

## TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>iii</b>
<b>AVANT-PROPOS .....</b>	<b>v</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>xiv</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES .....</b>	<b>xvi</b>
<b>CHAPITRE I</b>	
<b>INTRODUCTON .....</b>	<b>1</b>
1.1 La phoosynthèse .....	1
1.1.1 Les chloroplastes.....	2
1.1.2 Lumière et pigments photosynthétiques .....	3
1.1.2.1 Les centres réactionnels.....	5
1.1.2.2 La chlorophylle a ( <i>Chl a</i> ).....	6
1.1.3 Le photosystème II (PSII).....	6
1.1.4 Le photosystème I (PSI) .....	8
1.1.5 Les voies de dissipation d'énergie .....	9
1.1.5.1 Dissipation d'énergie sous forme de fluorescence .....	10
1.1.5.2 Dissipation d'énergie sous forme de phosphorescence.....	12
1.1.5.3 Dissipation d'énergie sous forme de chaleur .....	13
1.1.5.4 Dissipation d'énergie par transfert d'électrons .....	14
1.2 Aspects environnementaux.....	17
1.2.1 Pollution des sols .....	18
1.2.2 Les métaux lourds.....	19
1.2.2.1 Effets des métaux lourds sur les plantes .....	20
1.2.2.2 Effets des métaux lourds sur les protéines.....	21
1.2.2.3 Le plomb (Pb) .....	22
1.3 Les albumines .....	27
1.3.1 L'albumine du sérum humain (HSA).....	27

1.3.2	L'albumine sérum bovin (BSA) .....	28
1.4	Problématiques et objectifs du sujet .....	28
<b>CHAPITRE II</b>		
<b>MÉTHODES EXPÉRIMENTALES .....</b>		<b>32</b>
2.1	Matériel utilisé.....	32
2.2	Isolation des membranes de thylakoïdes .....	32
2.3	Isolation des membranes enrichies en PSI.....	33
2.4	Préparations des albumines.....	33
2.5	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) .....	34
2.5.1	FTIR pour les albumines.....	35
2.5.2	FTIR pour les membranes de PSI .....	36
2.5.3	Analyse de la structure secondaire par FTIR.....	36
2.6	Spectroscopie de dichroïsme circulaire (CD) .....	37
2.7	Mesure de consommation d'oxygène .....	38
2.8	Mesure des spectres de fluorescence .....	40
2.9	Mesure d'induction de fluorescence (IF).....	41
2.10	Cinétique de déclin de fluorescence induite par flash .....	42
2.11	Mesure de thermoluminescence (TL) .....	43
2.12	Mesure des changements d'absorption à 830 nm .....	44
2.13	La spectroscopie des photoélectrons X (XPS).....	45
2.13.1	Principe .....	45
2.13.2	Appareillage.....	46
<b>CHAPITRE III</b>		
<b>LOCATING THE BINDING SITES OF PB (II) ION WITH HUMAN AND BOVINE SERUM ALBUMIN .....</b>		<b>48</b>
3.1	Résumé .....	49
3.2	Premier article scientifique .....	50
	Abstract.....	51
	Introduction.....	52
	Materials and Methods .....	53
	Materials .....	53
	Preparation of stock solutions.....	54

FTIR spectroscopic measurements .....	54
Analysis of protein conformation .....	54
Circular dichroism .....	55
Fluorescence spectroscopy .....	55
X-ray photoelectron spectroscopy .....	57
Results and Discussion .....	58
FTIR and CD spectra of Pb complexes with HSA and BSA .....	58
CD spectra.....	59
Fluorescence spectra and stability of Pb complexes with HSA and BSA.....	60
XPS studies and Pb-protein binding sites .....	61
Conclusion .....	62
Acknowledgments .....	62
References.....	63
Captions for Figures .....	67

#### **CHAPITRE IV**

#### **INHIBITION OF THE WATER OXIDIZING COMPLEX OF PHOTOSYSTEM II AND THE REOXIDATION OF THE QUINONE ACCEPTOR QA- BY $Pb^{2+}$ .....**

80

4.1 Résumé .....	81
4.2 Deuxième article scientifique .....	82
Abstract.....	83
Introduction.....	84
Material and methods .....	86
Thylakoid membranes isolation.....	86
Chlorophyll fluorescence induction.....	86
Thermoluminescence .....	86
Fluorescence measurements .....	87
Flash-induced fluorescence decay kinetics.....	87
Results .....	88
Chlorophyll fluorescence induction.....	88
Fluorescence of Chl a and MgTPP .....	89

Chlorophyll fluorescence induction parameters .....	89
Flash-induced Chl fluorescence decay kinetics .....	90
Thermoluminescence .....	91
Discussion.....	92
References.....	95
Figure legends.....	102

<b>CHAPITRE V</b>	
<b>ALTERATION OF THE STRUCTURE AND FUNCTION OF</b>	
<b>PHOTOSYSTEM I BY PB2+ .....</b>	<b>110</b>
5.1 Résumé .....	111
5.2 Troisième article scientifique .....	112
Abstract.....	113
Introduction.....	114
Materials and methods.....	115
Isolation of PSI submembrane fractions.....	115
FTIR spectroscopic measurements .....	116
Analysis of protein conformation .....	116
X-ray photoelectron spectroscopy .....	117
Fluorescence spectroscopy .....	118
Oxygen uptake measurements .....	118
Redox state of P700 .....	118
Results .....	119
XPS studies .....	119
FTIR spectroscopy.....	120
Fluorescence spectroscopy .....	121
Oxygen uptake .....	122
Redox state of P700 .....	122
Discussion.....	123
References.....	126
Captions for Figures .....	131

<b>CHAPITRE VI</b>	
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>139</b>
6.1 Étude des interactions entre les albumines et le plomb (Pb) .....	140
6.2 Étude de l'effet toxique du Pb sur le photosystème II.....	144
6.3 Étude de l'effet toxique du Pb sur le photosystème I (PSI).....	149
6.4 Perspectives .....	153
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>155</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau</b>		<b>Page</b>
1.1	Principaux minéraux et composés de plomb (BRGM, 2004).....	24
1.2	Profil d'émissions anthropiques de plomb dans l'atmosphère au Canada en 2009 d'après Santé Canada.....	26
2.1	Bandes des différents amides avec leur longueur d'onde et assignement en infrarouge.....	35

## LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	(A) Structure d'un chloroplaste. (A) Modélisation informatique (B-D) par microscopie électronique; (B) Partie d'une section « classique » mince d'un chloroplaste; (C) Côté stroma; (D) Disque du grana (d'après : Hooper, 1984; Mustárdy et Garab, 2003) .....	3
1.2	Représentation schématique de l'utilisation d'énergie lumineuse par les antennes collectrices de lumière .....	4
1.3	Chlorophylle a : à droite, structure de chlorophylle a développée avec Chem Draw; à gauche, son spectre d'absorption.....	6
1.4	Représentation de la structure du PSII et de ses principaux cofacteurs (d'après Ferreira et al. 2004).....	8
1.5	Structure et composition du complexe PSI-LHCI (adapté de Busch et Hippler, 2011).....	9
1.6	Voies de dissipation d'énergie de la chlorophylle excitée du PSII .....	10
1.7	Diagramme de Jablonski des principales voies de dissipation d'énergie lors de l'excitation d'une chlorophylle : la phosphorescence est encadrée en vert.....	12
1.8	Cycle des xanthophylles lors de la régulation de la dissipation d'énergie lumineuse. Les pH 7.0 et 5.0 sont les pH optimaux des enzymes zéaxanthine époxydase et violaxanthine dé-époxydase, respectivement (Niyogi et al. 1997).....	14
1.9	Représentation du transfert d'électrons (les flèches violettes) dans le photosystème II entre 1 : P680 et la phéophytine, 2 : la phéophytine et Q <sub>A</sub> , 3 : la tyrosine et P680, 4 : l'OEC et la tyrosine et 5 : Q <sub>A</sub> et Q <sub>B</sub> . (selon Rutherford et Boussac, 2004) .....	16
1.10	Modèle schématique de la chaîne de transfert d'électrons comprenant une représentation de l'organisation et de la structure des complexes protéiques. Source : Dr Nield. Schéma basé sur les travaux de Jordan et al. 2001; Stroebel et al. 2003; Ferreira et al. 2004; Liu et al. 2004; Amunts et al. 2007) .....	17
1.11	Sommet de la terre Rio 2012 .....	18

2.1	Électrode de Clark.....	39
2.2	Dispositif expérimental pour les mesures d'induction de fluorescence PEA ( <i>Plant Efficiency analyser</i> ), source lumineuse en mode <i>on</i> , porte-échantillon pour les feuilles et pour les liquides et un ordinateur exécutant un logiciel d'acquisition .....	42
2.3	Représentation schématique de l'analyse XPS .....	46
2.4	Dispositif expérimental de XPS.....	47



## LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

A0	Accepteur primaire d'électrons du photosystème I
A1	Accepteur secondaire d'électrons du photosystème I
ADP	Adénosine diphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
CDO	Complexe de dégagement d'oxygène
Chl	Chlorophylle
CP43	Antenne interne de 43 kDa
CP47	Antenne interne de 47 kDa
CR	Centre réactionnel
Cyt b6f	Cytochrome b6f
D1	La protéine de 32 kDa du centre réactionnel du photosystème II
D2	La protéine de 34 kDa du centre réactionnel du photosystème II
DCBQ	2,5 -dichloro benzoquinone
DCMU	3 -(3' ,4' -dichlorophényl)-1, 1 -diméthylurée
Ea	Énergie d'activation
F0	Niveau minimal de fluorescence
Fm	Niveau maximal de fluorescence
Fv	Fluorescence variable
Fd	Ferrédoxine
Fx	Complexe Fer-Soufre accepteur primaire du photosystème I
FQR	Ferrédoxine quinone réductase
FR	Rouge lointaine
BSA	Albumine sérique bovine

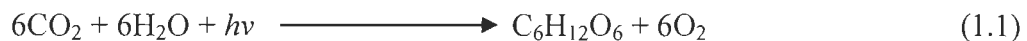
HSA	Albumine sérique humaine
IF	Induction de fluorescence
$K_{SV}$	Constante de Stern-Volmer
LED	Light emitting diode
LHC	Antenne photocollectrice de lumière
NADP+	Nicotine-amide dinucléotide NDH NADPH-déshydrogénase
NPQ	Quenching non-photochimique
P680	Donneur primaire d'électrons du photosystème II .
P700	Donneur primaire d'électrons du photosystème I
Pheo	Phéophytine, l'accepteur primaire d'électrons du photosystème II
PC	Plastocyanine
PQ	Plastoquinone (quinone oxydée)
PSI	Photosystème I
PSII	Photosystème II
QA	La quinone acceptrice primaire du photosystème II
QB	La quinone acceptrice secondaire du photosystème II
ROS	Espèces réactives d'oxygène
S0-S4	États redox du complexe de manganèse
TL	Thermoluminescence
TLE	Transport linéaire d'électrons
TCE	Transport cyclique d'électrons
YD	Donneur d'électron auxiliaire de P680, résidu Tyr160 de la protéine D2
YZ	Donneur d'électron principal de P680, résidu Tyr161 de la protéine D1

# CHAPITRE I

## INTRODUCTON

### 1.1 La photosynthèse

La photosynthèse est le plus important processus bioénergétique des organismes photosynthétiques (algues, plantes et certaines bactéries et cyanobactéries) capable de convertir l'énergie solaire en énergie chimique et matière organique (Balows et al. 1992; Van den Hoek et al. 1996). Le soleil a permis la croissance de la vie sur terre à travers ce processus, par une chaîne de réactions chimiques et enzymatiques étroitement interconnectées participant à la production d'énergie, à la fixation du carbone et à l'oxydation de l'eau (Blankenship, 2002).

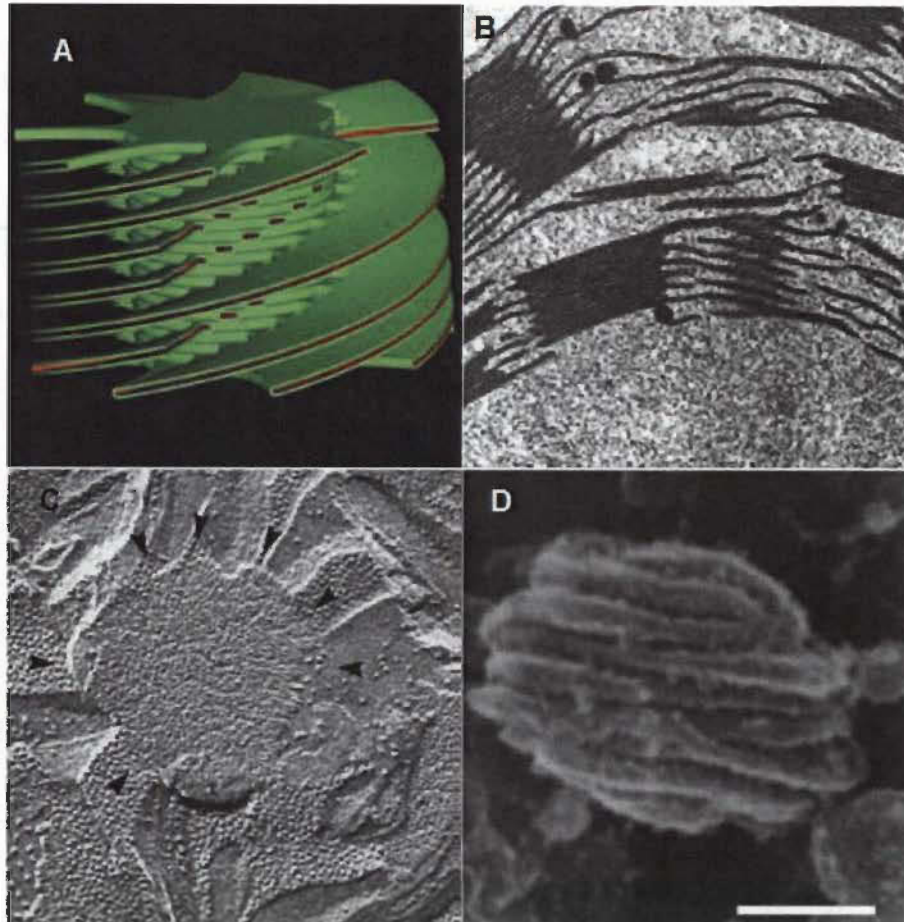


Deux phases caractérisent la photosynthèse oxygénique : (I) la phase lumineuse ou photochimique durant laquelle les photons de la lumière solaire absorbés par la plante sont transformés en énergie chimique, via différents sites de l'appareil photosynthétique, ce qui participe à la production d'O<sub>2</sub> moléculaire, d'ATP et de NADPH. (II) La phase obscure ou biochimique consiste en l'ensemble des réactions biochimiques liées au cycle de Calvin-Benson, où l'ATP et le NADPH sont utilisés comme source d'énergie pour la fixation du CO<sub>2</sub> en produisant des hydrates de carbone, dont l'exemple typique est le glucose (Blankenship, 2002). L'ensemble de ces réactions se déroule au sein d'un organite cellulaire appelé chloroplaste et nécessite la coopération de deux photosystèmes (I et II) localisés dans les membranes de thylacoïdes.

### 1.1.1 Les chloroplastes

Le chloroplaste est un organe cellulaire à double membrane, avec deux couches phospholipidiques séparées par un espace intermembranaire sous l'aspect de disques aplatis, de 4 à 10  $\mu\text{m}$  de diamètre et de 1  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, présent essentiellement dans le mésophylle de la feuille (Hall et Rao, 1999). L'intérieur de cette membrane est constitué d'un fluide granuleux, le stroma, dans lequel est visible un déploiement complexe d'une membrane interne dénommée thylakoïde (Hudak, 1997; Kutik, 1998). La capture de l'énergie lumineuse et sa conversion en énergie chimique s'opèrent au sein des membranes thylacoïdiennes.

Ces membranes incorporent tous les pigments photosynthétiques responsables de la capture de l'énergie lumineuse ainsi que les protéines nécessaires à sa conversion en énergie chimique. Elles sont constituées d'un ensemble de vésicules aplaties (lamelles). Ces lamelles empilées en forme de disque ont tendance à se superposer en structures ordonnées pour former les granas (10 à 20 lamelles). Les granas sont reliés entre eux par des lamelles simples non empilées exposées au stroma. L'espace présent à l'intérieur du thylakoïde est désigné par le lumen (Figure 1.1).

