res. 1990, 25, 173-185.

Bilger, W., et Schreiber, U. Chlorophyll luminescence as an indicator of stress-induced damage to the photosynthetic apparatus. Effects of heat-stress in isolated chloroplasts. Photosynth. Res. 1990, 25, 161-171.

Björkman, O. Responses to different quantum flux densities. Encyc. Plant Physiol. (ed. Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B. and Zeigler, H.) 1981, 12A, 57-107.

Blankenship, R.E. Origin and early evolution of photosynthesis. Photosynth. Res. 1992, 33, 91-111.

Boardman, N.K. Comparative photosynthesis of sun and shade plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 1977, 28, 355-377.

Boardman, N.K., et Anderson, J.M. Composition, structure and photochemical activity of developing and mature chloroplasts. Chloroplast Development (Edited by G. Akoyunoglou and J.H. Argyroudi-Akyunouglo) 1978, 1-14.

Bohner, H. et Boger, P. Reciprocal formations of cytochrome c-553 and plastocyanin in *Scenedesmus*. FEBS Letters 1978, 85, 337-339.

Bolliger, H.R., et König, A. Vitamins, including carotenoids, chlorophylls and biological active quinones. Thin-layer chromatography. A laboratory handbook. (Spinger-Verlag Ed. E. Stahl) 1969, 259-308.

Bonnerjea, J., et Evans, M.C.W. Identification of multiple components in the intermediary electron carrier complex of photosystem I. FEBS Lett. 1982, 148, 313-316.

Bonnerjea, J., Ortiz, W., et Markin, R. Identification of the 19-kDa polypeptide as an Fe-S center apoprotein in the photosystem I primary electron acceptor complex. Arch. Biochem. Biophys. 1985, 240, 15-20.

Böttcher, B., Gräber, P., et Boekema, E.J. The structure of photosystem I from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* sp. determined by electron microscopy of two-dimensional crystals. Biochim Biophys. Acta. 1992, 1100, 125-136.

Bottin, H., et Mathis, P. Interaction of plastocyanin with the photosystem I reaction center: a kinetic study. Biochemistry 1985, 24, 6453-6460.

Bottin, H., et Mathis, P. Turn-over of electron donors in photosystem I: double-flash experiments with pea chloroplasts and photosystem I particles. Biochim. Biophys. Acta. 1987, 892, 91-98.

Braumann, T., Weber, G., et Grimme, L.H. Carotenoid and chlorophyll composition of light-harvesting and reaction center proteins of the thylakoid membrane. Photobiochem. Photobiophys. 1982, 4, 1-8

Braumann, T., Gräpper, T.H., Damm, I., et Grimme, L.H. Function of chlorophylls and carotenoids in thylakoid membranes. Pigment bleaching in relation to PS-I and PS-II activity of subchloroplast particles prepared with digitonin. Advances in photosynthesis research, Vol. II (C. Sybesma Ed.) 1984, 137-140.

Breton, J., et Nabedryk, E. Pigment and protein organization in reaction center and antenna complexes. Topics in photosynthesis - the light reaction (Barber, J. ed.) 1987, 159-195.

Brettel, K., Sétif, P., et Mathis, P. Flash-induced absorption changes in photosystem I at low temperature: evidence that the electron acceptor A<sub>1</sub> is vitamin K<sub>1</sub>. FEBS Lett. 1986, 203, 220-224.

Brown, J.S., et French, C.S. Absorption spectra and relative photostability of the different forms of chlorophyll in *Chlorella*. Plant Physiol. 1959, 34, 305-309.

Bruce, B.D., et Malkin, R. Subunit stoichiometry of the chloroplast photosystem I complex. J. Biol. Chem. 1988, 263, 7302-7308.

Brüggemann, W. Low-temperature limitations of photosynthesis in three tropical *Vigna* species: A chlorophyll fluorescence study. Photosynth. Res., 1992, 34, 301-310.

Budil, D.E., et Thurnauer, M.C. The chlorophyll triplet state as a probe of structure and function in photosynthesis. Biochim. Biophys. Acta. 1991, 1057, 1-41.

Bukhov, N.G., Sabat, S.C., et Mohanty, P. Analysis of chlorophyll a fluorescence changes in weak light in heat treated Amaranthus chloroplasts. Photosynth. Res. 1990, 23, 81-87.

Büttner, M., Xie, D.-L., Nelson, H., Pinther, W., Hauska, G., et Nelson, N. The photosystem-I-like P840-reaction center of green S-bacteria is a homodimer. Biochim. Biophys. Acta. 1992, 1101, 154-156.

Byler, D.M., et Susi, H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolution FTIR spectra. Biopolymers 1986, 25, 469-487.

Cammack, R., et Evans, M.C.W. EPR spectra of iron-sulphur proteins in dimethylsulfoxide solutions: evidence that chloroplast photosystem I particles contain 4Fe-4S centers. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1975, 67, 544-549.

Campos, J.L., Figueras, X., Pinol, M.T., Boronat, A., et Tuburcio, A.F. Carotenoid and conjugated polyamine levels as indicators of ultraviolet-C induced stress in *Arabidopsis thaliana*. Photochem. Photobiol. 1991, 53, 689-693.

Carillo, N., et Vallejos, R.H. The light-dependent modulation of photosynthetic electron transport. Trends Biochem. Sci. 1983, 8, 52-56.

Carpentier, R., Leblanc, R.M., et Bellemare, G. Chlorophyll photobleaching in pigment-protein complexes. Z. Naturforsch. 1986, 41c, 284-290.

Chapados, C., Lemieux, S., et Carpentier, R. Protein and chlorophyll in photosystem II probed by infrared spectroscopy. Biophys. Chem. 1991, 39, 225-239.

Chitnis, P.R., et Nelson, N. Assembly of two subunits of the Cyanobacterial photosystem I on the n-side of the thylakoid membranes. Plant Physiol. 1992, 99, 239-246.

Choquet, Y., Goldschmidt-Clermont, M., Girard-Bascou, J., Kück, P., Benoun, P., et Rochaix, J.D. Mutant phenotypes support a trans-splicing mechanism for the expression of the tripartite psaA gene in the *C. reinhardtii* chloroplast. Cell 1988, 52, 903-913.

Choudhury, N.K., Choe, H.T., et Huffaker, R.C. Ascorbate induced zeaxanthin formation in wheat leaves and photoprotection of pigment and photochemical activities during aging of chloroplasts in light. J. Plant Physiol. 1993, 141, 551-556.

Cogdell, R.J., Parson, W.W., et Kerr, M.A. The type, amount, location, and energy transfert properties of the carotenoid in reaction centers from *Rhodopseudomonas Spheroides*. Biochim. Biophys. Acta. 1976, 430, 83-91.

Cogdell, R.J. Carotenoid-bacteriochlorophyll interactions. Springer Ser. Chem. Phys. 1985, 42, 62-66.

Cogdell, R.J., et Frank, H.A. How carotenois function in photosynthetic bacteria. Biochim Biophys. Acta. 1987, 895, 63-79.

Cohen, Y., et Nechushtai, R. Assembly and processing of subunit II (PsaD) precursor in the isolated photosystem-I complex. FEBS Lett. 1992, 302, 15-17.

Cosgrove, S.A., Guite, M.A., Burnell, T.B., et Christensen, R.L. Electronic relaxation in long polyenes. J. Phys. Chem. 1990, 94, 8118-8124.

Coufal, J., Hladik, J., et Sofrova, D. The carotenoid content of photosystem I-pigment-protein complexes of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. Photosynthetica 1989, 23, 603-616.

Cushman, J.C., Hallick, R.B., et Price, C.A. The two genes for the P700 chlorophyll a apoprotein on the *Euglena gracilis* chloroplast genome contain multiple introns. Curr. Genet. 1988, 13, 159-171.

Dainese, P., Marquardt, J., Pineau, B., et Bassi, R. Identification, of violaxanthin and zeaxanthin binding proteins in maize photosystem II. Research in Photosynthesis Vol. I (Murata, N. Ed.) 1992, 287-290.

Dahlin, C. Correlation between pigment composition and apoproteins of the light-harvesting complex II (LHC II) in wheat (*Triticum aestivum*). Physiol. Plant. 1988, 74, 342-348.

Day, D.A., Ryrie, I.J., et Fuad, N. Investigations of the role of the main light-harvesting chlorophyll a/b protein complex in thylakoid membranes. Reconstitution of depleted membranes from intermetent-light-grown plants with the isolated complex. J. Cell Biol. 1984, 97, 163-172.

Demeter, S., Neale, P.J., et Melis, A. Photoinhibition: impairment of the primary charge separation between P-680 and pheophytin in photosystem II of chloroplasts. FEBS Lett. 1987, 214, 370-374.

Demmig-Adams, B., Winter, K., Krüger, A., et Czygan, F.-C. Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves: a possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light energy. Plant Physiol. 1987, 84, 218-224.

Demmig-Adams, B. Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin. Biochim. Biophys. Acta. 1990, 1020, 1-24.

Demmig-Adams, B., Adams, W.W. III, Huber, U., Neimanis, S., Winter, K., Krüger, A., Czygan, F.-C., Bilger, W., et Björkman, O. Inhibition of zeaxanthin formation and of rapid changes in radiationless energy dissipation by dithiothreitol in spinach leaves and chloroplasts. Plant Physiol. 1990, 92, 293-301.

Den Blanken, H.J., et Hoff, A.J. High-resolution absorbance-difference spectra of the triplet state of the primary donor P-700 in photosystem I subchloroplast particles measured with absorbance-detected magnetic resonance at 1.2 K. Evidence that P-700 is a dimeric chlorophyll complex. Biochim. Biophys. Acta. 1983, 724, 52-61.

Dexter, D.L. A sensitized luminescence in solids. J. Chem. Phys. 1953, 21, 836-850.

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

Dousseau, F., Therrien, M., et Pézolet, M. On the spectral subtraction of water from the FT-IR spectra of aqueous solutions of proteins. Appl. Spectrosc. 1989, 43, 538-542.

Dousseau, F., et Pézolet, M. Determination of the secondary structure content of proteins in aqueous solutions from their amide I and amide II infrared bands. Comparaison between classical and partial least-squares methods. Biochemistry 1990, 29, 8771-8779.

Dunahay, T.G., et Staehelin, L.A. Isolation of photosystem I complexes from octyl glucoside/sodium dodecyl sulfate solubilized spinach thylakoids. Plant Physiol. 1985, 78, 606-613.

Dunn, P.P.J., et Gray, J.C. Localization and nucleotide sequence of the gene for the 8 kDa subunit of the photosystem I in pea and wheat chloroplast DNA. Plant Mol. Biol. 1988, 11, 311-319.

Egorov, S.Y., et Krasnovsky, A.A. Jr. Participation of chlorophyll triplet state and singlet molecular oxygen in chloroplast photodestruction. Research in Photosynthesis Vol III (Murata, N. Ed.). 1992, 111-114.