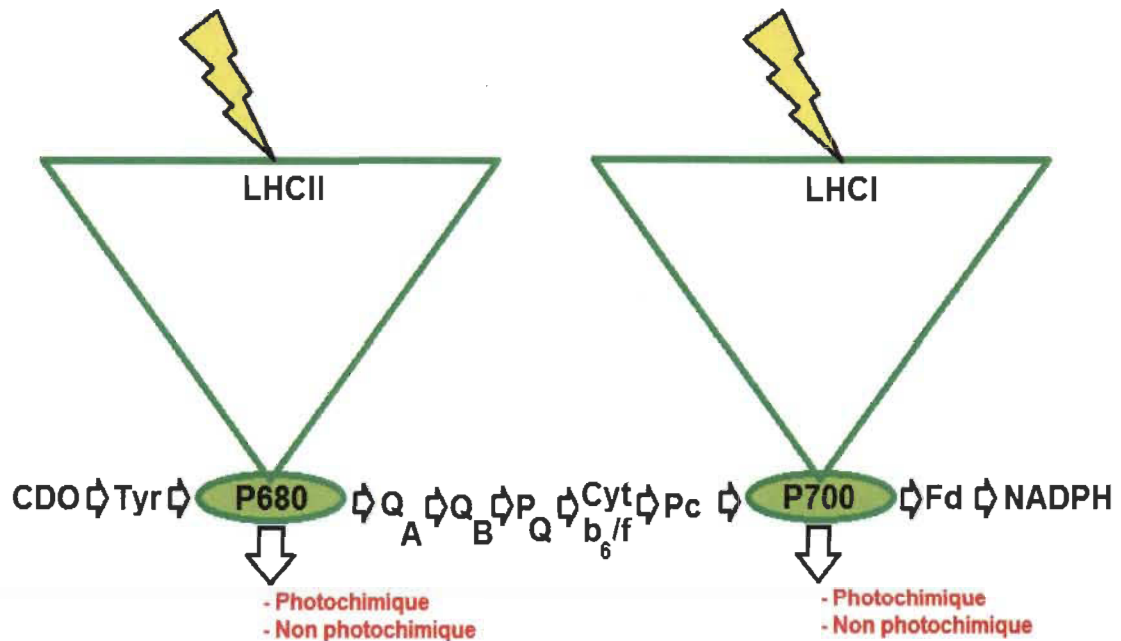


**Figure 1.1** (A) Structure d'un chloroplaste. (A) Modélisation informatique (B-D) par microscopie électronique; (B) Partie d'une section « classique » mince d'un chloroplaste; (C) Côté stroma; (D) Disque du grana (d'après : Hooper, 1984; Mustárdy et Garab, 2003).

### 1.1.2 Lumière et pigments photosynthétiques

Les photons sont des particules élémentaires de masse et de charge globalement nulles qui constituent la lumière. Ce sont des grains d'énergie qui se déplacent à la vitesse de la lumière  $c = 299\,792\,458\text{ ms}^{-1}$  ( $c$  : signifie célérité) avec une fréquence d'oscillation  $\nu$ . Leur énergie  $E$  est mesurée par la relation :  $E = h \nu$  avec la constante de Planck  $h \approx 6,626 \times 10^{-34}\text{ J.s}$ . La relation entre la fréquence  $\nu$  et la longueur d'onde ( $\lambda$ ) est proportionnelle  $\nu = c/\lambda$ . Les systèmes d'antennes des photosystèmes possèdent la faculté d'absorber un photon d'énergie lumineuse du spectre visible (400 à 800 nm). L'absorption de la lumière, en  $\sim 1$  femto seconde, fournie par une source lumineuse

extérieure (soleil ou autre source artificielle) crée ainsi le passage de l'état énergétique fondamental ( $S_0$ ) à un état excité ( $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$ , etc.). Le nombre de molécules mises en jeu dans l'absorption dépend de la densité d'énergie du rayonnement incident ainsi que de la probabilité de la transition considérée.



**Figure 1.2** Représentation schématique de l'utilisation d'énergie lumineuse par les antennes collectrices de lumière.

Il existe deux grandes catégories fonctionnelles de pigments : les pigments photosynthétiques et ceux photoprotecteurs. Les premiers pigments, appelés aussi les antennes collectrices de lumière (LHC; Light harvesting complex), sont associés en série dans les membranes de thylakoides et sont responsables de la captation ainsi que de la première étape de la conversion d'énergie lumineuse en énergie chimique chez les plantes. Les LHC se distinguent selon deux types, les LHC I et les LHC II associées aux PSI et PSII respectivement (Figure 1.2).

Les LHC II forment les antennes les plus abondantes dans la nature, lesquelles se retrouvent principalement en périphérie du PS II. Les LHC II sont des complexes protéines-pigments sous forme trimérique, dans laquelle chaque protéine monomérique Lhcb lie environ 13 à 15 *Chl a* et *b* au total, et de 3 à 4 caroténoïdes (Ben-Shem et al.

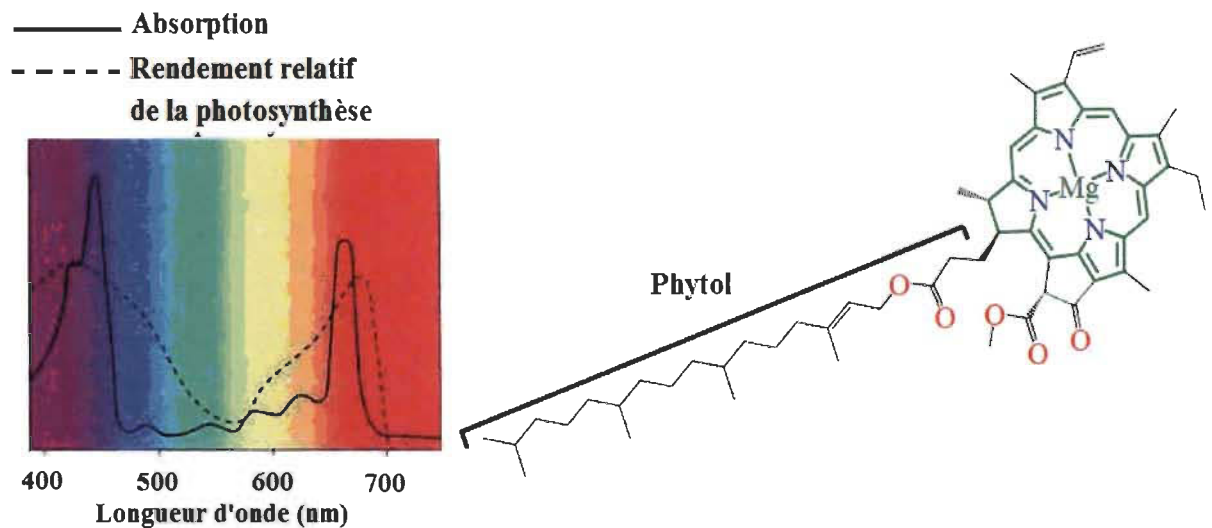
2003). Les *Chl* assurent l'essentiel de la capture de l'énergie lumineuse, alors que les caroténoïdes jouent le plus souvent le rôle de protection de l'appareil photosynthétique contre l'excès d'énergie lumineuse. La chlorophylle a est un pigment actif, car elle capte et convertit l'énergie lumineuse en énergie chimique alors que la chlorophylle b est un pigment surnuméraire, car elle ne fait que transmettre les photons à la chlorophylle a. Contrairement aux LHCII, les LHCI sont des antennes uniques aux PS I. Les LHCI sont des complexes protéines-pigments sous forme dimérique, dans laquelle chaque protéine monomérique Lhca lie 13 molécules de *Chl a* et *b* au total (Liu et al. 2004). L'architecture moléculaire des antennes collectrices de lumière comprenant leur espacement et leur orientation est élaborée de façon à favoriser la capture des photons et canaliser leur énergie jusqu'au centre réactionnel (CR).

#### ***1.1.2.1 Les centres réactionnels***

Les centres réactionnels (CR) sont les composants des deux photosystèmes (PSII et PSI) où interviennent la photochimie primaire de séparation des charges et les processus de transfert des électrons. L'énergie qui converge vers les centres réactionnels permettra d'induire cette séparation des charges au niveau de la chlorophylle nommée P680 dans le PSII et P700 dans le PSI (« P » pour pigment et « 680/700 » indique le pic d'absorption optimal en nm). La P680 est située à l'interface des protéines D1 et D2 qui constituent le cœur du centre réactionnel du PSII, codées par les gènes chloroplastiques *psbA* et *psb B*, et présentent des structures primaires voisines (Robinson, 1996). L'état oxydé  $P680^+$  créé par la séparation des charges est réduite par le donneur primaire d'électrons, la tyrosine Z (Tyz), qui elle-même reçoit un électron de l'eau. Du côté accepteur du PSII, l'électron arraché au CR, P680, pendant la première réaction lumineuse passe par l'intermédiaire d'une chaîne de transporteurs d'électrons au CR du PSI le P700, puis est transféré à la ferrédoxine qui permet la réduction de  $NADP^+$  en NADPH.

### 1.1.2.2 La chlorophylle a (*Chl a*)

Les chlorophylles a (*Chl a*) font partie d'un groupe de pigments tétrapyrroliques qui ont des fonctions et des éléments structuraux communs. Elles sont composées d'une « tête » de type chlorite contenant un atome de magnésium et d'une longue queue hydrophobe (phytol). Willstätter et Stoll (1910) sont les premiers à proposer la formule brute de la chlorophylle a (*Chl a*). Les chlorophylles (a et b) sont les pigments les plus abondants dans les feuilles des plantes et sont à l'origine de leur couleur verte, car elle absorbe fortement la lumière visible dans les longueurs d'onde correspondant au bleu et au rouge, mais laisse filtrer une grande partie de la lumière verte. Elles sont responsables de la capture de l'énergie lumineuse et de son transfert vers les centres réactionnels photosynthétiques qui sont, eux-mêmes, constitués de deux molécules de chlorophylle. Elles sont aussi appelées « pigments de la vie » pour leur rôle biologique primordial dans la photosynthèse (Battersby, 1987) (Figure 1.3).



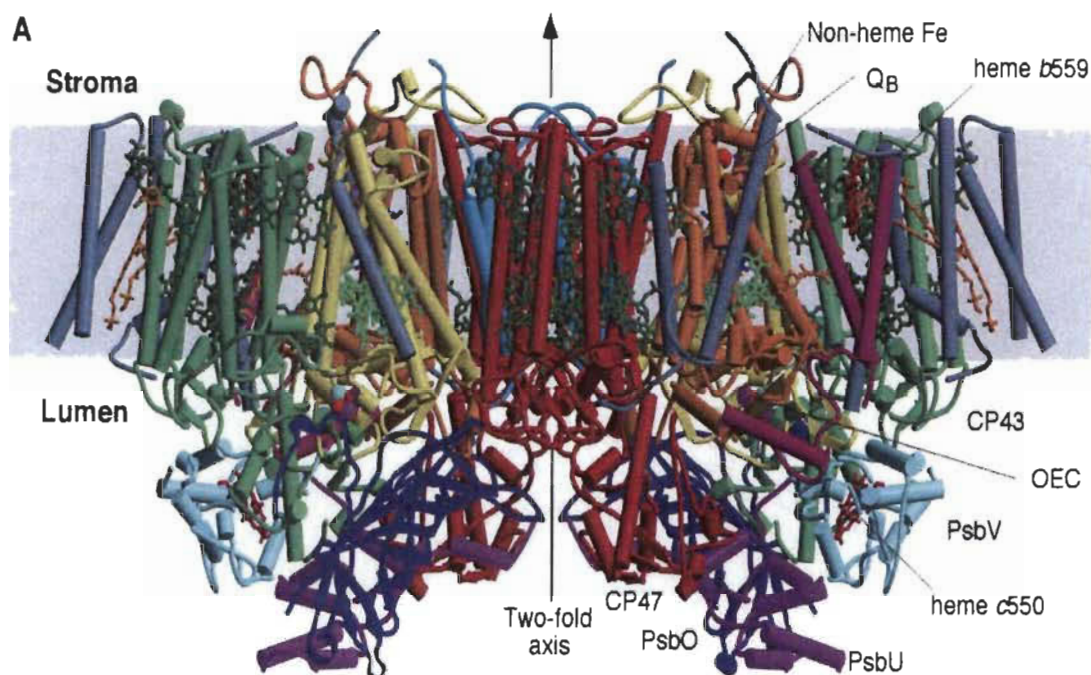
**Figure 1.3** Chlorophylle a : à droite, structure de chlorophylle a développée avec Chem Draw; à gauche, son spectre d'absorption.

### 1.1.3 Le photosystème II (PSII)

Le PSII est un complexe multiprotéique qui utilise l'énergie solaire pour oxyder l'eau et réduire les quinones. Le site catalytique d'oxydation de l'eau est localisé sur le



côté donneur d'électrons qui se situe du côté du lumen et qui possède le site catalytique du cluster de  $Mn_4Ca$  protégé par des protéines extrinsèques, alors que le site de réduction comprenant les deux quinones (QA et QB) et un fer non-hémique est localisé sur le côté accepteur d'électrons, c'est-à-dire le stroma (Yakushevskaya, 2003; Ferreira et al. 2004; Guskov et al. 2009). Les premiers modèles du repliement des sous-unités protéiques du PSII ont été confirmés par analyse spectroscopique (Michel et Deisenhofer, 1988; Rutherford, 1989). Ensuite, on assista à la première publication, dans l'année 2001, de la structure cristallographique du PSII à une résolution de 3.8 (Zouni et al. 2001). Depuis ce jour, la résolution n'a cessé d'être améliorée. Elle a été amenée à 3.5, ce qui a permis pour la première fois le raffinement de la structure et la résolution des acides aminés (Ferreira et al. 2004), ensuite à 2.9 (Guskov et al. 2009). Selon la structure la plus récente (Guskov et al. 2009), le PSII est formé de 20 sous-unités transmembranaires et d'un grand nombre de cofacteurs par monomère à savoir : 35 chlorophylles, 12 caroténoïdes, 2 phéophytines, un fer non-hémique, 2 ions calcium, 4 ions de manganèse (cluster de  $Mn_4Ca$ ), 2 ions  $Cl^-$ , 2-3 quinones, 2 hèmes et 25 lipides. Le centre réactionnel (CR) du PSII est principalement composé de 4 molécules de *Chl a*, d'un hétérodimère protéique constitué des protéines D1 codé par (PsbA) et D2 codé par (PsbD) (chacune de ces protéines contenant une molécule de phéophytine (Phéol et Phéo2 respectivement)) et de 2 antennes intrinsèques, à savoir CP43 et CP47 (Yakushevskaya, 2003). Ces antennes facilitent le transfert de l'excitation entre les antennes périphériques et le CR (Figure 1.4).



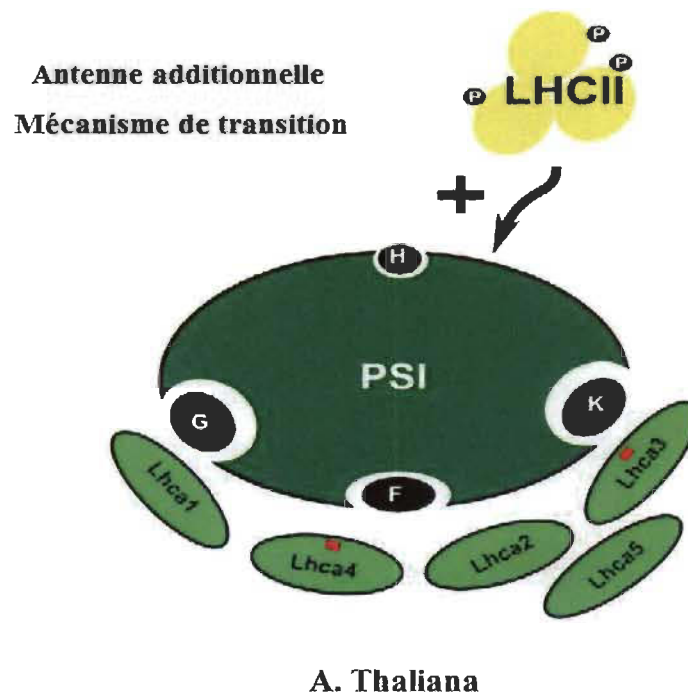
**Figure 1.4** Représentation de la structure du PSII et de ses principaux cofacteurs (d'après Ferreira et al. 2004).

#### 1.1.4 Le photosystème I (PSI)

Le photosystème I (PSI) est un complexe multiprotéique incorporé dans la membrane des thylakoïdes. La structure du PSI a évolué depuis 3,5 milliards d'années d'une structure homodimérique simple en un appareil sophistiqué qui se compose d'un noyau hétérodimérique. Le PSI est probablement la machine nanophotochimique la plus efficace dans la nature. Son application photochimique future par l'homme dépend de la compréhension de ces propriétés fonctionnelles et structurales. Le PSI se subdivise en deux complexes membranaires : le centre réactionnel et les antennes périphériques. Le centre réactionnel assure la collecte de la lumière et le transport d'électrons tandis que les antennes collectrices de la lumière (LHC, light harvesting complex), associées au complexe principal, optimisent la collecte de la lumière.

La structure cristalline du complexe PSI-LHCI à 3,3 Å permet d'identifier un total de 18 sous-unités protéiques, 173 chlorophylles, 15  $\beta$ -carotènes, 3 complexes fer-soufre (4Fe-4S) et 2 phylloquinones (Kutik, 1998). Il est à noter que, jusqu'à présent, les

sous-unités PsaO et PsaP ne pouvaient pas être identifiées dans toutes les structures cristallines des PSI de la plante (Balows et al. 1992; Kutik, 1998; Blankenship, 2002; Busch et Hippler, 2011). Le PSI catalyse l'étape finale de transport d'électrons photosynthétiques par l'oxydation de la plastocyanine dans le lumen et la réduction de la ferrédoxine dans le stroma. Le rendement quantique de la réaction photochimique de ce photosystème est proche de 1 (Nelson et Yocum, 2006). Sous certaines conditions, des trimères de protéines LHC-II, généralement associées au photosystème II (PSII), peuvent s'associer au PSI selon le mécanisme de transition d'état (Figure 1.5).

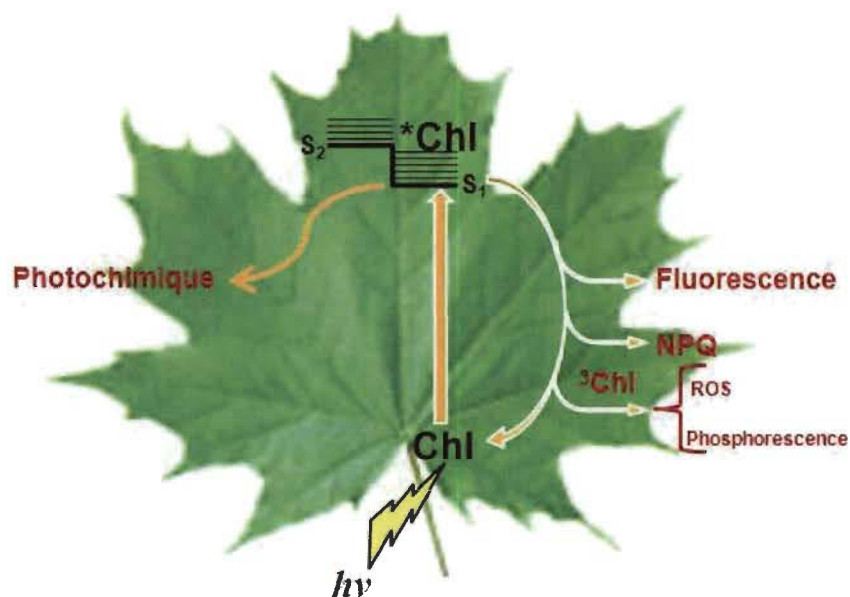


**Figure 1.5** Structure et composition du complexe PSI-LHCI (adapté de Busch et Hippler, 2011).

### 1.1.5 Les voies de dissipation d'énergie

L'absorption d'un photon d'énergie durant la photosynthèse peut engendrer des transitions électroniques dans les molécules excitables. Une fois la molécule de chlorophylle excitée, cette dernière ayant un niveau d'énergie plus élevé ( $S_n$  d'où  $n \geq 1$ ) avec une durée de vie de l'ordre de 1 à 10 nanosecondes, l'électron aura tendance à retourner à son état le plus stable. Selon le principe de Pauli, 2 électrons au maximum

avec des spins opposés peuvent occuper la même orbitale atomique dans l'état fondamental. Les électrons de la couche de valence se retrouvent sur l'orbitale disponible de plus faible énergie, ou orbitale « liante ». Les échanges d'énergie avec un rayonnement électromagnétique se font par saut d'énergie: les électrons passent donc d'une orbitale moléculaire à une autre d'énergie plus élevée. La molécule « excitée » devient alors le siège d'une série de processus radiatifs et non radiatifs. Ces processus de désexcitation sont des processus qui vont conduire à la désactivation des molécules excitées par perte de l'excès d'énergie précédemment absorbée (Malkin et Cahen, 1979; Carpentier et al. 1984) (Figure 1.6) :



**Figure 1.6** Voies de dissipation d'énergie de la chlorophylle excitée du PSII.

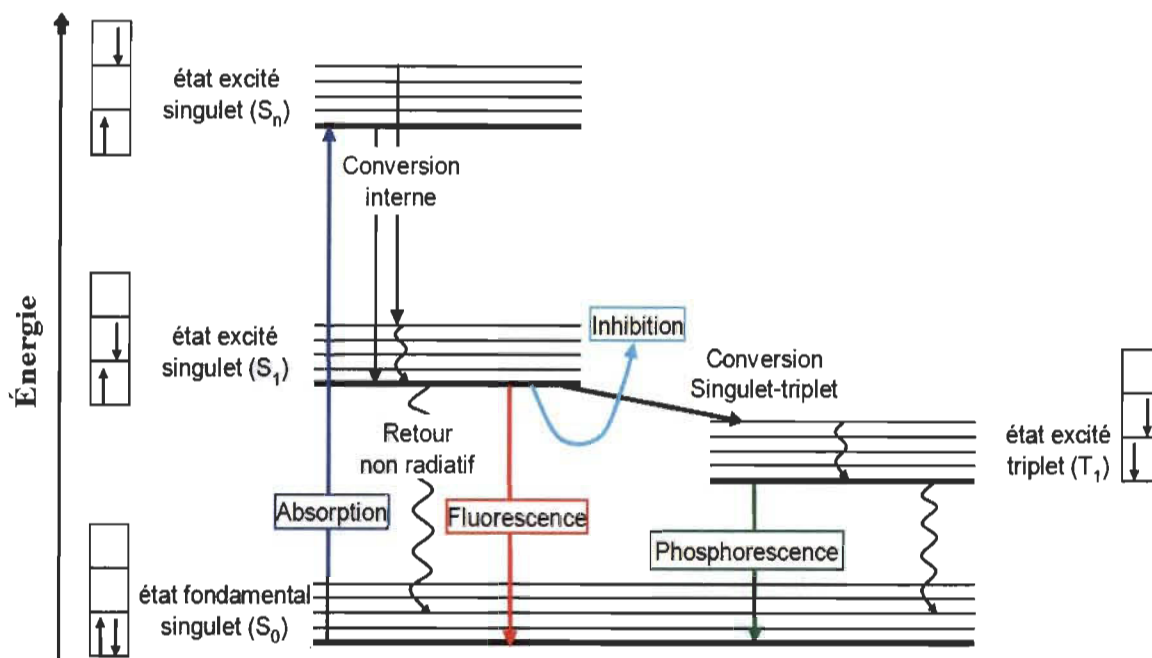
Ces quatre destinations coexistent et sont en compétition les unes avec les autres. De toutes les façons, la diminution de la dissipation par l'une des voies entraînera automatiquement une augmentation de la dissipation via les autres voies.

#### 1.1.5.1 Dissipation d'énergie sous forme de fluorescence

La fluorescence de la *Chl* est une technique qui permet la mesure du fonctionnement de l'appareil photosynthétique. Cette mesure est devenue une des

méthodes d'analyse les plus utilisées dans le domaine des sciences végétales (Schreiber et Bilger, 1993). Sous éclairage solaire, on distingue deux types de fluorescence des plantes : la fluorescence chlorophyllienne (630-800 nm) et la fluorescence bleu-verte (400-630 nm). La mesure de fluorescence chlorophyllienne est une méthode d'investigation largement utilisée pour le suivi de l'activité photosynthétique sur algues, chloroplastes ou feuilles entières (Baker, 2008). La fluorescence est le processus d'émission lumineuse (UV-visible) spontané d'une espèce excitée par absorption d'un rayonnement incident lors de la relaxation radiative, entre l'état excité singulet ( $S_1$ ) et l'état fondamental ( $S_0$ ). Comme nous l'avons expliqué précédemment, l'état excité  $S_1$  peut être désactivé (atténué) par différents processus (Figure 1.6). Dès lors, la désactivation par fluorescence se produira si elle est plus rapide qu'un mécanisme non fluorescent.

Plusieurs facteurs physiologiques, cinétiques et environnementaux peuvent affecter l'intensité de la dissipation d'énergie sous forme de fluorescence en fonction du temps. Bien qu'elle ne représente qu'une faible partie des quanta absorbés (de 0.5 à 3 %), son étude fournit des informations sur la dissipation de l'énergie dans les photosystèmes, en particulier par la voie photochimique dans le PS II (Baker, 2008; Lazar, 1999). Par contre, la fluorescence du PS I est indépendante du rendement photochimique. Deux autres émissions lumineuses peuvent avoir lieu dans la molécule de chlorophylle. La phosphorescence, qui se produit après un transfert intersystème d'énergie vibrationnelle vers un état triplet, est une émission à une longueur d'onde légèrement supérieure à celle de la fluorescence. La luminescence est observée à l'obscurité, il s'agit d'une émission similaire à la fluorescence, mais l'excitation des états singulets se fait à partir de la recombinaison des charges entre le côté donneur et le côté accepteur d'électrons du PSII on parle alors de thermoluminescence.



**Figure 1.7** Diagramme de Jablonski des principales voies de dissipation d'énergie lors de l'excitation d'une chlorophylle : la phosphorescence est encadrée en vert.

### 1.1.5.2 Dissipation d'énergie sous forme de phosphorescence

La photoluminescence est un phénomène qui consiste en l'émission de photons par une molécule suite à son irradiation par une source lumineuse. Suivant la nature des états excités impliqués, la photoluminescence peut être sous forme de fluorescence ou de phosphorescence. Au cours de ce dernier processus, l'émission se produit entre deux états de multiplicité différente (triplet vers singulet :  $T_1 \leftarrow S_1$ ). Le passage d'un état excité singulet vers un état excité triplet est appelé croisement intersystème (ISC de l'anglais *inter-system crossing*). Cette transition, interdite selon la règle de spin, peut avoir lieu lorsque la molécule possède un moment magnétique important rendant le couplage spin-orbite non négligeable. La forte constante de couplage spin – orbite du magnésium garantit un croisement ISC rapide de l'état singulet à l'état excité triplet dans la chlorophylle. Les électrons appartenant à un système  $\pi$  peuvent être délocalisés sur l'ensemble de la structure jusqu'aux groupements terminaux. De plus, la possibilité de collision avec des espèces paramagnétiques présentes dans le milieu (ex. :  $O_2$ ) a aussi tendance à augmenter le taux de passage intersystème. Après être passée vers l'état  $T_1$



qui a une durée de vie de l'ordre de la centaine de microsecondes à plusieurs dizaines de millisecondes, la chlorophylle aura tendance à se désexciter vers S<sub>0</sub>. Le passage de T<sub>1</sub> à S<sub>0</sub> se traduit par une transition radiative qui est la phosphorescence (Figure 1.6).

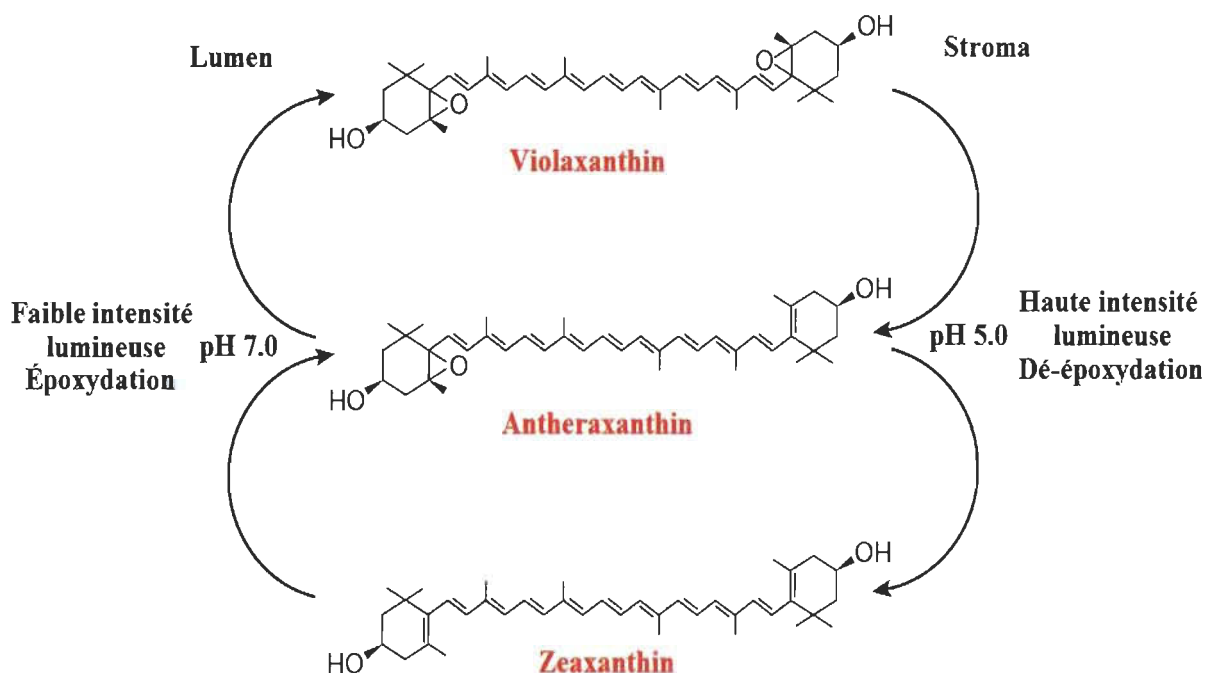
### 1.1.5.3 Dissipation d'énergie sous forme de chaleur

Dans la photosynthèse, la dissipation d'énergie par la voie non photochimique peut montrer une considérable variation, qui représente une part des mécanismes de protection de l'appareil photosynthétique contre un excès d'énergie lumineuse absorbée par les pigments (Niyogi, 1999; Kurk et al. 2005). Cette dissipation d'énergie peut prendre différentes voies selon les conditions environnementales et les propriétés spécifiques des espèces de plantes (Demmig-Adams et Adams, 1996). Quand une molécule retourne de son état singulet excité S<sub>1</sub> à l'état fondamental S<sub>0</sub>, sans émettre de radiation, toute l'énergie d'excitation est transformée en chaleur en raison de la conversion de l'énergie électronique suite au mouvement vibrationnel de la molécule.

Les xanthophylles, molécules non enzymatiques de type caroténoïde associées aux antennes collectrices de lumière (LHC), jouent un rôle central dans la photoprotection des végétaux. En effet, le cycle des xanthophylles constitue le plus important mécanisme de régulation biochimique qui permet la dissipation sous forme de chaleur de l'excès d'énergie lumineuse reçue par les plantes ainsi que la destruction des espèces réactives d'oxygène (ROS) (Niyogi, 1999; Kurk et al. 2005). Dans ce processus, déclenché par un faible pH du côté du lumen et contrôlé par l'enzyme violaxanthine dé-époxydase (violaxanthine : ascorbate oxydoréductase), la violaxanthine est transformée de façon réversible en zéaxanthine via le pigment intermédiaire anthéroxanthine (Figure 1.8). En effet, la zéaxanthine serait capable de désactiver les molécules de *Chl* excitées et de provoquer un changement conformationnel des antennes et des membranes thylacoïdales (Demmig-Adams et Adams, 1996; Horton et al. 1996; Franck et Cogdell, 1996). Ces changements favoriseraient la dissipation d'énergie sous forme de chaleur qui est traduite par une protection de la photosynthèse via trois mécanismes (Niyogi, 1999) :

1. Diminution de la durée de vie des <sup>1</sup>*Chl* en dissipant l'énergie qu'elle contient.

2. Prévention de la suracidification du lumen en limitant le nombre de protons parvenant jusqu'à la plastoquinone (PQ).
3. Diminution du taux de réduction du  $O_2$  au niveau du PSI (peu d'électrons parviennent jusqu'à la ferrédoxine).



**Figure 1.8** Cycle des xanthophylles lors de la régulation de la dissipation d'énergie lumineuse. Les pH 7.0 et 5.0 sont les pH optimaux des enzymes zéaxanthine époxydase et violaxanthine dé-époxydase, respectivement (Niyogi et al. 1997).