Eickmeier, W.G., Casper, C., et Osmond, C.B. Chlorophyll fluorescence in the resurrection plant *Selaginella lepidophylla* (Hook. and Grev.) spring during high-light and dessication stress, and evidence for zeaxanthin-associated photoprotection. Planta 1993, 189, 30-38.

Evans, E.H., Rush, J.D., Johnson, C.E. et Evans, M.C.W. Mossbauer spectra of photosystem I reaction centres from the blue-green alga *Chlorogloea fritschii*. Biochem. J. 1979, 182, 861-865.

Evans, E.H., Dickson, D.P.E., Johnson C.E., Rush, J.D., et Evans, M.C.W. Mossbauer spectroscopic studies of the native of centre X of photosystem I reaction centres from Cyanobacterium *Chlorogloea fritschii*. Eur. J. Biochem. 1981, 118, 81-84.

Fahrenfort, J. Attenuated Total Reflection. A new principle for the production of useful infrared spectra of organic compounds. Spectrochim. Acta. 1961, 17, 698-702.

Fenton, J.M., Pellin, M.J., Govinjee, et Kaufmann, K.J. Primary photochemistry of the reaction center of photosystem I. FEBS Lett. 1979, 100, 181-190.

Fish, L.E., et Bogorad, L. Identification and analysis of the maize P700 chlorophyll a apoprotein PSI-A1 and PSI-A2 by high pressure liquid chromatography analysis and partial determination. J. Biol. Chem. 1986, 261, 8134-8139.

Foote, C.S. Photosensitized oxidation and singlet oxygen: consequences in biological systems. Free Radical in Biology (Pryor, W.A. ed.). 1976, 2, 85-133.

Foots, C.S., Chang, Y.C., et Denny, R.W. Chemistry of singlet oxygen. X. Carotenoid quenching parallels biological protection. J. Am. Chem. Soc. 1970, 92, 5216-5218.

Förster, T. Transfer mechanism of electronic excitation. Discuss. Faraday Soc. 1959. 27, 7-17.

Forti, G., et Grubas, P.M.G. Two sites of interaction of ferredoxin with thylakoids. FEBS Lett. 1985, 186, 149-157.

Foyer, C.H. Photosynthesis (Bittar, E.E. ed.) 1984, 1-70.

Foyer, C.H. La résistance des plantes à l'oxygène. La Recherche 1993, 252, 673-679.

Frackowiak, D., Lorrain, L., Wrobel, D., et Leblanc, R.M. Polarized photoacoustic, absorption and fluorescence spectra of chloroplasts and thylakoids oriented in polyvinyl alcohol films. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1985, 126, 254-261.

Frank, H.A., Violette, C.A., Trautman, J.K., Shreve, A.P., Owens, T.G., et Albrecht, A.C. Carotenoids in photosynthesis: structure and photochemistry. Pure Appl. Chem. 1991, 63, 109-114.

Frank, H.A., Farhoosh, R., DeCoster, B., et Christensen, R.L. Molecular feature that control the efficiency of carotenoid-to-chlorophyll energy transfer in photosynthesis. Research in Photosynthesis Vol. I (Murata, N. Ed.) 1992, 125-128.

Frank, H.A., Farhoosh, R., Aldema, M.L., DeCoster, B., Chritensen, R.L., Gebhard, R., et Lugtenburg, J. Carotenoid-to-bacteriochlorophyll singlet energy transfer in carotenoid-incorporated B850 light-harvesting complexes of *Rhodobacter spaeroides* R-26.1. Photochem. Photobiol. 1993, 57, 49-55.

Franzén, L.-G., Frank, G., Zuber, H., et Rochaix, J.-D. Isolation and characterization of cDNA clones encoding the 17.9 and 8.1 kDa subunits of photosystem I from *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Mol. Biol. 1989, 12, 463-474.

Frech, R.E. Optical constants of crystals and aqueous solutions by ATR techniques. Diss. Abstr. 1968, B29(3) 960-965.

Fujii, T., Yokoyama, E.-I., Inoue, K., et Sakurai, H. The sites of electron donation of photosystem I to methyl viologen. Biochim. Biophys. Acta. 1990, 1015, 41-48.

Gallant, J. Purification des lipides du chloroplaste par chromatographie liquide à haute performance et études spectroscopiques de mélanges chlorophylle a/lipides à l'état monomoléculaire. Mémoire de maîtrise (UQTR), 1990.

- Ganter, U.M., Charitopoulos, T., Virmaux, N., et Siebert, F. Conformational changes of cytosolic loops of bovine rhodopsin during the transition to metarhodopsin-II: a investigation by Fourier transform infrared difference spectroscopy. Photochem. Photobiol. 1992, 56, 57-62.
- Garab, G., Szito, T., et Faludi-Daniel, A. Organisation of pigments and pigment-protein complexes of thylakoids revealed by polarized light spectroscopy. The light reactions (Barber,J. ed.) 1987, 305-339.
- Gast, P., Swarthoff, T., Ebskamp, F.C.R., et Hoff, A.J. Evidence for a new early acceptor in photosystem I of plants. An ESR investigation of reaction center triplet yield and of its reduced intermediary acceptors. Biochim. Biophys. Acta. 1983, 722, 163-175.
- Gerwert, K. Molecular reaction mechanism of photosynthetic proteins as determined by FTIR-spectroscopy. Biochim. Biophys. Acta. 1992, 1101, 147-153.
- Gillbro, T., Cogdell, R.J., et Sundström, V. Energy transfer from carotenoid to bacteriochlorophyll-a in the B800-820 antenna complex from *Rhodopseudomonas acidiphila* strain 7050. FEBS Lett., 1988, 235, 169-172.
- Gillbro, T., Andersson, P.O., Liu, R.S.H., Asato, A.E., Takaishi, S., et Cogdell, R.J. Location of the carotenoid 2Ag-state and its role in photosynthesis. Photochem. Photobiol. 1993, 57, 44-48.

Gillie, J.K., Fearey, B.L., Hayes, J.M., et Small, G.J.  
Persistent hole burning of the primary donor state of  
photosystem I: strong linear electron-photon coupling.  
Chem. Phys. Lett. 1987, 134, 316-322.

Golbeck, J.H., Lien, S., et San Pietro, A. Isolation and  
characterization of a subchloroplast particle enriched in  
iron-sulfur protein and P-700. Arch. Biochem. Biophys.  
1977, 178, 140-150.

Golbeck, J.H., Velthuys, B.R., et Kok, B. Evidence that  
the intermediate electron acceptor,  $A_2$ , in photosystem I  
is a bound iron-sulfur protein. Biochim. Biophys. Acta.  
1978, 188, 233-242.

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

Golbeck, J.H., McDermett, A.E., Jones, W.K., et Kurtz, D.M.  
Evidence for the existence of [2Fe-2S] as well as [4Fe-  
4S] clusters among  $F_A$ ,  $F_B$  and  $F_x$ . Implications for the  
structure of photosystem I reaction center. Biochim.  
Biophys. Acta. 1987a, 891, 94-98.

Golbeck, J.H., Parret, K.G., et McDermott, A.E.  
Photosystem I charge separation in the absence of center  
A and B. III. Biochemical characterization of a reaction  
center particle containing P-700 and  $F_x$ . Biochim.  
Biophys. Acta. 1987b, 893, 149-160.

Golbeck, J.H., Parret, K.G., Mehari, T., Jones, K.L., et  
Brand, J.J. Isolated of the intact photosystem I  
reaction center core containing P700 and iron-sulfur  
center F<sub>X</sub>. FEBS Lett. 1988, 228, 268-272.

Golbeck, J.H. Structure and function of the photosystem I.  
Annu. Rev. Plant Physiol. 1992, 43, 293-324.

Golbeck, J.H. Shared thematic elements in photochemical  
reaction centers. Proc. Natl. Acad. Sci. 1993, 90, 1642-  
1646.

Gounaris, K, Brain, A.P.R., Quinn, P.J., et Williams, W.P.  
Structural and functional changes associated with-induced  
phase -separatin of non-bilayer lipids in chloroplast  
thylakoid membranes. FEBS Lett. 1983, 153, 47-52.

Gounaris, K., Brain, A.P.R., Quinn, P.J., et Williams, W.P.  
Structural organization of chloroplast thylakoid  
membranes response to heat-stress. Biochim. Biophys.  
Acta. 1984, 766, 198-208.

Grams, G.W., et Eskins, K. Dye-sensitized photooxidation  
of tocopherols. Correlation between singlet oxygen  
reactivity and vitamin E activity. Biochemistry 1972, 11,  
606-608.

Green, B.R., Pichersky, E., et Kloppstech, K. Chlorophyll  
a/b-binding proteins: an extended family. Trends  
Biochem. Sci. 1991, 16, 181-186.

Greenbaum, N.L., et Mauzerall, D. Effect of irradiance level on distribution of chlorophylls between PSII and PSI as determined from optical cross-sections. Biochim. Biophys. Acta. 1991, 1057, 195-207.

Gross, E.L. Cation-induced increases in the rate of P-700 recovery in photosystem I particle. Arch. Biochem. Biophys. 1979, 195, 198-204.

Grumbach, K. Interconversion of carotenoids and quinones after onset of photosynthesis in chloroplasts of higher plants. Z. Naturforsch. 1983, 38C, 393-398.

Gruszecki, W.I., et Krupa, Z. LHCII preparation exhibits properties of zeaxanthin epoxidase. J. Photochem. Photobiol. 1993, 17, 291-292.

Guigliarelli, B., Guillaussier, J., Bertrand, P., Gayda, J.P., et Sétif, P. Evidence for only one iron-sulfur cluster in center X of photosystem I from higher plants. J. Biol. Chem. 1989, 264, 6025-6028.

Gulotty, R.J., Metz, L., Alberte, R.S., et Fleming, G.R. Picosecond fluorescence study of photosynthetic mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*: origin of the fluorescence decay kinetics of chloroplasts. Photochem. Photobiol. 1985, 41, 487-496.

Haehnel, W., Berzborn, R.J., et Andersson, B. Localization of the reaction side of plastocyanin from immunological and kinetic studies with inside-out thylakoid vesicles. Biochim. Biophys. Acta. 1981, 637, 389-399.

Haehnel, W. On the functional organization on electron transport from plastoquinone to photosystem I. Biochim. Biophys. Acta. 1982, 687, 245-256.

Hager, A. The reversible, light-induced conversions in xanthophylls in the chloroplasts. Pigments in plants (F.-C. Czygan Ed.) Fisher, Stuttgart, 1980, 57-79.

Hanley, J.A., Kear, J., Bredenkamp, G., Li, G., Heathcote, P., et Evans, M.C.W. Biochemical evidence for the role of the bound iron-sulfur centres A and B in NADP reduction by photosystem I. Biochim. Biophys. Acta. 1992a, 1099, 152-156.

Hanley, J.A., Heathcote, P., et Evans, M.C.W. Biochemical evidence for the role of the bound iron-sulfur centres A and B in NADP reduction by photosystem I. Research in Photosynthesis Vol. I (Murata, N. Ed.) 1992b, 617-620.