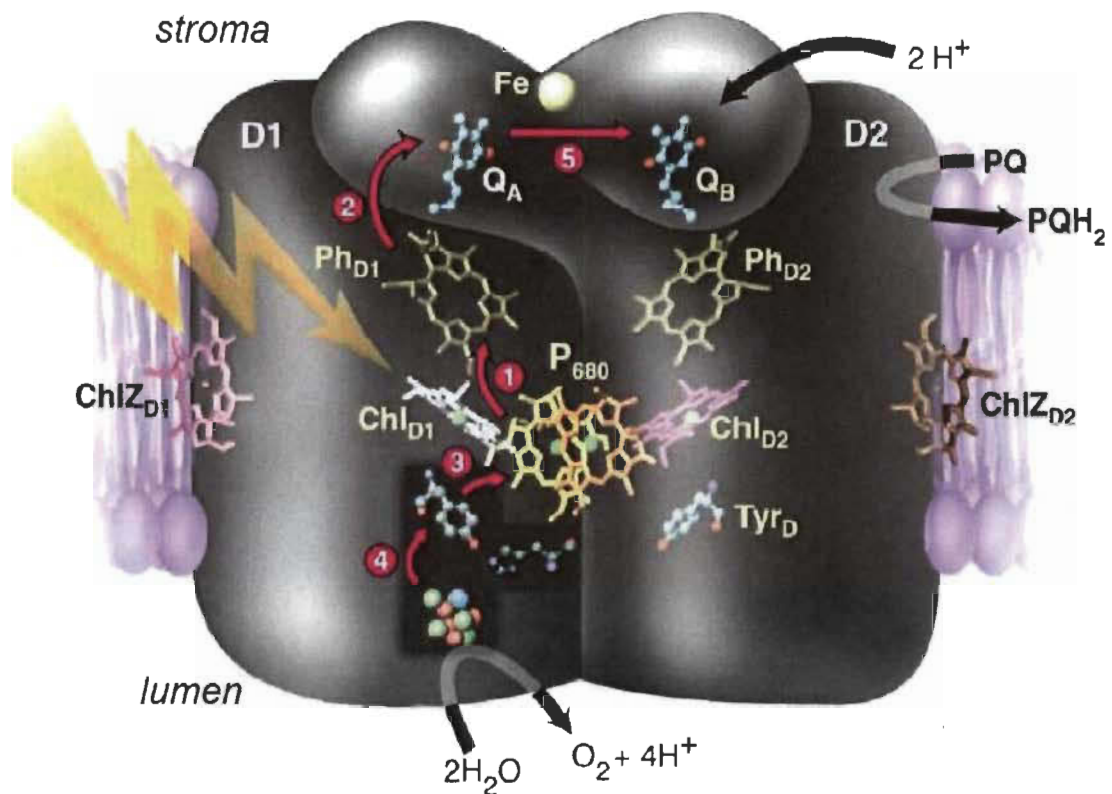
#### 1.1.5.4 Dissipation d'énergie par transfert d'électrons

L'excitation électronique des chlorophylles peut conduire à une modification spectaculaire de leurs réactivités. Un des effets majeurs de l'excitation est de rendre possible d'un point de vue thermodynamique un transfert d'électrons. Ce dernier est très étudié de par son intervention clé dans le mécanisme de la photosynthèse. Pour comprendre la dynamique de la réaction de transfert d'électrons, il faut tenir compte des positions et du mouvement des réactifs dans un environnement moléculaire donné. Selon la théorie de Marcus du transfert d'électrons (Atkins, 2004), les vitesses de transfert d'électrons dépendent des facteurs suivants :



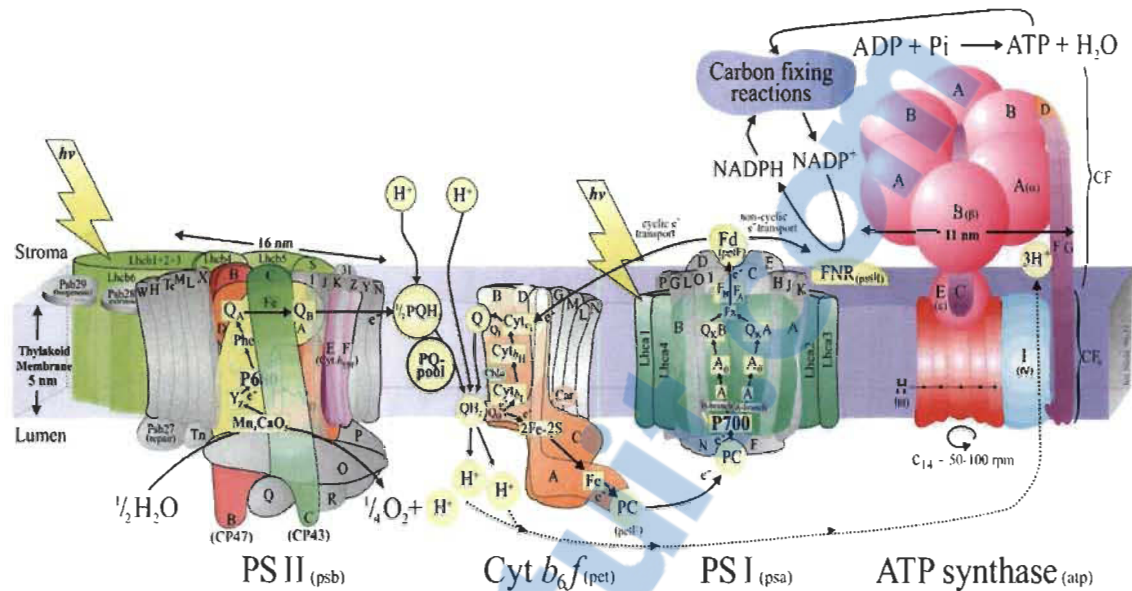
- La distance entre le donneur et l'accepteur.
- L'énergie libre de Gibbs de la réaction ( $\Delta G$ ).
- L'énergie de réorganisations moléculaires internes.
- L'énergie Coulombienne de répulsion ou d'attraction entre les espèces.

L'absorption de l'énergie lumineuse par les centres réactionnels chlorophylliens du PSII (P680) et du PSI (P700) induit une séparation de charge et un transfert d'électrons. Au niveau du PSII, la séparation de charge dans le P680 est suivie par un transfert d'électrons qui finit par réduire une deuxième quinone ( $Q_B$ ) fixée sur la protéine D1 (Rutherford, 1989; Burda, 2007) (Figure 1.9). Le retour à l'état réduit du P680 est assuré par des électrons provenant de la dissociation de l'eau à travers un résidu tyrosine ( $Y_Z$ ). Cette réaction photochimique d'oxydoréduction se déroule au sein du PS II, différents transporteurs interviennent ensuite dans le transfert des électrons vers le PSI.



**Figure 1.9** Représentation du transfert d'électrons (les flèches violettes) dans le photosystème II entre 1 : P680 et la phéophytine, 2 : la phéophytine et  $Q_A$ , 3 : la tyrosine et P680, 4 : l'OEC et la tyrosine et 5 :  $Q_A$  et  $Q_B$ . (selon Rutherford et Boussac, 2004).

La séparation de charges au niveau du centre réactionnel P700 du PSI est aussi suivie par un transfert d'électrons jusqu'au récepteur terminal : le  $NADP^+$ . La réduction de  $NADP^+$  en  $NADPH$  est catalysée par la  $NADP$ -ferrédoxine-oxydoréductase. Le P700 du PSI oxydé est ensuite réduit par les électrons en provenance du PQ à travers la plastocyanine (PC). Cette chaîne de transfert d'électrons est dite linéaire (c'est-à-dire que les électrons sont transférés de l'eau vers le  $NADPH$ ) (Figure 1.10). Cependant, il existe un autre type de transfert d'électrons non linéaire : le transport cyclique d'électrons (Bukhov et Carpentier, 2004; DalCorso et al. 2008). Les transferts linéaire et cyclique d'électrons génèrent un gradient de protons au niveau de la membrane thylacoïdale qui va servir à la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique. Dans le stroma du chloroplaste, l'ATP et le  $NADPH$  sont ensuite utilisés au cours du cycle de Calvin-Benson pour la réduction du  $CO_2$  et la synthèse de glucides (Bukhov et Carpentier, 2004; DalCorso et al. 2008).



**Figure 1.10** Modèle schématique de la chaîne de transfert d'électrons comprenant une représentation de l'organisation et de la structure des complexes protéiques. Source : Dr Nield. Schéma basé sur les travaux de Jordan et al. 2001; Stroebel et al. 2003; Ferreira et al. 2004; Liu et al. 2004; Amunts et al. 2007).

<http://www.photosynthesis.sbcs.qmul.ac.uk/nield/downloads.html>.

## 1.2 Aspects environnementaux

Depuis la fin du 20<sup>e</sup> siècle, l'environnement prend de plus en plus de place dans les politiques de développement économique à l'échelle planétaire. De ce fait, la conscience généralisée concernant la nécessité de limiter les impacts de l'activité humaine sur l'environnement s'est traduite par des « sommets de la terre » ayant lieu tous les dix ans. Quatre sommets se sont tenus jusqu'à maintenant et le dernier a eu lieu en juin 2012. Ce sont des rencontres entre dirigeants mondiaux qui constituent une occasion pour se pencher sur l'état environnemental de la planète et définir ainsi les moyens et les solutions appropriés. Cependant, comme le montre l'issue du récent sommet mondial de la terre à Rio, nous sommes encore loin d'un consensus international sur les moyens à mettre en œuvre pour atteindre cet objectif. D'ailleurs, il n'est plus possible d'ignorer les facteurs incitatifs et les contraintes qui poussent chaque pays à intégrer des projets à une démarche de développement durable.



**Figure 1.11** Sommet de la terre Rio 2012.

### 1.2.1 Pollution des sols

Afin d'étudier l'impact de la pollution sur l'environnement, il faut tenir compte de trois types de pollution : la pollution de l'air, la pollution du sol et la pollution de l'eau. Néanmoins, il est évident que les populations humaines profitent directement et indirectement du fonctionnement et de la stabilité des écosystèmes. Le terme pollution doit être utilisé quand les apports liés aux activités humaines sont susceptibles de présenter un effet négatif sur l'environnement (Baize, 2007). Kinne (1968) la définit comme « les activités humaines qui ont des effets négatifs sur la santé, les ressources, le bien-être et les écosystèmes ». Les conséquences de l'industrialisation, peu soucieuse des rejets d'éléments toxiques comme les métaux lourds, rendent de nombreux sites potentiellement pollués et dangereux pour la santé publique. Nous nous concentrerons ici sur la pollution des sols par des métaux lourds. Historiquement, les sols étaient considérés uniquement en fonction de leur fertilité pour les besoins de la production agricole de l'homme. Les préoccupations actuelles font que la qualité des sols a été intégrée à l'ensemble des problématiques environnementales. Le sol est la partie supérieure de la croûte terrestre. Il est l'interface entre l'atmosphère, l'hydrosphère, la lithosphère et les êtres vivants. C'est un milieu complexe, vivant et dynamique où les trois phases (solide, liquide et gazeuse) interagissent et conditionnent par leurs échanges et interactions la nature et le degré de mobilité des polluants. Le sol est un acteur déterminant pour le développement de toutes les formes de vie sur notre planète. De ce fait, les sols ne

sont pas uniquement des lieux de déposition des substances (telles que les métaux lourds), ils sont également des sources de substances (incluant les métaux lourds) disponibles pour la constitution d'une nouvelle biomasse.

La contamination des sols par les métaux lourds peut avoir des effets néfastes sur les êtres vivants. Une fois libérés dans l'environnement, les métaux sont soumis à des processus de transport, de rétention et de dispersion complexes dans les différents compartiments de la biosphère. Leur répartition dans l'écosystème dépend en plus de leurs propriétés intrinsèques, des caractéristiques biotiques et abiotiques du milieu, ce qui se traduit par leur transfert dans la chaîne alimentaire à travers les espèces animales et végétales (Adriano, 2001). L'exposition à une substance toxique peut produire des effets biochimiques et/ou physiques se traduisant par des altérations d'un organe, d'un système, d'une fonction, d'un processus biochimique ou biologique. Ces effets varient selon l'intensité, la voie, la fréquence et la durée de l'exposition, mais aussi en fonction de la nature et de l'état de l'espèce exposée. La pollution métallique des sols peut résulter de processus dits naturels ou provenir des différentes activités humaines, a des effets irréversibles sur la santé des êtres vivants et est donc un sujet de préoccupation majeure aussi bien à court qu'à long terme.

### **1.2.2 Les métaux lourds**

Un métal est un élément chimique capable de former des liaisons métalliques ou ioniques. Le terme « métaux lourds » est une appellation ambiguë qui n'a pas de fondement scientifique et dont la définition varie d'une source à l'autre (Hodson, 2004). Néanmoins, l'utilisation courante fait que cette dénomination assez floue comporte la notion négative de toxicité, ce qui n'est pas dérisoire puisqu'une grande majorité de ces métaux sont toxiques à des concentrations élevées. Les métaux lourds, connus aussi comme éléments traces métalliques, sont des constituants naturels à faible concentration (à l'état de traces, moins de 0.1 %) de la croûte terrestre et désignés par une masse volumique supérieure à  $5\text{g/cm}^3$  (Lapedes, 1974; Callender, 2003). Les sources anthropiques (les activités industrielles et agricoles, le transport, la combustion des



énergies fossiles, etc.) contribuent à l'accroissement de la concentration en métaux dans l'air et dans les écosystèmes terrestres et aquatiques. Dans ce cas, ces éléments peuvent être considérés comme des éléments majeurs dans leur milieu. L'activité anthropique n'a ni créé, ni supprimé les métaux, elle a tout simplement modifié leur emplacement et leur concentration dans les différents compartiments de la biosphère (terre, eau, air). La mobilité des métaux dans les sols dépend d'une part de leurs sites de rétention et d'autre part des conditions physico-chimiques du milieu (Han et al. 2003; Ma et al. 2011). La compréhension des mécanismes impliqués dans leur transfert dans les sols permet de prévoir les risques de pollution des écosystèmes en plus de concevoir des techniques de dépollution appropriées. Du reste, dans cette thèse, le terme « métaux lourds » sera associé parfois par abus, au plomb par souci de simplification.

#### ***1.2.2.1 Effets des métaux lourds sur les plantes***

L'interaction des espèces végétales avec les métaux est dépendante d'un côté du facteur plante, c'est-à-dire de la capacité de la plante à absorber et tolérer le métal en question, et, d'un autre côté, de la nature du métal, de sa forme physico-chimique et des propriétés du sol (les conditions acido-basiques (pH), la présence de complexant, l'état d'oxydation, l'action des microorganismes, etc.). On peut tout d'abord observer une transformation des métaux par des processus d'oxydation/réduction ou d'alkylation. Ces modifications modifient généralement la toxicité et la mobilité du métal d'origine. Selon le métal examiné, la toxicité peut porter sur la croissance ou/et l'existence de différents organes. Bien sûr, ces effets toxiques dépendent des voies et niveaux d'exposition, ainsi que de l'espèce considérée. Les métaux peuvent aussi être assimilés par différents mécanismes dans les plantes. La tolérance des plantes aux métaux lourds correspond à l'ensemble des mécanismes qui permettent de maintenir la concentration des métaux essentiels dans les limites physiologiques et de minimiser les effets délétères des métaux non essentiels (Clemens et al. 2002). La comparaison de la concentration métallique des parties aériennes et celle des parties racinaires des plantes met en évidence deux grandes stratégies de tolérance aux métaux lourds : l'exclusion des métaux des parties aériennes ou au contraire, l'accumulation des métaux dans les feuilles (Baker, 1981).

L'importance de la disponibilité des métaux pour les plantes est bien connue : nombre d'entre eux sont indispensables, à faible concentration, au fonctionnement et à la croissance des plantes (Morel et al. 1997; Rengel, 1999; Kabata-Pendias et Pendias, 2001; Kalis et al. 2007). Cependant, à forte concentration, ils agissent comme un facteur de stress qui altère le développement et la croissance normale des plantes. Pour autant, à ce jour, le rôle exact de certains métaux lourds dans le métabolisme et la croissance de la plante n'est pas encore élucidé. Malgré la grande diversité des besoins et des niveaux de tolérance aux métaux lourds chez les plantes, certains restent considérés sans effet bénéfique même à de très faibles concentrations comme Hg, Pb et Cd (Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

### ***1.2.2.2 Effets des métaux lourds sur les protéines***

Comprendre les mécanismes complexes des cellules biologiques est un enjeu scientifique d'importance majeure. Beaucoup de composants d'une cellule biologique sont des protéines, macromolécules essentielles pour la structuration et le fonctionnement des cellules vivantes. Leurs découvertes remontent à 1835, lorsque le chimiste G. Mulder en collaboration avec J. Berzelius identifient dans le blanc d'œuf une substance constituée essentiellement d'atomes de carbone, d'oxygène, d'hydrogène et d'azote, mais aussi de phosphore et de soufre. Ils montrent également que cette substance se retrouve dans tous les tissus vivants, propriété qui lui confère son nom, tiré du grec *prôtos* : premier, essentiel. La connaissance de l'effet des métaux lourds sur les propriétés physico-chimiques des protéines est importante pour comprendre leur rôle au sein de la plante. Il a été démontré que les métaux lourds, en se liant, engendrent une altération des structures ainsi que des fonctions des protéines cytoplasmiques (Evtushenko et al. 1986).