Haris, P.I., Lee, D.C., et Chapman, D. A Fourier transform infrared investigation of the structural differences between ribonuclease A and ribonuclease S. Biochim. Biophys. Acta. 1986, 874, 255-265.

Haris, P.I., et Chapman, D. Fourier transform infrared spectra of the polypeptide alamethicin and a possible structural similarity with bacteriorhodopsin. Biochim. Biophys. Acta. 1988, 943, 375-380.

Haris, P.I., Chapman, D., Harrison, R.A., Smith, K.F., et Perkins, S.J. Conformational transition between native and reactive center cleaved forms of  $\alpha$ -antitrypsin by Fourier transform infrared spectroscopy and small-angle neutron scattering. Biochemistry 1990, 29, 1377-1380.

Herrick, N.J. Surface chemistry from spectral analysis of totally internally reflected radiation. J. Phys. Chem. 1960, 64, 1110-1118.

Havaux, M. et Strasser, R.J. Protective of photosystem II by light in heat-stressed pea leaves. Z. Naturforsch. 1990 45C, 1133-1141.

Havaux, M. et Strasser, R.J. Antagonistic effects of red and far-red lights on the stability of photosystem II in pea leaves exposed to heat. Photochem. Photobiol. 1992, 55, 621-624.

Havaux, M. Stress tolerance of photosystem II in vivo. Antagonistic effects of water, heat, and photoinhibition stresses. Plant Physiol. 1992a, 100, 424-432.

Havaux, M. Photoacoustic measurements of cyclic electron flow around photosystem I in leaves adapted to light-states 1 and 2. Plant Cell Physiol. 1992b, 33, 799-803.

Haworth, P., Warson, J.L., et Arntzen, C.J. The detection, isolation and characterization of a light harvesting complex which is specifically associated with photosystem I. Biochim. Biophys. Acta. 1983, 724, 151-158.

Hayashi, H., Kolaczkoeski, S.V., Noguchi, T., Blanchard, D., et Atkinson, G.H. Picosecond time-resolved resonance Raman scattering and absorbance changes of carotenoids in light-harvesting systems of photosynthetic bacterium *Chromatium vinisum*. J. Am. Chem. Soc. 1990, 112, 4664-4670.

Hayashida, N., Matsubayashi, T., Shinozaki, K., Sugiura, M., Inoue, K., et Hiyama, T. The gene of the 9 kDa polypeptide, a possible apoprotein of the iron-sulfur centers A and B of the photosystem I complex, in tobacco chloroplast DNA. Curr. Genet. 1987, 12, 247-250.

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

He, W.-Z., et Malkin, R. Specific release of a 9-kDa extrinsic polypeptide of photosystem I from spinach chloroplasts by salt washing. FEBS Lett., 1992, 308, 298-300.

Hervas, M., Navarro, J.A., et Tollin G. A laser flash spectroscopy study of the kinetics of electron transfer from spinach photosystem I to spinach and algal ferredoxins. Photochem. Photobiol. 1992, 56, 319-324.

Hijima, T., et Ke, B. Biochim. Biophys. Acta. 1972, 267.

Hill, R., et Bendall, D.S. Function of the two cytochrome components in chloroplasts: A working hypothesis. Nature 1960, 186, 136-137.

Hinz, U.G., et Simpson, D.J. The protease-resistant core of the reaction center protein of photosystem I (P700 Chl<sub>a</sub>-P1). Carlsberg Res. Commun. 1988, 53, 321-330.

Hippler, M., Ratajczak, R., et Haehnel, W. Identification of the plastocyanin binding subunit of photosystem I. FEBS Lett. 1989, 250, 280-284.

Hiyama, T., Katoh, A., Shimuzi, T., Inoue, K., et Kubo, K. Preparation and properties of photosystem I reaction center complex. Progress in Photosynthesis Research (Biggins, J. ed.) 1986, II, 45-48.

Hiyama, T., Yanai, N., Takano, Y., Ogiso, H., Suzuki, K., et Terakado, K. A photosystem-1 reaction center complex constituted only by two subunits. Current Research in Photosynthesis (Baltscheffsky, M. ed.) 1990, II, 587-590.

Hoj, P.B., et Moller, B.L. The 110-kDa reaction center protein of photosystem I P700-chlorophyll a-protein 1, is an iron-sulfur protein. J. Biol. Chem. 1986, 261, 14292-14300.

Hoj, P.B., Svendsen, I., Scheller, H.V., et Moller, B.L. Identification of a chloroplast encoded 9 kDa polypeptide as a 2 (4Fe-4S) protein carrying center A and B of photosystem I. J. Biol. Chem. 1987, 262, 12676-12684.

Holloway, P.W., et Mantsch, H.H. Structure of cytochrome b<sub>5</sub> in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy. Biochemistry, 1989, 28, 931-935.

Hoshina, S., Sakurai, R., Kunishima, N., Wada, K., et Itoh, S. Selective destruction of iron-sulfur centers by heat/ethylen glycol treatment and isolation of photosystem I core complex. Biochim. Biophys. Acta. 1990, 1015, 61-68.

Humbeck, K., Romer, S., et Senger, H. Evidence for an essential role of carotenoids in the assembly of an active photosystem II. Planta 1989, 179, 242-250.

Huner, N.P.A., Krol, M., Williams, J.P., et Maissan, E. Over-wintering Periwinkle (*Vinca minor L.*) exhibits increased photosystem I activity. Plant Physiol. 1988, 87, 721-726.

Ikegami, I., et Itoh, S. Chlorophyll organization in P700 -enriched particles isolated from spinach chloroplast. Biochim. Biophys. Acta. 1986, 851, 75-85.

Ikegami, I., et Itoh, S. Evidence for the interaction of the photosystem I secondary electron acceptor X with chlorophyll a in spinach photosystem I particles. Biochim. Biophys. Acta. 1987, 893, 517-523.

Ikegami, I., et 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.

Ikegami, I., Itoh, S., et Katoh, S. Properties of P700-enriched particles from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. Current research in Photosynthesis (Baltscheffsky, M. ed.) 1990, II, 643-646.

Ikegami, I., et Katoh, S. Antenna chlorophyll a has a structural role in stabilizing the functional conformation of P-700-chlorophyll-protein complexes. Biochim Biophys. Acta. 1991, 1059, 275-280.

Ikegami, I. Reconstitution of antenna chlorophyll a in spinach PS-I complex. Research in Photosynthesis, Vol I (Murata, N. Ed.) 1992, 589-592.

Ikeuchi, M., Hirano, A., Hiyama, T., et Inoue, Y. Polypeptide composition of higher plant photosystem I complex. Identification of psaI, psaJ and psaK gene products. FEBS Lett. 1990, 263, 274-278.

Ikeuchi, M., et Inoue, Y. Two new components of 9 and 14 kDa from spinach photosystem I complex. FEBS Lett. 1991a, 280, 332-334.

Ikeuchi, M., Nyhus, K.J., Inoue, Y., et Pakrasi, H.B. Identities of four low-molecular-mass subunits of the photosystem I complex from *Anabaena variabilis* ATCC 29413. Evidence for the presence of the psaI gene product in a cyanobacterial complex. FEBS Lett. 1991b, 287, 5-9.

Ikeuchi, M. Subunit proteins of photosystem I. Plant Cell Physiol., 1992, 33, 669-676.

Ikeuchi, M., Sonoike, K., Koike, H., Pakrasi, H.B., et Inoue, Y. A novel 3.5 kDa protein component of cyanobacterial photosystem I complexes. Plant Cell Physiol. 1992, 33, 1057-1063.

Inoue, K., Fujii, T., Yokoyama, E., Matsuura, Hiyama, T., et Sakurai, H. The photoinhibition site of photoinhibition in isolated chloroplasts under extremely reducing conditions. Plant Cell Physiol. 1989, 30, 65-71.

Inoue, K., Fujii, T., Yokoyama, E.-I., Kusumoto, N., et  
Sakurai, H. The site of photoinhibition around  
photosystem I in chloroplasts. Current Research in  
Photosynthesis (Baltscheffsky, M. ed.) 1990, II, 655-658.

Itoh, S., et Iwaki, M. Competitive bindings of herbicide  
and quinone to photosystem I phylloquinone (A-1) binding  
site. Current Research in Photosystnesis (Baltscheffsky,  
M. ed.) 1990 II, 651-654.

Itoh, S., et Iwaki, M. Full replacement of the function of  
the secondary electron acceptor phylloquinone (= vitamin  
 $K_1$ ) by non-quinone carbonyl compounds in green plant  
photosystem I photosynthetic reaction centers.  
Biochemistry 1991, 30, 5340-5346.

Iwaki, M., et Itoh, S. Structure of the phylloquinone-  
binding (Q) site in green plant photosystem I reaction  
centers: the affinity of quinones and quinonoid compounds  
for the Q site Biochemistry 1991, 30, 5347-5352.

Iwata, K., Hayashi, H. et Tasumi, M. Resonance Raman  
studies of the conformations of all-trans carotenoids in  
light-harvesting systems of photosynthetic bacteria.  
Biochim. Biophys. Acta. 1985, 810, 269.

Janssen, L.H.J., Wams, H.E., et Hasselt van, P.R.  
Temperature dependence of chlorophyll fluorescence  
induction and photosynthesis in tomato as affected by  
temperature and light conditions during growth. J. Plant  
Physiol. 1992, 139, 549-554.

Jennings, R.C., Zucchelli, G., et Garlaschi, F.M. The influence of reducing the chlorophyll concentration by photobleaching on energy transfer to artificial traps within photosystem II antenna systems. Biochim. Biophys. Acta. 1989, 975, 29-33.

Jennings, R.C., Zucchelli, G., et Garlaschi, F.M. Excitation energy transfer from chlorophyll spectral forms to photosystem II reaction centers: a fluorescence induction study. Biochim. Biophys. Acta. 1990, 1016, 259-265.

Jia, Y, Jean, J.M., Werst, M.M., Chan, C.-K., et Fleming, G.R. Simulations of the temperature dependence of energy transfer in the PSI core antenna. Biophys. J., 1992, 63, 259-273.

Junge, W. Encyclopedia of plant physiology, new series. 1977, Vol. 5, 59-93.

Kamogawa, K., Morris, J.M., Tagaki, Y., Nakashima, N., Yoshihara, K., et Ikegami, I. Picosecond fluorescence studies of P700-enriched particles of spinach chloroplasts. Photochem. Photobiol. 1983, 37, 207-213.

van Kan, P.J.M., Otte, S.C.M., Kleinherenbrink, F.A.M., Nieven, M.C., Aartsma, T.J., et van Gorkom, H.J. Time-resolved spectroscopy at 10 K of the photosysteme II reaction center; deconvolution of the red absorption band. Biochim. Biophys. Acta. 1990, 1020, 146-152.

Katlafsky, B., et Keller, R.E. Attenuated total reflectance infrared analysis of aqueous solutions. Anal. Chem. 1963, 35, 1665-1670.

Katoh, T., Nagashima, U., et Mimuro, M. Fluorescence properties of allenic carotenoid fucoxanthin: implication for energy transfer in photosynthetic systems. Photosynth. Res. 1990, 27, 221-226.

Katz, J.J., et Hindman, J.C. Photochemical conversion and storage of solar energy. (Connolly, J. ed.) 1981, 27-78.

Kauppinen, J.K., Moffat, D.J., Mantsch, H.H., et Cameron, D.G. Fourier self-deconvolution: a method for resolving intrinsically overlapped bands. Appl. Spectrosc. 1981, 35, 271-276.

Ke, B. Biochim. Biophys. Acta. 1972, 267, 595-599.

Ke, B., Sugahara, K., et Shaw, E.R. Further purifications of "Triton subchloroplast fraction I" (TSF-1 particles). Isolation of a cytochrome-free high-P700 particle and a complex containing cytochrome f and b<sub>6</sub>, plastocyanin and iron-sulfur protein(s). Biochim. Biophys. Acta. 1975, 408, 12-25.

Ke, B., Sugahara, K., et Sahu, S. Light-induced absorption changes in photosystem I at low temperatures. Biochim. Biophys. Acta. 1976, 449, 84-94.

Khachik, F., Beecher, G.R., Goli, M.B., et Lusby, W.R. Separation and quantitation of carotenoids in foods. Methods in Enzymol. 1992, 213, 347-359.

- Kingma, H., van Grondelle, R., et Duysens, L.N.M.  
Magnetic-field effects in photosynthetic bacteria. I  
Magnetic-field-induced bacteriochlorophyll emission  
changes in the reaction center and the antenna of  
*Rhodospirillum rubrum*, *Rhodopseudomonas sphaeroides* and  
*Prosthecochloris aestuarii*. Biochim. Biophys. Acta.  
1985a, 808, 363-382.
- Kingma, H., van Grondelle R., et Duysens, L.N.M.  
Magnetic-field effects in photosynthetic bacteria. II  
Formation of triplet states in the reaction center and  
the antenna of *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodopseudomonas*  
*sphaeroides*. Biochim. Biophys. Acta. 1985b, 808 383-399.
- Kirilovsky, D., et Etienne, A.-L. Protection of reaction  
center II from photodamage by low temperature and  
anaerobiosis in spinach chloroplasts. FEBS Lett. 1991,  
279, 201-204.
- Kirsch, W., Seyer, P., et Herrmann, R.G. Curr. Genet.  
1986, 10, 843-855.
- Klimov, V.V., Dolan, E., Shaw, E.R., et Ke, B. Interaction  
between the intermediary electron acceptor (pheophytin)  
and a possible plastoquinone-iron complex in photosystem  
II reaction centers. Proc. Natl. Acad. Sci. 1980, 77,  
7227-7231.
- Knoetzel, J., Svendsen, I., et Simpson, D.J.  
Identification of the photosystem I antenna polypeptide  
in barley. Isolation of the three pigment-binding antenna  
complexes. Eur. J. Biochem., 1992, 206, 209-215.

Knoetzel, J., et Simpson, D. Polypeptides involved in excitation energy transfer to photosystem I in barley. Research in Photosynthesis Vol. I, (Murata, N. Ed.) 1992, 645-648.

Koike, H., Ikeuchi, M., Hiyama, T., et Inoue, Y. Identification of photosystem I components from the cyanobacterium *Synechococcus vulgaris* by N-terminal sequencing. FEBS Lett. 1989, 253, 257-263.

Kojima, Y., Niinomi, Y., Tsuboi, S., Hiyama, T., et Sakurai, H. Destruction of photosystem I iron-sulfur centers of spinach and *Anacystis nidulans* by mercurials. Bot. Mag. Tokyo 1987a, 100, 243-253.

Kojima, Y., Hiyama, T., et Sakurai, H. Effects of mercurials on iron-sulfur centers of photosystem I of *Anacystis nidulans*. Progress in Photosynth. Res. Vol. II (Biggins, J. ed.) 1987b, 57-60.

Kok, B., Gassner, E.B., et Rurainski, H.J. Photoinhibition of chloroplast reactions. Photochem. Photobiol. 1965, 4, 215-227.

Koka, P., et Song, P.-S. Protection of chlorophyll-a by carotenoid from photodynamic decomposition. Photochem. Photobiol. 1978, 28, 509-515.

Kolubayev, T., Geacintov, N.E., Paillotin, G., et Breton, J. Domain size in chloroplasts and chlorophyll-protein complexes probed by fluorescence yield quenching induced by singlet-triplet exciton annihilation. Biochim. Biophys. Acta. 1985, 808, 66-76.

Koyama, Y., Kanaji, M., et Shimamura, T. Configurations of neurosporene isomers isolated from the reaction center and the light-harvesting complex of Rhodobacter sphaeroides G1C. A resonance Raman, electronic absorption, and H-NMR study. Photochem. Photobiol. 1988, 48, 107-114.

Koyama, Y. Natural selection of carotenoid configurations by the reaction center and light-harvesting complex of photosynthetic bacteria. Carotenoids: Chemistry and biology (ed. Krinsky, N.I.) 1990, 207-222.

Koyama, Y. Structures and functions of carotenoids in photosynthetic systems. J. Photochem. Photobiol. 1991, 9, 265-280.

Kramer, H., et Mathis, P. Quantum yield and rate of formation of the carotenoid triplet state in photosynthetic structures. Biochim. Biophys. Acta. 1980, 593, 319-329.

Krause, G.H., et Santarius, K.A. Relative thermostability of the chloroplast envelope. Planta 1975, 127, 285-299.

Kreuze, K., Dehesh, K., et Apel, K. The light-dependent accumulation of the P-700 chlorophyll-a protein of the photosystem I reaction center in barley. Evidence for translational control. Eur. J. Biochem. 1986, 159, 459-467.

Krinsky, N.I. Non-photosynthetic functions of carotenoids. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 1978, 284, 581-590.

Krinsky, N.I. Carotenoid protection against oxidation. Pure Appl. Chem. 1979, 51, 649-660.

Kück, U., Choquet, Y., Schneider, M., Dron, M., et Bennoun, P.

Structural and transcription analysis of two homologous genes for the P700 chlorophyll a-apoproteins in *Chlamydomonas reinhardtii*: evidence for in vivo trans-splicing. EMBO J. 1987 6, 2185-2195.

Lagoutte, B., et Vallon, O. Purification and membrane topology of PSI-D and PSI-E, two subunits of the photosystem I reaction center. Eur. J. Biochem. 1992, 205, 1175-1185.

Lam, E., Ortiz, W., Mayfield, S., et Malkin, R.

Isolation and characterization of a light-harvesting chlorophyll a/b protein complex associated with photosystem I. Plant Physiol. 1984a, 74, 650-655.

Lam, E., Ortiz, W. et Malkin, R. Chlorophyll a/b protein of photosystem I. FEBS Lett. 1984b, 168, 10-14.

Larkum, A.W.D., et Barrett, J. Light-harvesting processes in algae. Adv. Bot. Res. 1983, 10, 1-219.

Lebedev, N.N., Siffel, P., Krasnovsky, A.A., et Bakh, A.N.

Free chlorophylls in green plant cells. Research in Photosynthesis Vol. III (Murata, N. Ed.) 1992, 127-130.

Lee, D.C., Hayward, J.A., Restall, C.J., et Chapman, D.

Second-derivative infrared spectroscopic studies of the secondary structures of bacteriorhodopsin and  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Biochemistry 1985, 24, 4364-4373.

- Lee, D.C., Haris, P.I., Chapman, D., et Mitchell, R.C. Determination of protein secondary structure using factor analysis of infrared spectra. Biochemistry 1990, 29, 9185-9193.
- Lepock, J.R., Ritchie, K.P., Kolios, M.C., Rodahl, A.M., Heinz, K.A., et Kruuv, J. Influence of transition rates and scan rate on kinetic simulations of differential scanning calorimetry profiles of reversible and irreversible protein denaturation. Biochemistry 1992, 31, 12706-12712.
- Li, N., Warren, P.V., Golbeck, J.H., Gerhard, F., Zuber, H., et Bryant, D.A. Polypeptide composition of the photosystem I complex and the photosystem I core protein from *Synechococcus* sp. PCC 6301. Biochim. Biophys. Acta. 1991, 1059, 215-225.
- Lichtenthaler, H.K., Prenzel, U., Douce, R., et Joyard, J. Localization of prenylquinones in the envelope of spinach chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta. 1981, 641, 99-105.
- Lichtenthaler, H.K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. Methods Enzymol. 1987, 148, 350-382
- Lichtenthaler, H.K., et Schindler, C. Studies on the photoprotective function of zeaxanthin at high-light conditions. Research in Photosynthesis Vol. IV (Murata, N. Ed.) 1992, 517-520.

Lien, S., et San Pietro, A. Interaction of plastocyanin and P700 in PSI reaction center particles from *C. reinhardtii* and spinach. Arch. Biochem. Biophys. 1979, 194, 128-137.

Lutz, M., Kleo, J., et Reiss-Husson, F. Resonance Raman scattering of bacteriochlorophyll bacteriopheophytin and spheroidene in reaction centers of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. Biochem. Biophys. Res. Commn. 1976, 69, 711.

Lutz, M., Agalidis, I., Hervo, G., Cogdell, R.J., et Reiss-Husson, F. On the state of carotenoids bound to reaction centers of photosynthetic bacteria: A resonance Raman study. Biochim. Biophys. Acta. 1978, 503, 287.

Lyle, P.A., et Struve, W.S. Temperature dependence of antenna excitation transport in native photosystem I particles. J. Phys. Chem. 1991, 95, 4152-4158.

Ma, S.F., Lin, C.Y., et Chen, Y.M. Comparative studies of chilling stress on alterations of chloroplast ultrastructure and protein synthesis in the leaves of chilling-sensitive (mungbean) and -insensitive (pea) seedlings. Bot. Bull. Academia Sinica 1990, 31, 263-272.

Maeda, H., Watanabe, T., Kobayashi, M., et Ikegami, I. Presence of two chlorophyll a' molecules at the core of photosystem I. Biochim. Biophys. Acta. 1992a, 1099, 74-80.

Maeda, H., et Watanabe, T. Assay of photosynthetic reaction centres by HPLC quantitation of chlorophyll a' and pheophytin a. Application to the chromatic regulation of photosystem stoichiometry cyanophytes. J. Photochem Photobiol., 1992, 13, 267-274.

Maeda, H., Watanabe, T., et Sonoike, K. Chemical environment around the two chlorophyll a' molecules at the core of photosystem I. Research in Photosynthesis Vol. I (Murata, N., Ed.) 1992b, 545-548.