Les métaux lourds sont l'un des éléments causant la dénaturation des protéines, perturbant ainsi le métabolisme cellulaire et entraînant une toxicité. Cette dénaturation de la protéine se définit comme un changement dans sa structure tridimensionnelle, soit au niveau secondaire, tertiaire ou quaternaire. La structure des protéines peut être

affectée de façon réversible ou irréversible. Cependant, les mécanismes ainsi que les sites de liaisons sont toujours inconnus pour la plupart des métaux toxiques. L'essor actuel de la biologie cellulaire serait impossible sans l'obtention des structures des biopolymères par cristallographie ou par technique de spectroscopie. Néanmoins, malgré la croissance exponentielle du nombre de structures et de mécanismes résolus, ces informations sont généralement insuffisantes pour comprendre le fonctionnement des macromolécules. La conformation et la structure qu'adopte une protéine au sein de la cellule assurent ses propriétés spécifiques : fonctions enzymatiques et mécaniques, stabilité thermique, etc. De ce fait, la protéine modifiée ne peut généralement plus assurer sa fonction.

### 1.2.2.3 Le plomb (Pb)

L'utilisation du plomb par l'homme remonte aux premières civilisations, à l'époque où les métaux étaient utilisés dans la vie de tous les jours par les populations. N'ayant aucun rôle bénéfique connu aux êtres vivants à ce jour, le Pb, toxique à de très faibles concentrations, ne possède pas de voie d'entrée ou de sortie dans les cellules qui lui soit spécifique. Il est classé comme élément très dangereux pour les êtres vivants et les écosystèmes. Il agit donc en imitant les métaux physiologiques afin de traverser les membranes cellulaires. Les caractéristiques physico-chimiques du Pb ont été mises en évidence, ce qui a permis son utilisation à grande échelle au début de 19<sup>e</sup> siècle, notamment pendant la révolution industrielle à la suite de son utilisation en tant qu'additif dans les carburants. Le plomb, du latin *plumbum*, est un métal gris bleuâtre, blanchissant lentement en s'oxydant, et malléable. Le Pb, avec un numéro atomique 82, est un membre du groupe IV A des éléments du tableau périodique, de masse atomique 207,2 g/mol et d'une structure électronique  $[\text{Xe}] 4f^{14} 5d^{10} 6s^2 6p^2$ . Le prix Nobel de 1914 a été attribué à T.W. Richards pour ses travaux sur la masse atomique et en particulier celle du plomb, dans le contexte de la radioactivité. Le Pb est un élément réparti uniformément dans la croûte terrestre (36<sup>e</sup> élément), où sa concentration moyenne est de 32mg.kg<sup>-1</sup> (Pais et Benton, 2000). Il est présent dans l'environnement sous les degrés d'oxydation (0) métal, (+II) et (+IV) cependant, la forme la plus dominante dans la



nature est  $\text{Pb}^{2+}$  (Adriano, 2001). Le plomb possède quatre isotopes stables ( $^{204}\text{Pb}$ , 1.48 %), ( $^{206}\text{Pb}$ , 23.6 %), ( $^{207}\text{Pb}$ , 22.6%) et ( $^{208}\text{Pb}$ , 52.3 %), ainsi que deux isotopes radiogéniques  $^{210}\text{Pb}$  et  $^{212}\text{Pb}$ , avec un temps de demi-vie ( $t_{1/2}$ ) de 22 et 10 ans respectivement. Les principaux minéraux qui contiennent du plomb sont présentés au tableau 1.1.

De nos jours, le plomb est reconnu comme un métal très dangereux dont l'utilisation dans certaines industries est interdite ou en voie d'élimination. Au Canada, l'utilisation industrielle de plomb est en diminution constante et son rejet fait l'objet de suivis et de contrôle très rigoureux. La production de plomb actuelle est très faible, et la majeure partie du plomb utilisé provient du recyclage des déchets et des sous-produits générés par les industries minières et métallurgiques.

**Tableau 1.1**

Principaux minéraux et composés de plomb (BRGM, 2004)

Nom	Formule chimique
Plomb	Pb
Anglésite	PbSO <sub>4</sub>
Arséniate de plomb	Pb <sub>3</sub> (AsO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>
Boulangérite	Pb <sub>5</sub> Sb <sub>4</sub> S <sub>11</sub>
Bromure de plomb	PbBr <sub>2</sub>
Cerusite	PbCO <sub>3</sub>
Crocoïte	PbCrO <sub>4</sub>
Di-chlorure de plomb	PbCl <sub>2</sub>
Dioxyde de plomb	PbO <sub>2</sub>
Fluoropyromorphite	Pb <sub>5</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> F
Franckéite	Pb <sub>5</sub> Sn <sub>3</sub> Sb <sub>2</sub> S <sub>14</sub>
Galène	PbS
Hydrocerusite	(PbO) <sub>3</sub> , (CO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O
Hydroxyde de plomb	Pb(OH) <sub>2</sub>
Hydroxypyromorphite	Pb <sub>5</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> OH
Massicot	PbO
Minium	Pb <sub>3</sub> O <sub>4</sub>
Phosgénite	Pb <sub>2</sub> (CO <sub>3</sub> )Cl <sub>2</sub>
Plumbogummite	PbAl <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (OH) <sub>5</sub> , H <sub>2</sub> O
Pyromorphite	Pb <sub>5</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> Cl
Raspite	PbWO <sub>4</sub>
Vanadinite	Pb <sub>5</sub> (VO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> Cl
Wulfénite	PbMoO <sub>4</sub>

a) Le plomb et les plantes

Quelle que soit son origine, le plomb présent dans le sol ne se décompose ni par voie chimique, ni par voie biologique. Il est lié aux phases solides du sol par adsorption, précipitation, formation de complexes ioniques ou chélates. De ce fait, il est accumulé

dans les sols et peut être absorbé par les plantes, ce qui représente un problème majeur pour la santé humaine. Les plantes peuvent absorber le plomb présent dans le sol par l'intermédiaire de leurs racines. Une partie de ce métal, présent dans les retombées atmosphériques (impuretés) liées à des activités anthropiques, peut également être absorbée par leurs feuilles. Cependant, en dehors de zones proches d'installations industrielles produisant une grande quantité de plomb dans l'atmosphère, la plus grande quantité du plomb absorbée par les plantes l'est par absorption racinaire. La plante influence considérablement les propriétés physico-chimiques des sols. Le fait qu'elle prélève de l'eau et des éléments nutritifs nécessaires à sa croissance et libère diverses substances participe à la modification des propriétés du sol (pH, matière organique, etc.). En retour, ces changements apportés aux sols influencent l'activité biologique des plantes. Le pourcentage de transfert du plomb du sol vis-à-vis des plantes est de l'ordre de 1 à 10 % (Manceau et al. 1996). Cette faible biodisponibilité du plomb explique son caractère difficilement biodégradable (Dahmani-Muller, 1996).

#### b) Le plomb et les êtres humains

Le plomb est l'un des métaux qui ont été le plus anciennement et largement utilisés par l'homme. Sa malléabilité, sa facilité d'extraction, son bas point de fusion ainsi que sa grande disponibilité en ont fait un métal de prédilection pour la fabrication et la production d'un bon nombre de produits, allant des pigments de peintures pour céramique à la tuyauterie, jusqu'à son utilisation dans certains produits cosmétiques (Lessler, 1988). Il se trouve également parmi les éléments des pigments retrouvés dans les tombes néandertaliennes (40 000 ans avant Jésus-Christ). Il était utilisé par les Égyptiens (les pharaons) 4 000 ans avant Jésus-Christ (Garnier, 2005). La Renaissance, grande période de renouveau de l'art, voit l'invention des vitraux qui deviennent à la mode dans les fenêtres des bâtiments religieux et des châteaux. Le plomb y est utilisé comme pigment, mais également comme armature, fut responsable de quelques cas de saturnisme parmi les ouvriers. La prise de conscience de la toxicité du plomb est également très ancienne et date de l'Antiquité. Les premières descriptions de la colique et de la goutte saturnines sont attribuées à Hippocrate, près de 370 ans avant Jésus-Christ (Waldron, 1966; Jammart, 2006). Tanquerel (1839) est le premier médecin à établir une

description clinique précise de l'intoxication au plomb. Cependant, c'est dans les années 1960 que les premières études épidémiologiques ont évalué la prévalence et la gravité du saturnisme infantile aux États-Unis (Rabin, 1989). La toxicité du plomb est aujourd'hui avérée : même à de petites concentrations, très néfaste à plusieurs organes et tissus humains, dont les systèmes nerveux, rénaux, cardio-vasculaires et les systèmes reproducteurs et immunitaires. Les effets nocifs du plomb incluent aussi des dommages sur le sang où sa demi-vie est limitée à 36 jours. Puis, il va constituer des réserves dans le système osseux, les dents et les phanères avec une demi-vie bien plus longue (entre 10 à 20 ans dans l'os compact) (Nuyts et al. 1991; Dollfus, 2001; Garnier, 2005; Navas-Acien et al. 2006). Au Canada, les efforts considérables déployés pour la réduction des concentrations de plomb dans l'environnement, notamment l'interdiction de la peinture et de l'essence au plomb, ont été d'une grande efficacité. Ainsi, les concentrations de plomb dans les compartiments environnementaux ont décliné drastiquement lors des dernières décennies, de 21 400 tonnes en 1970 à 260 tonnes en 2009, réparties dans différents secteurs d'activités (Tableau 1.2).

**Tableau 1.2**

Profil d'émissions anthropiques de plomb dans l'atmosphère au Canada en 2009  
d'après Santé Canada

Secteur d'activité	Quantité en tonnes (t)	Quantité en (%)
Raffinerie de métaux	181	70
Aviation	44	17
Exploitation minière	9	3
Fer et acier	5	2
Production d'énergie électrique	3	1
Autre	18	7
<b>Totaux</b>	<b>260</b>	<b>100</b>

### 1.3 Les albumines

Afin de connaître les effets des métaux lourds sur les protéines, il nous a fallu, dans un premier temps, sélectionner une protéine modèle dont la structure, les propriétés physico-chimiques et les activités biochimiques dans plusieurs processus sont déjà bien établies, à savoir l'albumine. L'albumine, du latin *albus* qui signifie blanc, est la plus abondante des protéines plasmatiques chez l'homme (HSA) et chez le bovin (BSA). Elle joue un rôle très important dans la régulation et le maintien de la pression osmotique ainsi que dans le transport de nombreuses molécules (acides gras, porphyrines, métal, etc. (Jain, 1993). Elle assure sa fonction grâce à l'existence à sa surface de plusieurs sites de fixation d'affinités variables au niveau desquels elle établit des liaisons avec les molécules qu'elle transporte. Elle est donc indispensable à un grand nombre de mouvements de molécules au sein de l'organisme.

#### 1.3.1 L'albumine du sérum humain (HSA)

L'albumine du sérum humain (HSA de l'anglais *human serum albumin*) est une protéine de 66 kDa (Peters, 1985; Carter et Ho, 1994), sa concentration plasmatique normale est comprise entre 3.5 et 5 g/100 mL et elle constitue jusqu'à 60 % des protéines plasmatiques (Peters, 1996). Sa demi-vie est d'environ 20 jours dans des conditions normales. La structure de HSA se compose de 585 résidus d'acides aminés et d'environ 67 % d'alpha-hélice et aucun feuillet bêta à l'état cristallographique (Otagiri and Chuang, 2009; Guidet, 2009). HSA contient un seul résidu de tryptophane, Trp-214, qui participe à des interactions hydrophobes. Trp-212 dans la BSA et Trp-214 à HSA sont situés dans un environnement hydrophobe proche du sous-domaine IIA (Peters, 1985). HSA contient 6 méthionines et 35 résidus de cystéine dont 34 sont impliqués dans la formation de 17 liaisons disulfure. Le résidu Cys-34 est la seule cystéine libre dans la molécule entière. HSA exerce des fonctions spécifiques en raison de ses multiples capacités de liaison avec les ligands et de ses propriétés de piégeage de radicaux libres (Guidet, 2009).

### 1.3.2 L'albumine sérum bovin (BSA)

L'albumine du sérum bovin (BSA de l'anglais *bovin serum albumin*) est une protéine globulaire de (66 kDa) composée d'une chaîne de 583 résidus d'acides aminés (Peters, 1985). BSA est formée de trois domaines I, II et III divisés en deux sous-domaines (A et B) et contient deux résidus tryptophane, Trp-134 et Trp-212, situées respectivement dans les domaines I et II. Le Trp-212 est entouré d'un milieu hydrophobe tandis que le Trp-134 est situé dans un environnement hydrophile, tout près de la surface de la protéine (Peters, 1985). BSA fixe les acides gras libres, les lipides et les autres composés aromatiques qui peuvent altérer la dénaturation thermique de la protéine (Kinsella et Whitehead, 1989). Aussi, BSA peut jouer un rôle dans l'oxydation des lipides (Smith et al. 1992) et dans le maintien du pH du sang (Figge et al. 1991). BSA est une protéine largement utilisée en recherche de par son analogie structurale avec l'albumine sérique humaine. C'est également le cas dans les études des interactions métal/protéines, où il semblerait qu'elle soit un bon modèle pour prédire l'interaction et l'influence de plusieurs facteurs (Sugio et al. 1999).

### 1.4 Problématiques et objectifs du sujet

Dans un contexte mondial où les questions environnementales s'imposent de manière récurrente sur la scène publique, il est important de mieux comprendre les procédés par lesquels les organismes vivants s'ajustent à un milieu en changement constant. La dégradation ininterrompue des écosystèmes, au cours des dernières décennies, constitue une dimension environnementale très préoccupante pour l'avenir de notre planète. Les émissions anthropiques, liées aux activités humaines n'ont cessé d'augmenter, notamment depuis la fin du 19<sup>e</sup> siècle. L'extraction et l'utilisation intensive d'éléments métalliques naturellement présents, dans le but d'améliorer et d'accompagner nos besoins quotidiens et ceux de l'industrie, ont complètement bouleversé les cycles biologiques naturels. Les substances polluantes présentes dans le sol sont extrêmement nombreuses et au nombre des plus toxiques figurent les métaux lourds. Leur présence dans l'environnement, et plus particulièrement dans les sols, est un

phénomène sans précédent dans l'histoire de l'humanité, compte tenu de leur quantité et leur diversité. Cependant, une prise de conscience des risques liés à l'utilisation des métaux lourds s'est développée suite à de nombreuses études scientifiques portant sur leur identification, leur comportement, leur transfert dans le sol ainsi que leur devenir dans l'environnement (Sposito, 1989; Colandini, 1997; Hills, 1998; Strawn et Sparks, 1999; Winiarski et Lassabatère, 1999; Jordan et al. 2005). Au Canada, elle a aussi conduit à l'adoption et à la mise en œuvre de plusieurs textes réglementaires fixant des objectifs pour limiter, diminuer et même supprimer certains de ces polluants (Sainio et al. 2000; art 16; voir : santé canada).

L'importance des métaux lourds pour les êtres vivants est bien connue, nombre d'entre eux sont essentiels à l'organisme et à de nombreuses fonctions biologiques. Ils sont associés à la croissance et au métabolisme cellulaire de la plante (Lovley and Lloyd, 2000). Un certain nombre, dont le Pb, sont toxiques et sans aucun effet bénéfique, ni pour l'environnement ni pour les êtres vivants, même à des petites concentrations. Le plomb a eu dans le passé un usage répandu dans diverses applications industrielles. Il a grandement participé à l'évolution de nos sociétés. Son utilisation, intensive et non contrôlée, a conduit à son omniprésence dans tous les compartiments des écosystèmes.

Parmi les nombreuses contraintes environnementales auxquelles les végétaux font face, l'agression par des métaux lourds revêt d'une importance majeure. La sécurité alimentaire est une préoccupation de plus en plus importante dans le monde. En réaction à un nombre croissant de crises et pour répondre aux inquiétudes des consommateurs, les gouvernements redoublent d'effort pour améliorer la sécurité des aliments et prévenir ou réduire les effets toxiques des métaux lourds. Les plantes, premiers éléments des chaînes alimentaires, ont toujours figuré au premier plan des ressources naturelles indispensables à la vie de l'homme. De ce fait, les plantes ont toujours été soumises aux aléas environnementaux. Au fil de leur évolution, elles ont développé des capacités d'adaptation et de résistance importantes (Schlichting, 1986).