Maeda, H., Watanabe, T., Kobayashi, S., et Hiyama, T. Normal-phase HPLC quantitation of chlorophyll a' and phylloquinone in photosystem I particles. Photosynth. Res. 1993, 35, 179-184.

Malkin, R. Photochemical properties of a photosystem I subchloroplast fragment. Arch. Biochem. Biophys. 1975, 169, 77-83.

Malkin, R., Ortiz, W., Lam, R., et Bonnerjea, J. Physiol. Veg. 1985, 23, 619-625.

Malkin, R. On the function of two vitamin K<sub>1</sub> molecules in the photosystem I electron acceptor complex. FEBS Lett. 1986, 208, 343-346.

Mansfield, R.W., et Evans, M.C.W. Optical difference spectra of the electron acceptor A<sub>O</sub> in photosystem I. FEBS Lett. 1985, 190, 237-241.

Mansfield, R.W., et Evans, M.C.W. UV optical difference spectrum associated with the reduction of electron acceptor A<sub>1</sub> in photosystem I of higher plants. FEBS Lett. 1986, 203, 225-229.

Mansfield, R.W., et Evans, M.C.W. EPR characteristics of the electron acceptors A<sub>O</sub>, A<sub>1</sub> and (Fe-S)X in digitonin and Triton X-100 solubilized pea photosystem I. Israel J. Chem., 1988, 28 97-102.

Mantele, W., Nabedryk, E., Tavitian, B.A., Kreutz, W., et Breton, J. Light-induced Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic investigations of the primary donor oxidation in the bacterial photosynthesis. FEBS Lett. 1985, 187, 227-232.

Mantele, W.G., Wollenweber, A.M., Nabedryk, E., et Brton, J. Infrared spectroelectrochemistry of bacteriochlorophylls and bacteriopheophytins: implication for the binding of the pigments in the reaction center from photosynthetic bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. 1988, 85, 8468-8472.

Margulies, M.M. Sequence similarity between photosystem I and II. Identification of a photosystem I reaction center transmembrane helix that is similar to transmembrane helix IV of the D2 subunit of photosystem II and the M subunit of the non-sulfur purple and flexible green bacteria. Photosynth. Res. 1991, 29, 133-147.

Markwell, J.P., et Thornber, J.P. Treatment of the thylakoid membrane with surfactants. Plant Physiol. 1982, 70, 633-636.

Markwell, J.; Bruce, B.D.; et Keegstra, K. Isolation of a carotenoid-containing sub-membrane particle from the chloroplastic envelope outer membrane of pea (*Pisum sativum*). J. biol. Chem., 1992, 267, 13933-13937.

Marsho, T.V., et Kok, B. Detection and isolation of P700. Methods in Enzymol. 1971, 23, 515-522.

Mathis, P., Butler, W.L., et Satoh, K. Carotenoid triplet state and chlorophyll fluorescence quenching in chloroplasts and subchloroplast particles. Photochem. Photobiol. 1979, 30, 603-614.

Mathis, P., et Schenck, C.C. The functions of carotenoids in photosynthesis. Carotenoid Chemistry and Biochemistry (G. Britton et T.W. Goodwin Eds.) 1982, 339-347.

Mathis, P., et Rutherford, A.W. The primary reactions of photosystem I and II of algae and higher plants. Photosynthesis, new comprehensive biochemistry (Amesz, J. ed.) 1987, 15, 63-96.

Mathis, P., Ikegami, I., et Setif, P. Nanosecond flash studies of the absorption spectrum of the photosystem I primary acceptor A<sub>O</sub>. Photosynth. Res. 1988, 16, 203-210.

Matsuura, K., et Shimada, K. Electrochromic spectral band shift of carotenoids in the photosynthetic membranes of *Rhodospirillum molischianum* and *Rhodospirillum photometricum*. Biochim Biophys. Acta. 1993, 1140, 293-296.

McDermott, A.E., Yachandra, V.K., Guiles, R.D., Britt, R.D., Dexheimer, S.L., Sauer, K., et Klein, M.P. Iron X-ray absorption spectra of acceptors in photosystem I. Progress in Photosynthesis Res. (Biggins, J. ed.) 1987, I, 249-252.

McDermott, A.E., Yachandra, V.K., Guiles, R.D., Britt, R.D., Dexheimer, S.L., Sauer, K., et Klein, M.P. Low-potential iron-sulfur centers of photosystem I. An X-ray absorption spectroscopy study. Biochemistry 1988, 27, 4014-4020.

Melis, A. Dynamics of photosynthetic membrane composition and function. Biochim. Biophys. Acta. 1991, 1058, 87-106.

Merati, G., et Zanetti, G. Chemical cross-linking of ferredoxin to spinach thylakoids. Evidence for two independent binding sites of ferredoxin to the membrane. FEBS Lett. 1987, 215, 37-40.

Metz, J.G., Krueger, R.W., et Mills, D. Chlorophyll-protein complexes of a photosystem II mutant of maize. Plant Physiol. 1984, 75, 238-241.

Mi, H., Endo, T., Schreiber, U., Ogawa, T., et Asada, K. Electron donation from cyclic and respiratory flows to the photosynthetic intersystem chain is mediated by pyridine nucleotide dehydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. Plant Cell Physiol. 1992a, 33, 1233-1237.

Mi, H., Endo, T., Schreiber, U., et Asada, K. Donation of electrons from cytosolic components to the intersystem chain in the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 as determined by reduction of P700<sup>+</sup>. Plant Cell Physiol. 1992b, 33, 1099-1105.

Miller, N. et Carpentier, R. Energy dissipation and photo-protection mechanisms during chlorophyll photobleaching in thylakoid membranes. Photochem. Photobiol. 1991, 54, 465-472.

Mimuro, M., et Katoh, T. Carotenoids in photosynthesis: absorption, transfer and dissipation of light energy. Pure Appl. Chem. 1991, 63, 123-130.

Mimuro, M., Nishimura, Y., Yamazaki, T., Katoh, T., et Nagashima, U. Fluorescence properties of the allenic carotenoid fucoxanthin: analysis of the effect of keto carbonyl group by using a model compound, all-trans-beta-apo-8'-carotenal. J. Lumin. 1991, 50, 1-10.

Minguez-Mosquera, M.I., Gandul-Rojos, B., Montanos-Asquerino, A., et Garrido-Fernandez, J. Determination of chlorophylls and carotenoids by high-performance liquid chromatography during olive lactic fermentation. J. Chromatogr. 1991, 585, 259-266.

Minorsky, P.V. Temperature sensing by plants: a review and hypothesis. Plant Cell Environ. 1989, 12, 119-135.

Moënne-Loccoz, P., Robert, B., Ikegami, I., et Lutz, M. Structure of the primary electron donor in photosystem I: a resonance Raman study. Biochemistry 1990, 29, 4740-4746.

Monger, T.G., et Parson, W.W. Singlet-triplet fusion in *Rhodopseudomonas sphaeroids* chromatophores. A probe of the organization of the photosynthetic apparatus. Biochim. Biophys. Acta. 1977, 460, 393-407.

Moore, A.L., Joy, A., Tom, R., Gust, D., Moore, T.A., Bensasson, R.V., et Land, E.J. Photoprotection of carotenoids during photosynthesis: Motional dependent of intramolecular energy transfer. Science 1982, 216, 982-984.

Mukerji, I., et Sauer, K. A spectroscopic study of a photosystem I antenna complex. Photosynthesis (Briggs, W.H.,ed.) 1990, II, 321-324.

Mukohata, Y., Matsuna, A., et Higashida, M. Biophysical studies on subcellular particles. VII. Combined effects of alcohol and heat on photosynthetic activities in isolated spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol. 1973a, 14, 119-216.

Mukohata, Y., Yagi, T., Igashida, M., Shinozaki, K., et Matsuna, A. Biophysical studies on subcellular particles. VI. Photosynthetic activities in isolated spinach chloroplasts after transient warming. Plant Cell Physiol. 1973b, 14, 111-118.

Mullet, J.E., Burke, J.J., et Arntzen, C.J. Chlorophyll proteins of photosystem I. Plant Physiol. 1980, 65, 814-822.

Münch, S., Ljungberg, U., Steppuhn, J., Schneiderbauer, A., Nechushtai, R., Beyreuter, K., et Herrmann, R.G. Nucleotide sequences of cDNAs encoding the entire precursor polypeptides of subunits II and III of the photosystem I reaction center of spinach. Curr. Genet. 1988, 14, 511- 518.

Murakami, A., et Fujita, Y. Regulation of photosystem stoichiometry in the photosynthetic system of the cyanophyte *Synechocystis* PCC 6714 in response to light-intensity. Plant Cell Physiol. 1991, 32, 223-230.

Mustardy, L., Cunningham, F.X., et Gantt, E. Photosynthetic membrane topography: quantitative *in situ* localization of photosystem I and II. Proc. Natl. Acad. Sci. 1992, 89, 10021-10025.

Nabedryk, E., Andrianambintsoa, S., et Breton, J. Transmembrane orientation of  $\alpha$ -helices in the thylakoid membrane and in the light-harvesting complex. A polarized infrared spectroscopy study. Biochim. Biophys. Acta. 1984, 765, 380-387.

Nabedryk, E., Berger, G., Andrianambintsoa, S., et Breton, J. Comparison of alpha-helix orientation in the chromatophore, quantosome and reaction centre *Rhodopseudomonas viridis* by circular dichroism and polarized infrared spectroscopy. Biochim. Biophys. Acta. 1985, 809, 271-276.

- Nabedryk, E., Mantele, W., et Breton, J. FTIR  
Investigations on orientation of protein secondary  
structures and primary reactions in photosynthesis.  
Techniques and new developments in photosynthesis research  
(Barber, J., et Malkin, R. eds.) 1989, 17-34.
- Nabedryk, E., Leonhard, M., Mantele, W., et Breton, J.  
Fourier transform infrared difference spectroscopy shows  
no evidence for an enolization of chlorophyll a upon  
cation formation either in vitro or during P700  
photooxidation. Biochemistry 1990a, 29, 3242-3247.
- Nabedryk, E., Leonhard, M., Mantele, W., et Breton, J.  
Characterization of P700 by FTIR difference spectroscopy.  
Current Research in Photosynthesis (Baltscheffsky, M.  
ed.) 1990b, II, 599-606.
- Nabedryk, E., Bagley, K.A., Thibodeau, D.L., Bauscher, M.,  
Mantele, W., et Breton, J. A protein conformational  
change associated with the photoreduction of the primary  
and secondary quinones in the bacterial reaction center.  
FEBS Lett. 1990c, 266, 59-62.
- Nakanishi, K., et Solomon, P.H. Infrared absorption  
spectroscopy. 1977, 1-281.
- Nakatani, S., et Shin, M. The reconstituted NADP  
photoreducing system by rebinding of the large form of  
ferredoxin-NADP reductase to depleted thylakoid  
membranes. Arch. Biochem. Biophys. 1991, 291, 390-394.