Dans ce contexte général, l'objectif principal de cette thèse est de contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes d'actions qui sous-tendent l'exposition au stress provenant de métaux lourds par l'activité photosynthétique des plantes. Le plomb a été choisi comme un facteur de stress végétal représentant les métaux lourds. La pollution par le Pb est devenue une préoccupation mondiale d'importance majeure. L'étude de la toxicité de Pb, avec des concentrations réalistes (à partir de 10  $\mu\text{M}$ ), vise à bien comprendre ses particularités dans le but de limiter au mieux ses effets sur la santé publique. Les interactions plante-métal constituent un champ d'études pertinent au regard d'une grande variété d'effets néfastes se traduisant par une forte perturbation des processus photosynthétiques. Malgré le grand nombre d'études réalisées au sujet des effets de Pb sur les plantes et particulièrement sur la photosynthèse, l'effet sur le transfert d'électrons ainsi que sur les sites et modes d'actions au niveau du PSI et PSII restent méconnus. De ce fait, pour mieux comprendre les sites et modes d'action du Pb sur les membranes photosynthétiques de la plante, trois étapes sont envisagées :

1. Déterminer les sites de liaison et les modes d'interaction entre le Pb et les protéines d'albumine. Les albumines sont des protéines modèles pour étudier les interactions métal/protéine. Le choix des albumines, albumine du sérum humain (HSA) et albumine du sérum bovin (BSA), a été fait en raison de : leur poids moléculaire modéré (66 kDa), leur forme globulaire, leur rôle dans le transport de divers ions et molécules dans le sang, leur structure bien caractérisée et leur faible coût. Notre objectif est d'évaluer la capacité du Pb à éteindre la fluorescence intrinsèque et leurs constantes de fixation ( $K_{SV}$ ), en plus de leurs modes de liaison à travers la technique de XPS.
2. Déterminer les sites d'action du Pb sur l'activité photosynthétique du PSII. Pour cela, des échantillons de thylakoides seront traités par diverses concentrations de Pb. De plus, les différents résultats spectroscopiques, à savoir la thermoluminescence, la fluorescence, l'induction de fluorescence et le déclin de fluorescence, seront analysés et comparés avec les résultats obtenus avec d'autres métaux lourds ce qui nous permet de déduire les modes exacts d'action du Pb sur le PSII.



3. Déterminer les sites d'action du Pb sur l'activité photosynthétique du PSI. Pour cela, des échantillons des fragments membranaires enrichis en PSI seront traités par diverses concentrations de Pb. Par la suite, les différents résultats obtenus par des techniques spectroscopiques, à savoir FTIR, fluorescence, XPS et la photooxydation du P700, seront analysés et comparés avec des résultats obtenus avec d'autres métaux lourds ce qui nous permet de déduire les modes exacts d'action du Pb sur le PSI.

## CHAPITRE II

### MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

Le présent chapitre a pour fonction de décrire les matériaux et les techniques de caractérisation utilisés pour réaliser cette étude. Nous débuterons par une description des produits et matériaux utilisés. Ensuite, nous présenterons les différentes techniques d'analyse de même que les différents appareillages et logiciels utilisés.

#### 2.1 Matériel utilisé

Les albumines, HSA et BSA, ainsi que le  $\text{PbCl}_2$  ont été obtenues commercialement (de : Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) et utilisées sans aucune purification supplémentaire.

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

#### 2.2 Isolation des membranes de thylakoïdes

Les échantillons des membranes de thylakoïdes ont été préparés à partir des feuilles d'épinards selon la méthode décrite par Joly et al. (2005). Après isolation, le culot contenant les membranes de thylakoïdes a été suspendu dans un tampon contenant 50 mM Hepes NaOH (pH 7.6), 0.33 M sorbitol, 2 mM EDTA, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM NaCl et 10 mM KCl. L'incubation des membranes de thylakoïdes avec  $\text{PbCl}_2$  a été effectuée à la température ambiante dans l'obscurité. La concentration en *Chl* de la

suspension a été évaluée par la méthode de Porra et al. (1989) à l'aide de l'équation suivante :

$$[\text{Chl}] \text{ en mg mL}^{-1} = 0.5 \times [(7.34 A_{663}) + (17.76 A_{647})] \quad (2.1)$$

Le résultat obtenu représente la concentration totale en chlorophylle a et b dans notre échantillon en  $\text{mg mL}^{-1}$ .

### 2.3 Isolation des membranes enrichies en PSI

Les fractions membranaires enrichies en PSI ont été isolées à partir des feuilles d'épinards selon la méthode de Peters et al. (1983) avec quelques modifications (Harmonis et al. 2011). Après la préparation des membranes de thylakoïdes, ces dernières ont été suspendues dans un tampon contenant 20 mM Tricine-KOH (pH 7.8), 250 mM sorbitol, 10 mM NaCl, 10 mM KCl et 5 mM  $\text{MgCl}_2$ . L'échantillon à une concentration finale de 2 mg *Chl*/ml a été incubé à la noirceur pendant 30 minutes en présence de digitonine 0.2 % (m/v). Les membranes de thylakoïdes traitées ont alors été diluées par un facteur de 3 dans le tampon, puis centrifugées à  $42\,000 \times g$  pendant 30 minutes pour précipiter les membranes non-solubilisées dans le détergent. Le surnageant obtenu a été centrifugé à  $150\,000 \times g$  pendant 1 heure. Ensuite, le culot qui contenait les lamelles du stroma a été suspendu dans un tampon contenant 20 mM Tricine-KOH (pH 7.8), 10 mM NaCl, 10 mM KCl et 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , avant d'être congelé à  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  jusqu'à son utilisation. Les fractions membranaires obtenues contenaient également le cytochrome b6f et la plastocyanine (PC), mais étaient dépourvues de PSII (Peters et al. 1983; Jansson, 1999). Enfin, la concentration en chlorophylle a été déterminée selon la méthode de Porra et al. (1989) et le ratio *Chla/Chlb* a toujours été d'une valeur plus grande que 6.

### 2.4 Préparations des albumines

Les protéines albumines (HSA et BSA) ont été dissoutes dans une solution aqueuse de (40 mg/mL ou 0.5 mM) contenant un tampon Tris-HCl de 10 mM à pH 7.2.

La concentration protéique a été déterminée par spectrophotométrie en utilisant le coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon$ ) de  $36\,500\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  à 280 nm selon la méthode de Painter et al. (1998). Les protéines des albumines ont été utilisées sans enlever les molécules des acides gras, ce qui représente une situation plus proche de la réalité *in vivo*; 0.1 à 2 acides gras sont liés à l'albumine dans des conditions physiologiques normales selon Carter et Ho (1994) et Curry et al. (1999).

## 2.5 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (ou FTIR : *Fourier Transform Infra Red Spectroscopy*) est une technique basée sur l'absorption de radiations électromagnétiques infrarouges moyennes (typiquement  $400 - 4000\text{ cm}^{-1}$ ) par une molécule, ce qui induit une transition vibrationnelle et/ou rotationnelle. On parle de spectroscopie infrarouge lorsque le rayonnement incident a une longueur d'onde de l'ordre du micromètre et que seules les énergies vibrationnelles et rotationnelles des molécules sont modifiées. En effet, lorsqu'un matériau quelconque est frappé par un faisceau infrarouge, les différents groupements chimiques présents dans sa structure s'excitent et vibrent en absorbant de l'énergie à une fréquence qui leur est propre dans le domaine infrarouge. De ce fait, l'analyse du spectre obtenu par spectroscopie FTIR permet de tirer des conclusions sur la structure chimique d'un matériau en repérant les différentes bandes d'absorption. De nombreuses méthodes physiques permettent d'obtenir des informations sur la structure des protéines. Toutefois, lorsqu'on désire analyser la structure secondaire, la spectroscopie infrarouge est une technique de choix. En effet, les appareils sont généralement simples à utiliser, la prise d'un spectre s'effectue en quelques minutes seulement avec une très faible quantité de protéines. De plus, les spectres de protéines contiennent des bandes amide dont l'intensité et la forme sont directement liées à la structure secondaire de protéine. Chacune de ces bandes correspond à une somme de plusieurs composantes qui peuvent être associées à une structure secondaire de la protéine (Tableau 2.1).

**Tableau 2.1**

Bandes des différents amides avec leur longueur d'onde et assignement en infrarouge

<b>Bandes</b>	<b>Longueur d'onde (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Assignement</b>
Amide VI	535-605	Déformation hors du plan (C=O)
Amide V	630-800	Déformation hors du plan (N-H)
Amide IV	625-767	Déformation : 40 % (O=C-N) / autre modes : 60 %
Amide III	1220-1330	Déformation : 30 % (C-N); 30 % (N-H); 10 % (O=C-N); élongations : 10 % (C=O); autres modes : 20 %
Amide II	1480-1575	Déformation : 60 % (N-H); élongations : 40 % (C-N)
Amide I	1600-1700	Déformation : 10 % (N-H); élongations : 80 % (C=O); 10 % (C-N)
Amide A	3250-3300	Élongation (N-H)
Amide B	3100	Élongation (N-H) en résonance avec l'amide II

### 2.5.1 FTIR pour les albumines

Pour nos études en spectroscopie infrarouge, on a fait usage d'un spectrophotomètre FTIR de type Nicolet Impact 420 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) équipé d'un détecteur de type DTGS (*deuterated triglycine sulfate*) et d'un séparateur de faisceau KBr en utilisant des fenêtres de AgBr. Les spectres comptent 40 balayages acquis avec une résolution de 2 cm<sup>-1</sup> recueillant des données entre 4000 - 600 cm<sup>-1</sup>. Ils ont été acquis à partir de films uniformes hydratés, préparés sur des fenêtres de KBr avec une période d'incubation de 2 heures à la température ambiante. La solution des échantillons était de 100 µL. La solution de PbCl<sub>2</sub> a été ajoutée goutte à goutte, en agitant constamment, à la solution des albumines (HSA et BSA) pour assurer la formation d'une solution homogène et pour atteindre les concentrations cibles de Pb<sup>2+</sup>, à savoir : 0.125, 0.250 et 0.500 mM avec une concentration finale en protéines de 0.25 mM. Les spectres de différence [(Albumines + Pb<sup>2+</sup>) - (Albumines)] ont été générés en utilisant la bande de combinaison de l'eau vers 2300 cm<sup>-1</sup>. L'intensité et la position de cette bande est invariable lors de la formation d'un complexe, elle est donc généralement utilisée comme standard interne selon la méthode de Dousseau et al. (1989). Lors de la

production des spectres de différence, cette bande a été ajustée au niveau de référence, afin de normaliser les spectres de différence. La précision de cette méthode de soustraction a été testée en utilisant plusieurs échantillons contrôles possédant les mêmes concentrations des albumines et de plomb, lesquels ont démontré la formation de la même ligne de base. Ces différences spectrales, obtenues entre les albumines libres et leurs complexes avec  $Pb^{2+}$  pour différentes concentrations en  $PbCl_2$ , ont permis de caractériser la nature de l'interaction Albumine-  $Pb^{2+}$ .

### 2.5.2 FTIR pour les membranes de PSI

Pour les mesures de spectre IR du PSI avec  $Pb^{2+}$ , on a fait usage du même spectrophotomètre FTIR. Les spectres ont été préparés à la température ambiante, sous lumière verte sur des fenêtres de KBr et avec une période d'incubation de 4 heures. Le milieu d'analyse de 100  $\mu$ L contenait 40 mM HEPES KOH (pH 7.6), 0.3 M de sorbitol, 5 mM  $MgCl_2$ , 5 mM de NaCl, 1 M de glycine bêtaïne, avec une concentration finale en chlorophylle de 1 mg *Chl*/mL pour les membranes de PSI, et de 0.125, 0.250 et 0.5 mM pour celle avec  $Pb^{2+}$ . Les spectres de différence [(PSI +  $Pb^{2+}$ ) - (PSI)] ont été générés en utilisant la bande de combinaison de l'eau vers  $2300\text{ cm}^{-1}$  (Dousseau et al. 1989). Lors de la production des spectres de différence, cette bande a été ajustée au niveau de référence, afin de normaliser les spectres de différence. Comme pour les albumines, la précision de cette méthode de soustraction a été testée en utilisant plusieurs échantillons contrôles possédant les mêmes concentrations des membranes de PSI et différentes concentrations de plomb, lesquels ont démontré la formation de la même ligne de base. Ces différences spectrales, obtenues entre les membranes de PSI libres et leurs complexes avec  $Pb^{2+}$  pour différentes concentrations en  $PbCl_2$ , ont permis de caractériser la nature de l'interaction PSI-  $Pb^{2+}$ .

### 2.5.3 Analyse de la structure secondaire par FTIR

L'analyse de la structure secondaire des protéines (HSA, BSA et PSI) et de leurs complexes avec le  $Pb^{2+}$  a été effectuée selon la méthode de Byler et Susi (1986). La

structure secondaire des protéines est déterminée à partir de la forme de la bande amide I localisée vers  $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ . L'étude structurale d'une protéine à partir des bandes amide est souvent compliquée. En effet, les différentes composantes d'une même bande se chevauchent et rendent ainsi l'analyse difficile. Heureusement, certaines techniques ont été mises au point afin d'augmenter la résolution du spectre, dans la région de  $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ , telles que la déconvolution par transformée de Fourier (Kauppinen et al. 1981). De ce fait, ce sont des traitements mathématiques effectués sur le spectre qui permettent d'augmenter la résolution en séparant les différentes composantes d'une bande. La quantification des aires des différentes composantes de la bande amide I, révélées par l'autodéconvolution et dérivée seconde, a été possible en utilisant le programme Spectra Calc (Grams AI software : *Galactic Industries Corporation*, Salem, New Hampshire, USA), par l'entremise d'un ajustement de courbe itératif du moindre carré utilisé pour adapter la forme de la ligne Gaussienne au spectre entre  $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ . Les courbes résultantes de la déconvolution ont été analysées en assignant chaque bande à une structure secondaire selon la fréquence de son maximum: feuillet  $\beta$  parallèle ( $1614\text{-}1637\text{ cm}^{-1}$ ), structure désordonnée ou pelote statistique ( $1638\text{-}1648\text{ cm}^{-1}$ ), hélice  $\alpha$  ( $1654\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$ ), coude  $\beta$  ( $1670\text{-}1678\text{ cm}^{-1}$ ) et feuillet  $\beta$  antiparallèle ( $1680\text{-}1691\text{ cm}^{-1}$ ). La superficie de l'aire attribuée à chacune des conformations données a été divisée par l'aire totale de la bande amide et le nombre obtenu correspond à la proportion de cette conformation dans la protéine. Ces attributions de structure secondaire concordent avec les valeurs déterminées théoriquement par Krimm et Bandekar (1986) ainsi qu'expérimentalement par Byler et Susi (1986).

## 2.6 Spectroscopie de dichroïsme circulaire (CD)

La spectroscopie de dichroïsme circulaire (CD) mesure la différence d'absorption par un composé de la lumière polarisée circulant à gauche et à droite de la même amplitude et de la même intensité, et ceci en fonction de la longueur d'onde. La mesure de cette différence d'absorption, qui dépend fortement de l'arrangement des atomes au sein de la molécule, permettra donc d'obtenir des informations sur la conformation des

différents chromophores (Woody, 1995; Kelly et al. 2005). Dans les protéines, les chromophores d'intérêt pour la technique de dichroïsme circulaire sont de trois types: les ponts disulfures (absorption autour de 260 nm), les liaisons peptidiques et les chaînes latérales des acides aminés aromatiques.

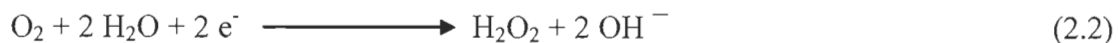
Les spectres de CD ont été mesurés avec un spectropolarimètre Jasco J-720 (Jasco, Easton, Maryland, USA) en utilisant une cuvette en quartz avec un parcours optique de 0.01 cm; les spectres ont été mesurés pour les albumines libres (HSA et BSA) (12.5  $\mu$ M) et pour chacun des complexes formés avec  $PbCl_2$  (0.125, 0.25 et 0.5 mM) dans une atmosphère d'azote. Les spectres comptent 5 balayages accumulés avec une vitesse de 50 nm par minute recueillant des données à tous les nm de 180 à 260 nm; la température des échantillons a été gardée à  $25.0 \pm 0.5$  °C grâce à un bain thermostat Neslab RTE-111 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) connecté à la cuvette en quartz. Les spectres de CD ont été corrigés avec le signal du tampon, tandis que leur conversion en unité Mol CD ( $\Delta\epsilon$ ) a été effectuée avec le programme Jasco Standard Analysis (Jasco, Easton, Maryland, USA). La structure secondaire des protéines a été calculée en utilisant des prédictions de différentes portions de structure secondaire, soit en comparant plusieurs gammes de protéines possédant toutes les données de diffraction de rayons X de haute qualité selon Johnson (1999) et Sreerama et Woody (2000), grâce au programme CDSSTR fourni dans le logiciel CDPro disponible sur le site internet : <http://amar.colostate.edu/~sreeram/CDPro>.