- Naruse, M., Hashimoto, H., Kuki, M., et Koyama, Y. Triplet excitation of precursors of spirilloxanthin boud of the chromatophores of *Rhodospirillum rubrum* as detected by transient Raman spectroscopy. J. Mol. Struct. 1991, 242, 15-26.
- Neale, P.J., et Melis, A. Dynamics of photosystem II heterogeneity during photoinhibition: depletion of PSII<sub>B</sub> from non-appressed thylakoids during strong-irradiance exposure of *Chlamydomonas reinhardtii*. Biochim. Biophys. Acta. 1991, 1056, 195-203.
- Nechushtai, R. et Nelson, N. Purification properties and biogenesis of *Chlamydomonas reinhardtii* photosystem I reaction center. J. Biol. Chem. 1981a, 256, 11624-11628.
- Nechushtai, R., Nelson, N., Mattoo, A.K., et Edelman, M. Site of synthesis of subunits to photosystem I reaction center and the proton-ATPase in *Spirodesla*. FEBS Lett. 1981, 125, 115-119.
- Nechushtai, R., Peterson, C.C., Peter, G.F., et Thornber, J.P. Purification and characterization of a light-harvesting chlorophyll-a/b-protein of photosystem I of *Lemna gibba*. Eur. J. Biochem. 1987, 164, 345-350.
- Noguchi, T., Ono, T., et Inoue, Y. Detection of structural changes upon S<sub>1</sub>-to S<sub>2</sub> transition in the oxygen-evolving manganese cluster in photosystem II by light-induced Fourier transform infrared difference spectroscopy. Biochemistry, 1992, 31, 5953-5956.

- Nolan, W.G., Hopkins, H.P., et Kalini, S.A.M. Differential scanning calorimetric investigation of pea chloroplast thylakoids and thylakoid fractions. Arch. Biochem. Biophys. 1992, 297, 19-27.
- Norris, J.R., Uphaus, R.A., Crespi, H.G., et Katz, J.J. Proc Natl. Acad. Sci. 1971, 68, 625-629.
- Norris, J.R., Scheer, H., Druyen, M.E., et Katz, J.J. Proc. Natl. Acad. Sci. 1974, 71, 4897-4900.
- Nuijs, A.M., van Grondelle, R., Joppe, H.L.P., van Bochove, A.C., et Duysens, L.N.M. Singlet and triplet excited carotenoid and antenna bacteriochlorophyll of the photosynthetic purple bacteria *Rhodospirillum rubrum* as studies by picosecond absorption difference spectroscopy. Biochim. Biophys. Acta. 1985, 810, 94-105.
- Nurmi, A.H. Alteration of thylakoid membrane structure in *Brassica rapa* ssp. *oleifera* during ageing in high and low light. Plant Cell Env. 1990, 13, 305-317.
- Nyhus, K.J.; Ikeuchi, M.; Inoue, Y.; Withmarsh, J.; et Pakrasi, H.B. Purification and characterization of the photosystem I complex from the filamentous cyanobactrium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. J. Biol. Chem., 1992, 267, 12489-12495.
- Ohyama, K., Fukuzawa, H., Kohchi, H., Shirai, H., Sana, T., Sano, S., Umesono, K., Shiki, Y., Takeuchi, M., Chang, Z., Aota, S.-I., Inokuchi, H., et Ozeki, H. Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. Nature 1986, 322, 572-574.

Oh-oka, H., Takahashi, Y., Matsubara, H., et Itoh, S. EPR studies of the 9 kDa polypeptide with an iron-sulfur cluster(s) isolated from photosystem I complex by n-butanol extraction. FEBS Letters 1988, 234, 291-294.

Oh-oka, H., Takahashi, Y., et Matsubara, H. The 9-kDa polypeptide with iron-sulfur centers A/B in spinach photosystem I with special reference to its structure and topographic consideration in thylakoid membrane. Bioenergetics. (Kim, C.H. et Ozawa, T. ed.) 1990, 261-270

Oh-oka, H., Itoh, S., Saeki, K., Takahashi, Y., et Matsubara, H.  $F_A/F_B$  protein from the spinach photosystem I complex: Isolation in a native state and some properties of the iron-sulfur clusters. Plant Cell Physiol. 1991, 32, 11-17.

Okkels, J.S., Jepsen, L.B., Honberg, L.S., Lehmbeck, J., Scheller, H.V., Brandt, P., Hoyer-Hansen, G., Stummann, B., Henningsen, K.W., von Wettstein, D., et Moller, B.L. A cDNA clone encoding a 10.8 kDa photosystem I polypeptide of barley. FEBS Lett. 1988, 237, 108-112.

Okkels, J.S., Scheller, H.V., Svendsen, I., et Moller, B.L. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding an 18-kDa hydrophobic photosystem I subunit (PSI-L) from barley (*Hordeum vulgare* L.). J. Biol. Chem. 1991, 266, 6767-6773.

Okkels, J.S., Nielson V.S., Scheller, H.V., et Moller, B.L. A cDNA clone from barley encoding the precursor from the photosystem I polypeptide PSI-G: sequence similarity to PSI-K. Plant Mol. Biol., 1992, 18, 989-994.

O'Malley, P.J., et Babcock, G.T. Electron nuclear double resonance evidence supporting a monomeric nature for P700<sup>+</sup> in spinach chloroplasts. Proc. Natl. Acad. Sci. 1984, 81, 1098-1101.

Ort, D., Martino, S. Wise, R.R., Kent, J., et Cooper, P. Changes in protein synthesis induced by chilling and their influence on the chilling sensitivity of photosynthesis. Plant Physiol. Biochem. 1989, 27, 785-793.

Ortiz, W., Lam, E., Ghirardi, M., et Malkin, R. Antenna function of a chlorophyll a/b protein complex of photosystem I. Biochim. Biophys. Acta 1984, 766, 505-509.

Owens, T.G., Webb, S.P., Mets, L., Alberte, R.S., et Fleming, G.R. Antenna size dependence of fluorescence decay in the core antenna of photosystem I: estimated of charge separation and transfer rates. Proc. Natl. Acad. Sci. 1987, 84, 1532-1536.

Owens, T.G., Webb, S.P., Alberte, R.S., Metz, L., et Fleming, G.R. Antenna structure and excitation dynamics in photosystem I: studies of detergent-isolated photosystem I preparation using time-resolved fluorescence analysis. Biophys. J. 1988, 53, 733-745.

Owens, T.G., Shreve, A.P., et Albrecht, A.C. Dynamics and mechanism of singlet energy transfer between carotenoids and chlorophylls: light harvesting and non-photochemical fluorescence quenching. Research in Photosynthesis Vol.I (Murata, N., Ed.) 1992, 179-186.

Palace, G.P., Franke, J.E., et Warden, J.T. Is phylloquinone an obligate electron carrier in photosystem I ? FEBS Lett. 1987, 215, 58-62.

Parret, K.P., Mehari, T., Warren, P., et Golbeck, J.H. Purification and properties of the intact P-700 and F<sub>x</sub>-containing photosystem I core protein. Biochim. Biophys. Acta. 1989, 973, 324-332.

Parret, K.G., Mehari, T., et Golbeck, J.H. Resolution and reconstitution of the cyanobacterial photosystem I complex. Biochim. Biophys. Acta. 1990, 1015, 341-352.

Pearlstein, R.M. Exciton migration and trapping in photosynthesis. Photochem. Photobiol. 1982, 35, 835-844.

Pepkowitz, L.P. The stability of carotene in acetone and petroleum ether extracts of green vegetables. J. Biol. Chem. 1943, 149, 465-471.

Peterson, J., Stenlik, D., Gast, P., et Thurnauer, M. Photosysth. Res. 1987, 14, 15-29.

Peto, R., Doll, R., Buckley, J.D., et Sporn, M.B. Nature 1981, 290, 201.

Phillipson, K.P., Satoh, V.L., et Sauer, K. Biochemistry 1972, 11, 4591-4594.

Picorel, R., Holt, R.E., Cotton, M., et Seibert Surface-enhanced resonance Raman scattering spectroscopy of bacterial photosynthetic membranes: the carotenoid of *Rhodospirillum rubrum*. J. Biol. Chem. 1988, 263, 4374-4380.

- Picorel, R., Bakhtiari, M., Lu, T., Cotton, T.M., et Seibert, M. Surface-enhanced resonance Raman scattering spectroscopy as a surface topography probe in plant photosynthetic membranes. Photochem. Photobiol. 1992, 56, 263-270.
- Plumley, F.G., et Schmidt, G.W. Reconstitution of chlorophyll a/b light-harvesting complexes: xanthophyll-dependent assembly and energy transfer. Proc. Natl. Acad. Sci. 1987, 84, 146-150.
- Plumley, F.G., Martinson, T.A., Herrin, D.L., Ikeuchi, M., et Schmidt, G.W. Structural relationships of the photosystem I and photosystem II chlorophyll a/b and a/c light-harvesting apoproteins of plants and algae. Photochem. Photobiol. 1993, 57, 143-151.
- Porra, R.J., Thompson, W.A., et Kriedemann, P.E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equation for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. Biochim. Biophys. Acta. 1989, 975, 384-394.
- Powell, J.R., Wasacz, F.M., et Jakobsen, R.J. An algorithm for the reproducible spectral absorption of water from FT-IR spectra of proteins in dilute solutions and absorbed monolayers. Appl. Spectroscopy 1986, 40, 339-344.
- Powles, S.B. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. Ann. Rev. Plant Physiol. 1984, 35, 15-44.

Preiss, S., Peter, G.F., Anandan, S., et Thornber, J.P.  
The multitude pigment-proteins of the photosystem I  
antenna. Photochem. Photobiol. 1993, 57, 152-157.

Purcell, M., et Carpentier, R. Homogeneous photobleaching  
of chlorophyll holochromes in a photosystem I reaction  
center complex. Photochem. Photobiol. 1993, (sous  
presse).

Ratajczak, R., Mitchell, R., et Haehnel, W. Properties of  
the oxidizing site of photosystem I. Biochim. Biophys.  
Acta. 1988, 933, 306-318.

Reilly, P., et Neilson, N. Photosystem I complex.  
Photosynth. Res. 1988, 19, 73-84.

de las Rivas, J., Abadia, A., et Abadia, J. A new reversed  
phase-HPLC method resolving all major higher plant  
photosynthetic pigments. Plant Physiol. 1989, 91, 190-  
192.

de las Rivas, J., Telfer, A., et Barber, J. Two coupled  $\beta$ -  
carotene molecules protect P680 from photodamage in  
isolated photosystem II reaction centres. Biochim.  
Biophys. Acta. 1993, 1142, 155-164.

Rodermel, S.R., et Bogorad, L. Maize plastid photogenes:  
mapping and photoregulation of transcript levels during  
light-induced development. J. Cell. Biol. 1985, 100, 463-  
476.

Rogner, M., Nixon, P.J., et Diner, B.A. Purification and characterization of photosystem I and photosystem II core complexes from wild-type and phycocyanin-deficient strains of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *J.Biol. Chem.* 1990, 265, 6189-6196.

Ruban, A.V., et Trach, V.V. Heat-induced reversible changes in photosystem I absorption cross-section of pea chloroplasts and sub-chloroplast preparations. Evidence from excitation fluorescence spectra. *Photosynth. Res.* 1991, 29, 157-169.

Ruegg, M., Metzger, V., et Susi, H. Computer analysis of characteristic infrared bands globular proteins. *Biopolymers*, 1975, 14, 1465-1471.

Rutherford, A.W. et Sétif, P. Orientation of P700, the primary, electron donor of photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta.* 1990, 1019, 128-132.

Sagar, A.D., et Briggs, W.R. Effects of high light stress on carotenoid-deficient chloroplasts in *Pisum sativum*. *Plant Physiol.* 1990, 94, 1663-1670.

Sakurai, H., Inoue, K., Fujii, T., et Mathis, P. Effects of selective destruction of iron-sulfur center B on electron transfer and charge recombination in photosystem I. *Photosynth. Res.* 1991, 27, 65-71.

Salisbury, F.B., et Ross, C.W. Plant physiology. 4<sup>th</sup> Ed. 1992.

Sandmann, G., Kuhn, M., et Boger, P. Carotenoids in photosynthesis: protection of D1 degradation in the light. Photosynth. Res. 1993, 35, 185-190.

Santarius, K.A. Site of heat sensitivity on chloroplasts and differential inactivation of cyclic and non-cyclic photophosphorylation by heat. J. Therm. Biol. 1975, 1, 101-107.

Santarius, K.A. Freezing of isolated thylakoid membranes in complex media. VI. The effect of pH. Cryobiol. 1990, 27, 547-561.

Santarius, K.A. Freezing of isolated thylakoid membranes in complex media. VII. The effect of bovine serum albumin. Biochem. Physiol. Planzen 1991, 187, 149-162.

Santarius, K.A. Freezing of isolated thylakoid membranes in complex media. VIII. Differential cryoprotection by sucrose, proline and glycerol. Physiol. Plant. 1992, 84, 87-93.

Satoh, K. Mechanism of photoinactivation in photosynthetic systems. I. The dark reaction of photoinactivation. Plant Cell Physiol. 1970a, 11, 15-27.

Satoh, K. Mechanism of photoinactivation in photosynthetic systems II. The occurrence and properties of two different types of photoinactivation. Plant Cell Physiol. 1970b, 11, 29-38.

Satoh, K. Mechanism of photoinactivation in photosynthesis systems. III. Site and mode of photoinactivation in photosystem I. Plant Cell Physiol. 1970c, 11, 187-197.

Sauer, K., et Calvin, M. Absorption spectra of spinach quantasomes and bleaching of the pigments. Biochim. Biophys. Acta. 1962, 64, 324-326.

Sauer, K. Photosynthesis. The light reaction. Ann. Rev. Phys. Chem. 1979, 30, 155-178.

Schantz, R., et Bogorad, L. Maize chloroplast genes ndhD, ndhE, and psaC. Sequence, transcripts and transcript pools. Plant Mol. Biol. 1988, 11, 239-247.

Scheller, H.V., Hoj, P.B., Svendsen, I., et Moller, B.L. Partial amino acid sequences of two nuclear-encoded photosystem I polypeptides from barley. Biochem. Biophys. Acta. 1988, 933, 501-505.

Scheller, H.V., Svendsen, I., et Moller, B.L. Subunit composition of photosystem I and identification of center X as a [4Fe-4S] cluster. J. Biol. Chem. 1989a, 264, 6929-6934.

Scheller, H.V., Svendsen, I., et Moller, B.L. Amino acid sequence of the 9-kDa iron-sulfur protein of photosystem I in barley. Carlsberg Res. Commun. 1989b, 54, 11-15.

Scheller, H.V., et Moller, B.L. Photosystem I polypeptides. Physiol. Plant. 1990, 78, 484-494.

Schoeder, H.-U., et Lauckau, W. Phylloquinone copurified with large subunit of photosystem I. FEBS Lett. 1986, 199, 23-27.

Schrafferricht, H., et Junge, W. Analysis of the complex band spectrum of P700 based on photoselection studies with photosystem I particles. Photochem. Photobiol. 1981, 34, 223-232.

Searle, G.F.W., et Schaafsma, T.J. Fluorescence detected magnetic resonance of the primary donor and inner core antenna chlorophyll in photosystem I reaction centre protein: sign inversion and energy transfer. Photosynth. Res., 1992, 32, 193-206.

Senge, M.O. Recent advances in the biosynthesis and chemistry of the chlorophylls. Photochem. Photobiol. 1993, 57, 189-206.

Senger, H., et Straßberger, G. Development of photosystems in greening algae. Chloroplast development (G. Akoyunoglou Ed.) 1978, 367-378.

Sétif, P., Ikegami, I. et Biggins, J. Light-induced charge separation in photosystem I at low temperature is not influence by vitamin K-1. Biochim. Biophys. Acta. 1987, 894, 146-156.

Shin, M., et Shimizu, T. Preparation of photosystem I particles from spinach by column chromatography. Photosynth. Res. 1988, 15, 85-90.

Shiozawa, J., Alberte, R.S., et Thornber, J.P. The P700-chlorophyll a-protein. Isolation and some characteristics of the complex in higher plants. Arch. Biochem. Biophys. 1974, 165, 388-397.

Shiozawa, J. The P700-chlorophyll a-protein of higher plants. Methods Enzymol. 1980, 69, 142-149.

Shipman, L.L. A theoretical study of excitons in chlorophyll a photosystems on a picosecond timescale. Photochem. Photobiol. 1980, 31, 157-167.

Shiraki, M., Yoshiura, M., et Iriyama, K. Rapid and easy separation of chlorophylls, their derivatives, and plant yellow pigments by thin-layer chromatography. Chemistry Lett. 1978, 103-104.

Shreve, A.P., Trautman, J.K., Frank, H.A., Owens, T.G., et Albrecht, A.C. Femtosecond energy-transfer processes in the B800-850 light-harvesting complex of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. Biochim. Biophys. Acta. 1991, 1058, 280-288.

Shubin, V.V., Karapetyan, N.V., et Krasnovskii, A.A. Molecular arrangement of pigment-protein complex of photosystem I. Photosynth. Res. 1986, 9, 3-12.

Shuvalov, V.A., Klevanik, A.V., Sharkov, A.V., Kryukov, P.G., et Ke, B. Picosecond spectroscopy of photosystem I reaction centers. FEBS Lett. 1979, 107, 313-316.

Sieckmann, I., van der Est, A., Bottin, H., Sétif, P., et Stehik, D. Nanosecond electron transfer kinetics in photosystem I following substitution of quinone for vitamin K<sub>1</sub> as studied by time resolved EPR. FEBS Lett. 1991, 284, 98-102.

Siefermann-Harms, D. The xanthophyll cycle in higher plants. Lipids and lipid polymer in higher plants. (Tevini, M. et Lichtenthaler, H.K. eds.) 1977, 218-230.

Siefermann-Harms, D. Carotenoids in photosynthesis. I. Location in photosynthetic membranes and light-harvesting function. Biochim. Biophys. Acta. 1985, 811, 325-355.

Siefermann-Harms, D. The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. Physiol. Plant. 1987, 69, 561-568.

Siefermann-Harms, D. High-performance liquid chromatography of the chloroplast pigments. One-step separation of carotene and xanthophyll isomers, chlorophylls and pheophytins. J. Chromato. 1988, 448, 411-416.

Siefermann-Harms, D. Protective function of the apoprotein of the light-harvesting chlorophyll-a/b-protein complex in pigment photo-oxidation. J. Photochem. Photobiol. 1990, 4, 283-295.

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

Sistrom, W.R., Griffiths, M., et Stanier, R.Y. The biology of photosynthetic bacterium which lacks colored carotenoids. J. Cell. Comp. Physiol. 1956, 48, 473-515.

Smith, E.L., et Pickels, E.G. The effect of detergents on the chlorophyll-protein compound of spinach as studied in the ultracentrifuge. J. Gen. Physiol. 1941, 24, 753-764.

Smith, K.A., Ardelt, B.K., Huner, N.P.A., Krol, M., Myscich, E., et Low, P.S. Identification and partial characterization of the denaturation transition of the light harvesting complex II of spinach chloroplast membranes. Plant Physiol. 1989, 90, 492-499.

Snyder, R., Arvidson, E., Foote, C., Harrigan, L., et Christensen, R.L. Electronic energy levels in long polyenes:  $S_2 \rightarrow S_0$  emission in all-trans-1,3,5,7,9,11,13-tetradecaheptaene. J. Am. Chem. Soc. 1985, 107, 4117-4122.

Snyder, S.W., Rustandi, R.R., Biggins, J., Norris, J.R., et Thurnauer, M.C. Direct assignment of vitamin  $K_1$  as the secondary acceptor  $A_1$  in photosystem I. Proc. Natl. Acad. Sci. 1991, 88, 9895-9896.

Sonoike, K., Hatanaka, H., Katoh, S., et Itoh, S. Heat-stability of iron-sulfur centers and P-700 in photosystem I reaction center complexes isolated from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. Plant cell Physiol. 1990, 31, 865-870.

Sonoike, K., et Katoh, S. Variation and estimation of the differential absorption coefficient of P-700 in spinach photosystem I preparations. Plant Cell Physiol. 1990, 31, 1079-1082.

Steppuhn, J., Hermans, J., Nechushtai, R., LJungberg, U., Thümmler, F., Lottspeich, F., et Herrmann, R.G. Nucleotide sequence of cDNA clones encoding the entire precursor polypeptides for subunits IV and V of the photosystem I reaction center from spinach. FEBS Lett. 1988, 237, 218-224.

- Sundby, C., et Anderson, B. Temperature-induced reversible migration along the thylakoid membrane of photosystem II regulates its association with LHC-II. FEBS Lett. 1985, 191, 24-28.
- Sundström, V., et Van Grondelle, R. Ultrafast dynamics of excitation energy transfer and trapping in Bchl a and Bchl b-containing photosynthetic bacteria. J. Photochem. Photobiol. 1992, 15, 141-150.
- Surewicz, W.K., et Matsch, H.H. New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra. Biochim. Biophys. Acta. 1988, 952, 115-130.
- Susi, H., et Byler, D.M. Protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy: second-derivative spectra. Biochem. Biophys. Res. Comm. 1983, 115, 391-397.
- Susi, H., et Byler, D.M. Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy enzymes. Methods Enzymol. 1986, 130, 290-311.
- Svensson, P., Andreasson, E., et Albertsson, P.-A. Heterogeneity among photosystem I. Biochim. Biophys. Acta. 1991, 1060, 45-50.
- Tadros, M.H., Garcia, A.F., Gad'on, N., et Drews, G. Characterization of a pseudo-B870 light-harvesting complex isolated from mutant strain Ala<sup>+</sup> Pho<sup>-</sup> of *Rhodobacter capsulatus* which contains B800-850-type polypeptides. Biochim. Biophys. Acta. 1989, 976, 161-167.