## 2.7 Mesure de consommation d'oxygène

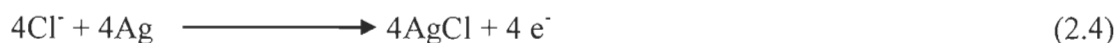
Dans le but d'estimer l'activité du PSI, le taux de consommation d'oxygène a été mesuré en utilisant l'électrode d'oxygène de Clark (Hansatech, King's Lynn, GB) (Figure 2.1). Ce type d'électrode est constitué d'une anode d'argent et d'une cathode de platine jointes par un pont de KCL. Une membrane perméable à l'oxygène les sépare du milieu de réaction. Sous illumination, le PSI induit le transport d'électrons. En appliquant un potentiel suffisant (0.7 V) entre l'anode et la cathode, il y a formation de



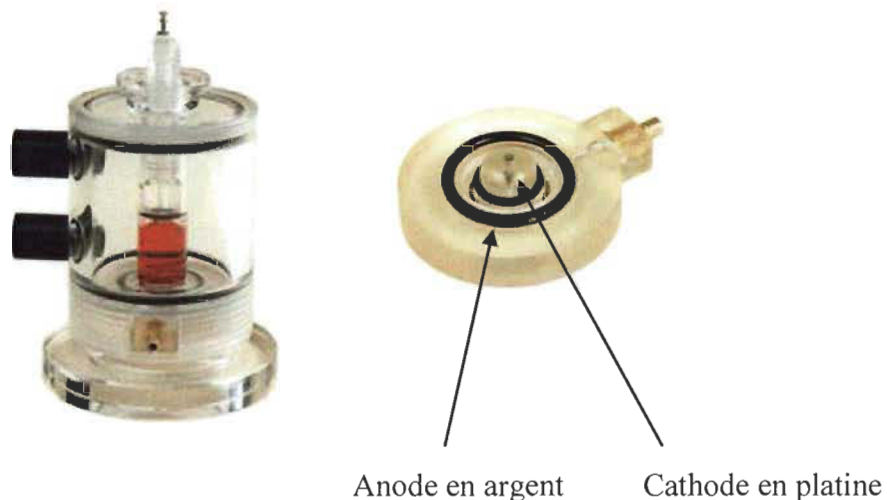
peroxyde d'hydrogène provenant de l'oxygène réduit à la surface du platine de l'électrode suivant cette réaction :



La perte des électrons au niveau du platine au profit de l'oxygène contribue à dissiper la différence de potentiel entre l'anode et la cathode. Le courant électrique, dirigé vers l'enregistreur, est directement proportionnel à la consommation d'oxygène survenant à la cathode.



Le courant électrique qui découle de la différence de potentiel entre l'anode et la cathode lorsque les électrons sont donnés à l'oxygène est acheminé vers un amplificateur qui est relié à un enregistreur pour mesurer l'activité photosynthétique du PSI. La température dans la cellule à dégagement d'oxygène est maintenue à  $24.5 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$  grâce à un bain thermostat afin de limiter la variabilité de la température qui peut fausser les mesures.



**Figure 2.1** Électrode de Clark.

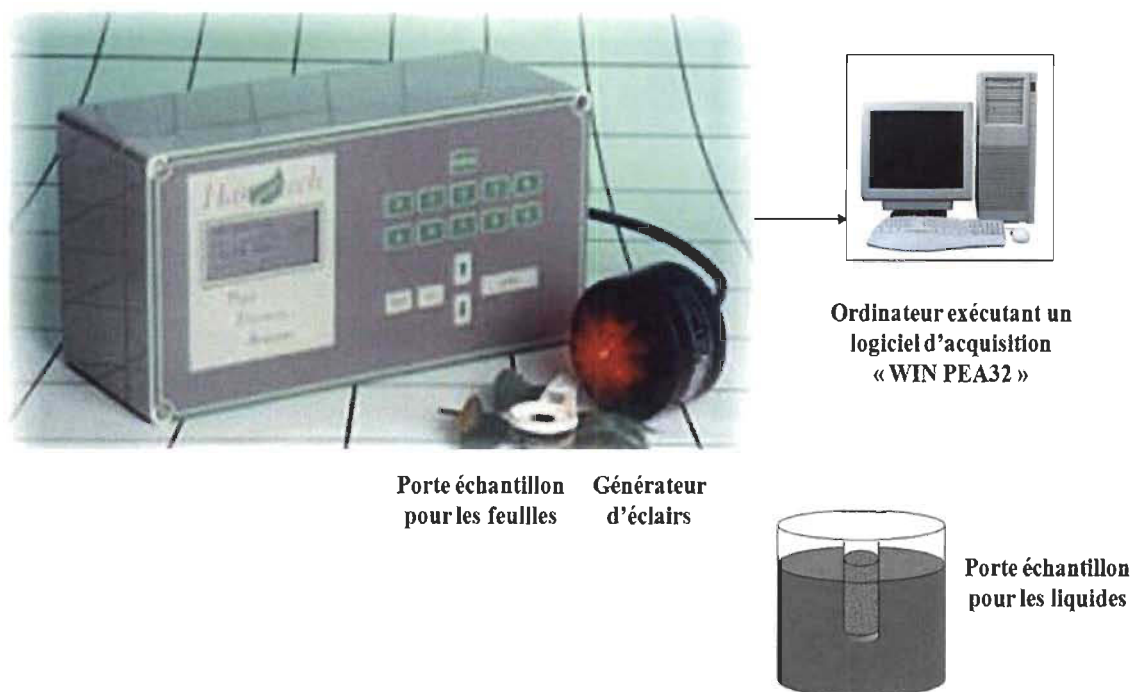
Les échantillons des membranes de PSI (10  $\mu\text{g}$  de *Chl*/ml) et de leurs complexes avec  $\text{Pb}^{2+}$  ont été éclairés par une lumière actinique blanche (150 W). Le milieu d'analyse contenait 20 mM Tricine-KOH (pH7.8), 10 mM NaCl, 10 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 500  $\mu\text{M}$  MV, 1 mM  $\text{NaN}_3$ , 100  $\mu\text{M}$  DCIP (ou 50  $\mu\text{M}$  TMPD), 1 mM ascorbate et 50  $\mu\text{M}$  DCMU.

## 2.8 Mesure des spectres de fluorescence

Le spectrofluorimètre est l'outil de mesure classique des spectres de fluorescence d'une solution. On distingue trois types de spectre de fluorescence : les spectres d'excitation, d'émission et d'excitation-émission. Les spectres d'émission de fluorescence à température ambiante ( $25.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ) ont été mesurés avec un spectrofluorimètre Perkin-Elmer LS55 équipé d'un photomultiplicateur R928 sensible à la portion rouge du spectre. Le signal d'émission de fluorescence est collecté et amplifié par le photomultiplicateur, placé derrière un monochromateur, à  $90^\circ$  du faisceau incident afin que celui-ci ne perturbe pas la mesure. La lampe au xénon permet une excitation relativement stable de 250 nm jusqu'à l'infrarouge. La fluorescence chlorophyllienne a été excitée à 436 nm et les albumines à 280 nm. La lumière incidente passe en premier lieu dans un monochromateur qui balaie les gammes de longueurs d'onde définies par l'utilisateur: elle traverse ensuite un polarisateur rotatif (ou analyseur) qui oriente le champ électrique de la lumière. Enfin, elle pénètre les fentes d'excitation et d'émission du fluorimètre qui étaient réglées à 5 et 2.5 nm respectivement. La concentration finale en *Chl* est de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  alors que celle des albumines est de 7.5  $\mu\text{M}$ . La détection du signal à la sortie se fait par décompte des photons. Les spectres d'émission ont été corrigés en fonction de la sensibilité du photomultiplicateur en utilisant le spectre de correction fourni par Perkin-Elmer. L'analyse et le traitement des spectres de fluorescence ont été faits par le logiciel Sigmat Plot (SSI, Richmond, Californie, É.-U.).

## 2.9 Mesure d'induction de fluorescence (IF)

Les cinétiques d'induction de fluorescence des échantillons de thylakoïdes ont été mesurées avec le Plant Efficiency Analyser (PEA : Hansatech, King' Lynn, Norfolk, UK) à la température de la pièce. Ces échantillons ont été dilués à une concentration finale de  $25 \mu\text{g Chl mL}^{-1}$  dans un tampon contenant 50 mM Hepes-NaOH (pH 7.6), 0.33 mM sorbitol, 2 mM EDTA, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM  $\text{MnCl}_2$ , 10 mM KCl et 10 mM NaCl. Le milieu d'analyse est une cellule cylindrique d'un volume total de 1 mL où l'on introduit un agitateur magnétique afin d'assurer une bonne homogénéisation avant chaque prise de mesure. Les échantillons ont été adaptés à la noirceur pendant 1 minute à température pièce et ont été excités avec une lumière actinique rouge (655 nm et intensité de  $1800 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) fournie par six diodes émettrices de lumière (DEL). La fluorescence a été détectée par une photodiode de type PIN après un passage dans un filtre de 50 % de transmission de lumière rouge lointain à 720 nm. Comme le signal de fluorescence obtenu dans les premières 40  $\mu\text{s}$  est attribué à des artefacts dus au temps de réponse de l'instrument, ces données n'ont pas été incluses dans l'analyse des courbes d'induction de fluorescence. Donc, le signal à 40  $\mu\text{s}$  est pris comme  $F_0$ , la fluorescence initiale. La fluorescence variable  $F_v$ , soit la différence entre la fluorescence minimale  $F_0$  et la fluorescence maximale  $F_m$  dans les échantillons, a été utilisée pour calculer les ratios  $F_v/F_m$ . Pour le transfert et l'analyse de données, le programme Biolyzer (R. Maldonado-Rodriguez, Laboratoire de bioénergétique, Université de Genève) a été utilisé.



**Figure 2.2** Dispositif expérimental pour les mesures d'induction de fluorescence PEA (*Plant Efficiency analyser*), source lumineuse en mode *on*, porte-échantillon pour les feuilles et pour les liquides et un ordinateur exécutant un logiciel d'acquisition.

## 2.10 Cinétique de déclin de fluorescence induite par flash

Les mesures de déclin de fluorescence de la *Chl* et sa relaxation dans la noirceur ont été effectuées avec un fluorimètre FL3500 (Photon Systems Instruments, Brno, Czech Republic) dans les membranes de thylakoïdes afin de détecter les cinétiques d'oxydo-réduction de  $Q_A$  comme décrit par Putrenko et al. (1999) et par Ono et al. (1995). Le milieu d'analyse a été d'un volume total de 1 mL, dans un tampon contenant : 400 mM sucrose, 20 mM MES-NaOH (pH 6.3), 15 mM NaCl, 10 mM  $MgCl_2$  ainsi que 25  $\mu g$  *Chl*/mL et une concentration spécifique de  $Pb^{2+}$  (0, 10, 100, 1000 et 2000  $\mu M$ ). Les échantillons, sans ou en présence de 50  $\mu M$  de DCMU, ont été adaptés à la noirceur pendant 3 minutes à température ambiante et ont été excités avec un seul flash saturant de 1 minute à 625 nm généré par la XST 103 flash lamp (Walz, Effeltrich, Germany). Pour l'analyse et le traitement de données, le programme WinControl (Walz, Effeltrich, Germany) a été utilisé.

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

$$F(t) = F_0 + A_1 e^{-K_1 t} + A_2 e^{-K_2 t} + A_3 e^{-K_3 t} \quad (2.5)$$

où  $F(t)$  est la fluorescence à un temps  $t$ ,  $F_0$  est la fluorescence minimale stable à la fin du déclin,  $K_n$  est le taux de la constante de vitesse,  $A_n$  est l'amplitude des phases de relaxation de la fluorescence.

### 2.11 Mesure de thermoluminescence (TL)

Les mesures de thermoluminescence des échantillons des membranes de thylakoïdes ont été effectuées avec un équipement construit dans notre laboratoire comme décrit par Ducruet, (2003) et Gauthier et al. (2006). Le milieu d'analyse a été d'un volume total de 300  $\mu$ L, dans un tampon contenant 50 mM Hepes NaOH (pH 7.6), 0.33 M sorbitol, 2 mM EDTA, 1 mM  $MgCl_2$ , 1 mM  $MnCl_2$ , 10 mM KCl et 2 mM NaCl, avec une concentration finale en chlorophylle de 200  $\mu$ g *Chl*/mL. L'échantillon d'analyse a été mis dans un porte-échantillon de 15 mm de diamètre relié directement à une plaque thermoélectrique à effet Peltier (Duratec, Marlow industries Inc., Dallas, TX, USA) qui permet la régulation de la température durant l'expérience. Le porte-échantillon a été couvert par un disque de verre (Hellma 202-OS) et a été fermé par un couvercle qui laissait passer le guide à fibre optique relié à un photomultiplicateur (PMT) analogue sensible à la lumière (Hamamatsu H7711-50, Ichino, Japon). Pour éviter un endommagement du PMT par le chauffage de l'échantillon durant l'expérience, on a utilisé les bras d'un guide ayant cinq fibres optiques fournies par Walz (Effeltrich, Germany) dont on ne laissait ouvert que celui utilisé pour transmettre la luminescence récupérée auprès des échantillons. Le dispositif expérimental était entièrement contrôlé par un ordinateur avec un logiciel d'acquisition de données qui permettait l'activation de sources lumineuses, le réglage des températures d'incubation

des échantillons et l'acquisition du signal de luminescence provenant d'échantillons photosynthétiques avec des taux de chauffage prédéfinis. La carte d'acquisition PG8112 A/D (National instruments, Austin, TX), qui est un convertisseur analogique-numérique, avec 12 bits de résolution, a été utilisée pour transmettre les commandes du logiciel vers l'équipement. Pour enregistrer l'émission de TL des membranes de thylakoïdes, un photomultiplicateur (EMI9558B) analogue sensible à la lumière fonctionnant avec ORIEL 70705 (Newport, Stratford, CT) a été utilisé.

Avant la prise de mesure, les échantillons, adaptés à la noirceur, ont été pré-incubés à 20 °C pendant 120 s. Ensuite, la température a été ramenée à 2 °C dans 36 s et maintenue pendant 60 s. Deux courts éclairs blancs au xénon (XE-STC, Walz, Effeltrich, Germany), d'une durée de 2  $\mu$ s, ont été appliqués pour initier la séparation de charges dans le PSII. Le chauffage linéaire subséquent de 0 à 65 °C, avec une rampe de 0.5 °C s<sup>-1</sup>, des échantillons dans le noir total a activé la recombinaison des paires de charges du PSII. Ces dernières sont détectables par l'apparence de bandes d'émissions de TL à des températures optimales caractéristiques (Ducruet, 2003; Gauthier et al. 2006).

## **2.12 Mesure des changements d'absorption à 830 nm**

La photooxydation et la réduction de la chlorophylle spéciale du PSI (P700) ont été mesurées par le changement d'absorption à 830 nm ( $\Delta A_{830}$ ) à l'aide d'un fluorimètre PAM-101 (PAM: *Pulse Amplitude Modulated* Chl Fluorimètre de Walz, Effeltrich, Allemagne) équipé d'une unité ED-P700DW. Cette unité est un appareil à double détecteur de longueur d'onde, qui détecte strictement les changements d'absorbance différentiels entre 810 nm et 860 nm, avec un maximum à 830 nm pour le cation radical P700<sup>+</sup>, mais ne détecte pas l'absorbance de la plastocyanine (Azioune 2005; Belatik et al. 2012). Une lumière rouge lointaine de (75  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) pour nos mesures a été obtenue en faisant passer le faisceau d'une source lumineuse Filtre-Lite (Microview, Thornhill, ON, Canada) à travers un filtre RG-9 (Schott, Mainz, Germany). Le milieu d'analyse contenait 20 mM Tricine-KOH (pH 7.8), 10 mM NaCl, 10 mM KCl et 5 mM MgCl<sub>2</sub>,

avec une concentration finale en *Chl* de 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Toutes les mesures ont été prises à la température de la pièce.