Tajmir-Riahi, H.-A. A comparative study of adenylic, guanylic and deoxyguanylic acids and their sodium salts as solids and in solution: structural information and conformational features. Biochim. Biophys. Acta. 1989, 1009, 168-176.

Tajmir-Riahi, H.-A. Interaction of adenyl acid alkaline earth metal ions in the crystalline solid and aqueous solution. Evidence for sugar C'2-endo/anti, C'3-endo/anti and C'4- exo/anti conformation changes. Biochim. Biophys. Acta. 1990, 1087, 49-54.

Takabe, T., Iwasaki, Y., Hibino, T., et Ando, T. Subunit composition of photosystem I that catalyzes light-dependent transfer of electrons from plactocyanin to ferredoxin. J. Biochem. 1991, 110, 622-627.

Takahashi, M., et Asada, K. Superoxide production in aprotic interior of chroplast thylakoids. Arch. Biochem. Biophys. 1988, 267, 714-722.

Takaichi, S., Gardiner, A.T., et Cogdell, R.J. Pigment composition of light-harvesting pigment-protein complexes from *Rhodopseudomonas acidophila*: effect of light intensity. Research in Photosynthesis Vol I (Murata, N. Ed.) 1992, 149-152.

Tanfani, F., Ambrosini, A., Albertini, G., Bertoli, E., Curatola, G., et Zolese, G. Interaction of the herbicide atrazine with model membranes. I. Physico-chemical studies on dipalmitoyl phophatidylcholine liposomes. Chem. Phys. lipids 1990, 55, 179-189.

Tapie, P., Choquet, Y., Breton, J., Delepelaire, P., et Wollman, F.A. Orientation of photosystem-I pigments. Investigation by low-temperature linear dichroism and polarized fluorescence emission. Biochim. Biophys. Acta. 1984, 767, 57-69.

Telfer, A., He, W.-Z., et Barber, J. Spectral resolution of more than one chlorophyll electron donor in the isolated photosystem II reaction center complex. Biochim. Biophys. Acta. 1990, 1017, 143-151.

Telfer, A., De La Rivas, J., et Barber, J.  $\beta$ -carotene within the isolated photosystem II reaction centre: photooxidation and irreversible bleaching of this chromophore by oxidised P680. Biochim. Biophys. Acta. 1991, 1060, 106-114.

Thayer, S.S., et Björkman, O. Carotenoid distribution and deepoxidation in thylakoid pigment-protein complexes from cotton leaves and bundle-sheath cells of maize. Photosynth. Res. 1992, 33, 213-225.

Thibodeau, D.L., Nabedryk, E., Hienerwadel, R., Lenz, F., Mantele, W., et Breton, J. Time-resolved FTIR spectroscopy of quinones in *Rb. sphaeroides* reaction centers. Biochim. Biophys. Acta. 1990, 1020, 253-259.

Thomas, J.B., et Nijhuis, H.H. Relative stability of chlorophyll complexes *in vivo*. Biochim. Biophys. Acta. 1968, 153, 868-877.

- Thomas, J.B., Bollen, M.H.M., et Klijn, W.J.  
Photobleaching and dark-bleaching of *Euglena gracilis* chloroplasts fragments. Acta. Bot. Neerl. 1976, 25, 361-369.
- Thomas, P.G., Quinn, P.J., et Williams, W.P. The origin of photosystem-I-mediated electron transport stimulation in heat-stressed chloroplasts. Planta 1986, 167, 133-139.
- Thornber, J.P. Chlorophyll-proteins: light-harvesting and reaction center components of plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 1975, 26, 127-158.
- Thornber, J.P., Markwell, J.P., et Reinman, S. Plant chlorophyll-protein complexes, recent advances. Photochem. Photobiol. 1979, 29, 1205-1216.
- Thornber, J.P., Peter, G.F., Morishige, D.T., Gomez, S., Anandan, S., Welty, B.A., Lee, A., Kerfeld, C., Takeuchi, T., et Preiss, S. Light harvesting in photosystem I and II. Photosynthesis and photosynthetic membrane systems. 1993, 21, 15-18.
- Trautman, J.K., Shreve, A.P., Violette, C.A., Frank, H.A., Owens, T.G., et Albrecht, A.C. Femtosecond dynamics of energy-transfer processes in the B800-850 light-harvesting complexes of *Rhodobacter sphaeroides*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990, 87, 215-219.
- Turconi, S., Schweitzer, G., et Holzwarth, A.R. Temperature dependence of picosecond fluorescence kinetics of a cyanobacterial photosystem I particle. Photochem. Photobiol. 1993, 57, 113-119.

Tyystjarvi, E., Koivuniemi, A., Ketunen, R., et Aro, E.-M.  
Small Light-harvesting antenna does not protect from  
photoinhibition. Plant Physiol. 1991, 97, 477-483.

Vainstein, A., Peterson, C.C., et Thornber, J.P. Light-  
harvesting pigment-proteins of photosystem I in maize.  
subunit composition and biogenesis. J. Biol. Chem. 1989,  
264, 4058-4063.

Valkunas, L., van Mourik, F., et van Grondelle, R. On the  
role of spectral and spatial antenna inhomogeneity in the  
process of excitation energy trapping in photosynthesis.  
J. Photochem. Photobiol. 1992, 15, 159-170.

Vierling, E., et Alberte, R.A. P700 chlorophyll a-protein.  
Purification, characterization and antibody preparation.  
Plant Physiol. 1983, 72, 625-633.

de Vitry, C., Wollman, F.A., et Delepelaire, P.  
Stoechiometric des polypeptides du thylakoïde chez  
*Chlamydomonas reinhardtii*. C. R. Acad. Sci. Paris. 1983,  
279, 277-280.

Wasielewski, M.R., Norris, J.R., Shipman, L.L., Lin, C.-P., et  
Svec, W.A. Monomeric chlorophyll a enol: evidence for  
its possible role as the primary donor in photosystem I  
of plant photosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. 1981,  
78, 2957-2961.

Wasielewski, M.R., Tiede, D.M., et Frank, H.A. Ultrafast electron and energy transfer in reaction center and antenna proteins from photosynthetic bacteria. Ultrafast phenomena V. Springer series in Chemical Physics Vol. 46 (G.R. Fleming and A.E. Siegman Eds.) 1986, 388-392.

Wasielewski, M.R., Fenton, J.M., et Govindjee The rate of formation of  $P700^+$ - $A_o^-$  in photosystem I particles from spinach as measured by picosecond transient absorption spectroscopy. Photosynth. Res. 1987, 12, 181-190.

Webber, A.N., et Malkin, R. Photosystem I reaction-centre proteins contain leucine zipper motifs. A proposed role in dimer formation. FEBS Lett. 1990, 264, 1-4.

Weber, N., et Strotmann, H. On the function of subunit PsaE in chloroplast photosystem I. Biochim. Biophys. Acta. 1993, 1143, 204-210.

Weist, S.C. Kinetic and proteolytic identification of heat-induced conformational changes in the urea herbicide binding site of isolated *Phaseolus vulgaris* chloroplast thylakoids. Physiol. Plant. 1986, 66, 527-535.

Werst, M., Jia, Y., Mets, L., et Fleming G.R. Energy transfer and trapping in the photosystem I core antenna. A temperature study. Biophys. J. 1992, 61, 868-878.

Whitmarsh, J., Bowyer, J.R., et Crofts, A.R. Modification of the apparent redox reaction between cytochrome f and the rieske iron sulfur protein. Biochim. Biophys. Acta. 1982, 682, 404-412.

Wieckowski, S., et Majewska, G. Chlorophyll photobleaching in thylakoid membranes isolated from cucumber cotyledons at various stages of greening. J. Plant Physiol. 1990, 136, 701-704.

Wilhelm, C., Kramer, P., et Lenartz-Weiler, I. The energy distribution between the photosystems and light-induced changes in the stoichiometry of system I and II reaction centers in the chlorophyll b-containing alga *Mantoniella squamata* (Prasinophyceae). Photosynth. Res. 1989, 20, 221-233.

Wood, P.M., et Bendall, D.S. Kinetics and specificity of electron transfer from cytochromes and copper proteins to P-700. Biochim. Biophys. Acta. 1975, 387, 115-128.

Wood, P.M. The role of c-type cytochrome in algal photosynthesis. Extraction from algal of a cytochrome similar to higher plant cytochrome f. Eur. J. Biochem. 1977, 72, 605-612.

Wood, P.M. Interchangeable copper and iron proteins in algal photosynthesis. Studies on plastocyanin and cytochrome c-552 in Chlamydomonas. Eur. J. Biochem. 1978, 87, 9-19.

Wrobel, D., et Hendrich, W. Orientation and thermal deactivation of pigments in thylakoid membranes lacking the light-harvesting complexes. J. Photochem. Photobiol. 1991, 9, 61-73.

Wynn, R.M., et Malkin, R. Interaction of plastocyanin with photosystem I: A chemical cross-linking study of the polypeptide that binds plastocyanin. Biochemistry 1988, 27, 5863-5869.

Wynn, R.M., Luong, C., et Malkin, R. Maize photosystem I. Identification of the subunit which binds plastocyanin. Plant Physiol. 1989, 91, 445-449.

Yamamoto, H.Y. Biochemistry of the violaxanthin cycle in higher plants. Pure Appl. Chem. 1979, 51, 639-648.

Yang, W.-J., Griffiths, P.R., Byler, D.M., et Sisi, H. Protein conformation by infrared spectroscopy: resolution enhancement by Fourier self-deconvolution. Appl. Spectrosc. 1985, 39, 282-287.

Young, A.J. The protective role of carotenoids in higher plants. Plant Physiol. 1991, 83, 702-708.

Zhao, J., Li, N., Warren, P.V., Golbeck, J.H., et Bryant, D.A. Site-directed conversion of a cysteine to aspartate leads to the assembly of a [3Fe-4S] cluster in PsaC of photosystem I. The photoreduction of F<sub>A</sub> is independent of F<sub>B</sub>. Biochemistry, 1992, 31, 5093-5099.

Ziegler, K., Lockau, W., et Nitschke, W. Bound electron acceptors of photosystem I. Evidence against the identity of redox center A<sub>1</sub> with phylloquinone. FEBS Lett. 1987, 217, 16-20.

Zilber, A., Wynn, R.M., Webber, A., et Malkin, R. Organization of PSI subunits in thylakoid membranes. Current Research in Photosynthesis (Baltscheffsky M. ed.) 1990, II, 575-578.

Zilber, A.L., et Malkin, R. Organization and topology of photosystem I subunits. Plant Physiol., 1992, 99, 901-911.

Zurdo, J., Fernandez-Cabrera, C., et Ramirez, J.M. A structural role of the carotenoid in the light-harvesting II protein of *Rhodobacter capsulatus*. Biochem. J. 1993, 290, 531-537.