### 2.13 La spectroscopie des photoélectrons X (XPS)

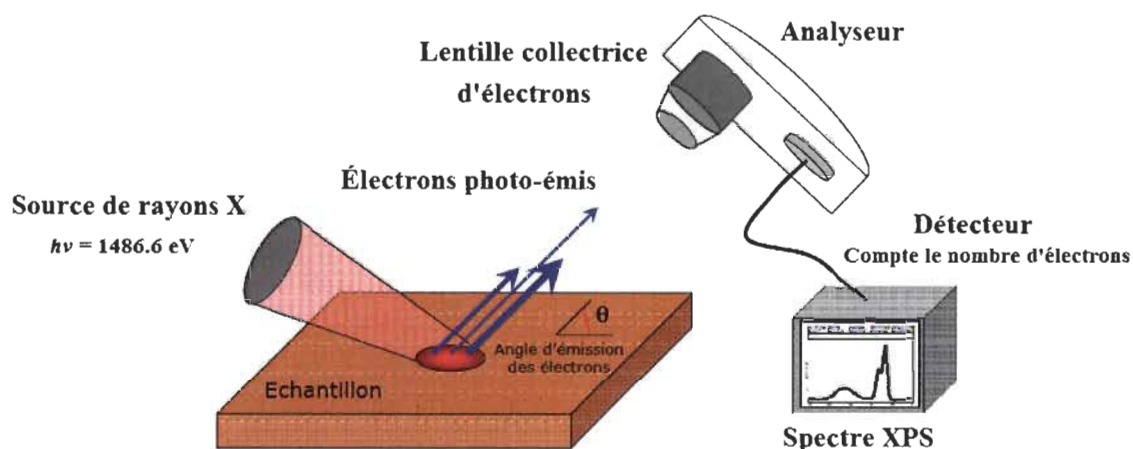
La spectroscopie des photoélectrons induits par rayons X (XPS de l'anglais *X-ray Photoelectron Spectroscopy*), aussi appelée spectroscopie d'électrons pour l'analyse chimique (ESCA de l'anglais *Electron Spectroscopy for Chemical Analysis*), est une technique d'analyse de surface qui permet de déterminer la composition chimique du matériau étudié dans une profondeur variant entre 1 et 10 nm. Cette technique consiste à irradier une surface donnée, zone par laquelle le matériau interagit directement avec son environnement, avec un faisceau monochromatique dont l'énergie sert à exciter les électrons des atomes. Ce phénomène de photoémission permet l'analyse des propriétés des matériaux ainsi que la caractérisation de l'environnement chimique des différents atomes. Tous les éléments sauf l'hydrogène et l'hélium sont détectables. Finalement, la XPS est la détermination expérimentale de l'énergie de liaison des électrons de cœur d'atome par l'analyse des photoélectrons produits par l'exposition aux rayons X (Figure 2.5).

#### 2.13.1 Principe

L'interaction de photons, d'un rayonnement électromagnétique X d'énergie  $E = h\nu$ , avec un système moléculaire ou atomique, entraîne l'éjection d'un électron occupant un niveau d'énergie donné d'un échantillon. Cet apport d'énergie, pour peu qu'il soit suffisant, permet aux électrons qui gravitent autour du noyau de rompre l'attraction qui les maintient sur leurs orbitales. En utilisant un faisceau de rayons X sur un échantillon, il est alors possible d'exciter les électrons de multiples niveaux de cœur d'énergies différentes (Laajalehto et al. 1997). L'analyse XPS consiste alors en la mesure du nombre d'électrons émis en fonction de l'énergie cinétique  $E_{cin}$  de ces électrons par la relation suivante :

$$E_L = h\nu - E_{\text{cin}} - W_{\text{travail}} \quad (2.6)$$

où  $E_{\text{cin}}$  est l'énergie cinétique du photoélectron,  $h\nu$  est l'énergie du photon incident,  $E_L$  est l'énergie de liaison du photoélectron par rapport au niveau de Fermi et  $W_{\text{travail}}$  est le travail de sortie du spectromètre. En quantifiant les niveaux d'énergie, les photoélectrons ont une distribution de l'énergie de liaison composée d'une série de bandes discrètes qui reflètent la forme des structures électroniques des atomes dans l'échantillon analysé.



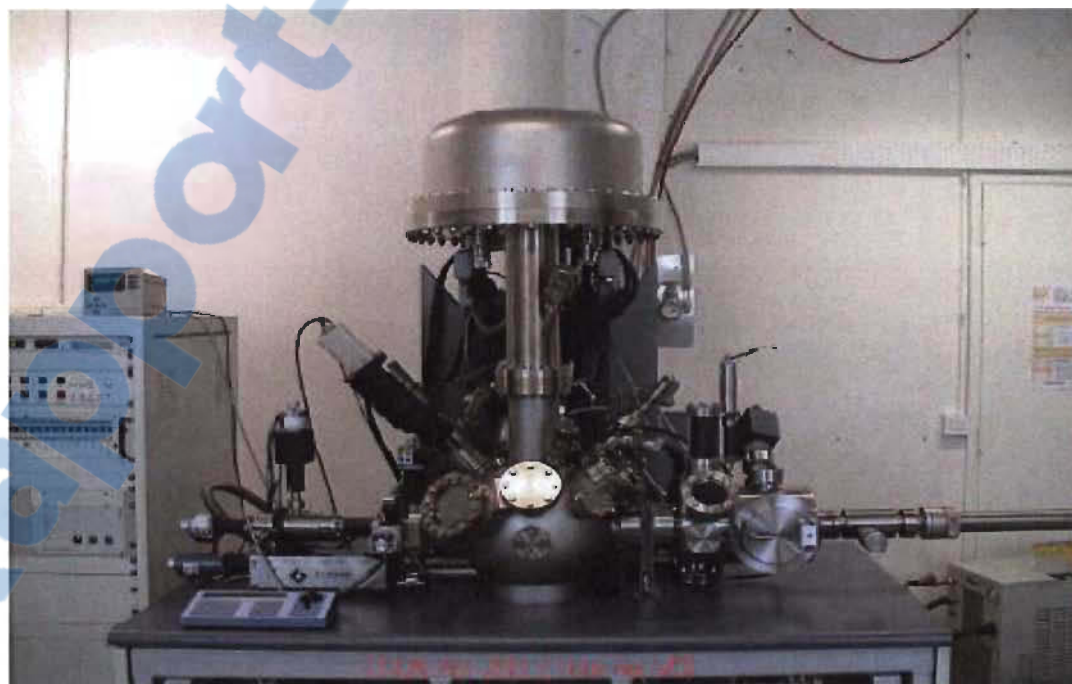
**Figure 2.3** Représentation schématique de l'analyse XPS.

### 2.13.2 Appareillage

Les analyses XPS ont été réalisées avec un appareillage KRATOS Axis Ultra (Kratos Analytical Ltd., UK) possédant un spectromètre avec analyseur d'énergie hémisphérique et équipé d'une source monochromatique d'alimentation en rayons X ( $\text{Al K}\alpha$ ,  $E = 1486,6 \text{ eV}$ ). Il est constitué de deux chambres maintenues sous ultravide, l'une permettant la préparation et l'introduction de l'échantillon, l'autre, maintenue sous vide, étant la chambre d'analyse. Compte tenu des vitesses de comptage élevées, la puissance appliquée à l'anode génératrice de rayons X a pu être limitée à 225 W, réduisant ainsi la possible dégradation de l'échantillon par le rayonnement X. De plus, les spectres ont été recueillis dans le même ordre (Contrôle, C 1s, O 1s et N 1s) de telle sorte que les temps d'exposition aux rayons X étaient équivalents pour tous. Les



échantillons sont placés sur le porte-échantillon d'aluminium, sous forme de pastilles, et séchés dans un dessiccateur sous vide pendant une nuit pour obtenir un film mince sans présence de molécule d'eau. L'analyse XPS est réalisée sous vide à température ambiante et à une pression de l'ordre de  $10^{-9}$  tor. L'acquisition des spectres est réalisée avec un angle d'analyse ( $\theta$ ) des photoélectrons de  $90^\circ$  entre la surface de l'échantillon et la direction de détection des électrons. La surface de l'échantillon était de  $20 \text{ mm}^2$  et la zone étudiée était typiquement de  $1 \times 2 \text{ mm}^2$ . La fonction de travail du spectromètre a été étalonnée à partir de l'énergie de liaison du C1s (C-C) qui est prise comme référence de calibration à 285 eV. Les autres énergies de liaisons trouvées sont ensuite ajustées en fonction de cette valeur. Le spectre sur la gamme complète des énergies de liaison, appelé spectre général, est enregistré à une énergie de passage de 160 eV. Les spectres de haute résolution, représentant les photoélectrons caractéristiques des niveaux de cœur étudiés, sont enregistrés à une énergie de passage de 1 eV. La déconvolution des spectres de haute résolution, consistant à déterminer la répartition des signaux élémentaires représentant les photoélectrons caractéristiques d'une orbitale, d'un atome et d'un environnement chimique donné, a été réalisée avec le logiciel CasaXPS.



**Figure 2.4** Dispositif expérimental de XPS.

## **CHAPITRE III**

### **LOCATING THE BINDING SITES OF PB (II) ION WITH HUMAN AND BOVINE SERUM ALBUMIN**

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en 2012 dans le journal PLOS One: A. Belatik, S. Hotchandani, R. Carpentier and H. A. Tajmir-Riahi, Locating the binding sites of Pb(II) ion with human and bovine serum albumins. Volume 7 Issue 5 e 36723.

### 3.1 Résumé

Le plomb est une toxine puissante de l'environnement qui s'est accumulée au-dessus de son niveau naturel en raison de l'activité humaine. Le Pb cationique montre une grande affinité vers la complexation avec des protéines, et, il a été utilisé comme modulateur des interactions protéine - membrane. Nous avons localisé les sites de liaison de Pb (II) avec de l'albumine sérique humain (HSA) et de l'albumine sérique bovine (BSA) à des conditions physiologiques, en utilisant une concentration constante de protéines et différentes teneurs en plomb. FTIR, UV-visible, CD, fluorescence et la spectroscopie des photoélectrons X ( XPS) ont été utilisés pour analyser les sites de liaison de Pb, la constante de liaison et l'effet de complexation d'ions métalliques sur la stabilité et la conformation des albumines HSA et BSA. L'analyse structurale a montré que Pb se lie fortement aux albumines HSA et BSA via des contacts hydrophiles avec des constantes de Stern Volmer de  $K_{PB-HSA} = 8.2 (\pm 0.8) \times 10^4 M^{-1}$  et  $K_{PB-BSA} = 7.5 (\pm 0.7) \times 10^4 M^{-1}$ . Le nombre de liaison de cation  $Pb^{2+}$  par protéine est de 0.7 pour les complexes HSA et BSA. La spectroscopie XPS nous a permis de situer les sites de liaison de  $Pb^{2+}$  avec les albumines dans les atomes d'azote et d'oxygène. La complexation de Pb modifie la conformation des protéines par une réduction importante des  $\alpha$  - hélice de 57 % (HSA libre) à 48 % (complexe métallique) et de 63 % (BSA libre) à 52 % (complexe métallique) induisant une déstabilisation partielle de la protéine.

### 3.2 Premier article scientifique

#### **Locating the binding sites of Pb(II) ion with human and bovine serum albumins**

A. Belatik, S. Hotchandani, R. Carpentier and H. A. Tajmir-Riahi\*

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

**Key words:** Pb, BSA, HSA, binding, spectroscopy, modeling

**Abbreviations:** HSA, human serum albumin; BSA, bovine serum albumin; FTIR, Fourier transform infrared spectroscopy; CD, circular dichroism; XPS, X-ray photoelectron spectroscopy

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

## Abstract

Lead is a potent environmental toxin that has accumulated above its natural level as a result of human activity. Pb cation shows major affinity towards protein complexation and it has been used as modulator of protein-membrane interactions. We located the binding sites of Pb(II) with human serum (HSA) and bovine serum albumins (BSA) at physiological conditions, using constant protein concentration and various Pb contents. FTIR, UV-visible, CD, fluorescence and X-ray photoelectron spectroscopic (XPS) methods were used to analyse Pb binding sites, the binding constant and the effect of metal ion complexation on HSA and BSA stability and conformations. Structural analysis showed that Pb binds strongly to HSA and BSA *via* hydrophilic contacts with overall binding constants of  $K_{\text{Pb-HSA}} = 8.2 (\pm 0.8) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  and  $K_{\text{Pb-BSA}} = 7.5 (\pm 0.7) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ . The number of bound Pb cation per protein is 0.7 per HSA and BSA complexes. XPS located the binding sites of Pb cation with protein N and O atoms. Pb complexation alters protein conformation by a major reduction of  $\alpha$ -helix from 57% (free HSA) to 48% (metal-complex) and 63% (free BSA) to 52% (metal-complex) inducing a partial protein destabilization.

## Introduction

Pb is a potent environmental toxin that has accumulated 1000-fold above its natural level as a result of human activity [1]. Even though the deadly effects of lead on human health have been known for many years, the molecular mechanism of Pb toxicity is poorly understood. It is known that Pb cation mimics the effects of Ca and Zn at specific molecular targets [2, 3]. Lead toxicity has multifunctional effects on both *in vivo* and *in vitro* photosynthetic CO<sub>2</sub> fixation and long term exposure results in reduced leaf growth, decreased level of photosynthetic pigments, altered chloroplast structure and decreased enzymatic activity of CO<sub>2</sub> assimilation [4, 5]. Furthermore, photosynthesis is one of the most Pb-sensitive process in plants [5]. Therefore to better understand the interaction of Pb with proteins it was of interest to study the complexation of Pb with well known model proteins such as human and bovine serum albumins and determine Pb binding sites and the effect of metal ion interaction on protein structures in aqueous solution.

Serum albumins are the major soluble protein constituents of the circulatory system and have many physiological functions [6]. The most important property of this group of proteins is that they serve as transporters for a variety of organic and inorganic compounds including metal ions. BSA (Scheme 1) has been one of the most extensively studied of this group of proteins, particularly because of its structural homology with human serum albumin (HSA). The BSA molecule is made up of three homologous domains (I, II, III) which are divided into nine loops (L1-L9) by 17 disulfide bonds. The loops in each domain are made up of a sequence of large-small-large loops forming a triplet. Each domain in turn is the product of two subdomains (IA, IB, etc.). X-crystallographic data [7] show that the albumin structure is predominantly  $\alpha$ -helical with the remaining polypeptide occurring in turns and extended or flexible regions between subdomains with no  $\beta$ -sheets. BSA (Scheme 1) has two tryptophan residues that possess intrinsic fluorescence [8]. Trp-134 in the first domain and Trp-212 in the second domain. Trp-212 is located within a hydrophobic binding pocket of the protein and Trp-134 is located on the surface of the molecule. HSA (Scheme 1) is a globular protein composed of three structurally similar domains (I, II and III), each containing two

subdomains (A and B) and stabilized by 17 disulphide bridges [9-10]. Aromatic and heterocyclic ligands were found to bind within two hydrophobic pockets in subdomains IIA and IIIA, namely site I and site II [8-10]. Seven binding sites for fatty acids are localized in subdomains IB, IIIA, IIIB and on the subdomain interfaces [8]. While there are marked similarities between BSA and HSA in their compositions (Scheme 1), HSA has only one tryptophan residue Trp-214, while BSA contains two tryptophan Trp-212 and Trp-134 as fluorophores.

Fluorescence quenching is considered as a useful method for measuring binding affinities. Fluorescence quenching is the decrease of the quantum yield of fluorescence from a fluorophore induced by a variety of molecular interactions with quencher molecule [11]. Therefore, using the quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence of BSA (Trp-212 and Trp-134) and HSA (Trp-214) as a tool allows us to study the interaction of lead cation with serum proteins in an attempt to characterize the nature of Pb-protein complexation.

In this report, we present spectroscopic analysis and XPS study of the interaction of Pb(II) with HSA and BSA in aqueous solution at physiological conditions, using constant protein concentration and various metal ion contents. Structural information regarding Pb binding site and the effect of metal-protein complexation on the stability and conformation of HSA and BSA is reported here.

## **Materials and Methods**

### *Materials*

HSA and BSA fraction V and PbCl<sub>2</sub> were purchased from Sigma Chemical Company (St-Louise, MO) and used as supplied. Other chemicals were of reagent grades and used as supplied.

### *Preparation of stock solutions*

Protein (BSA or HSA) was dissolved in aqueous solution (40 mg/ml or 0.5 mM) containing 10 mM Tris-HCl buffers (pH 7.2). The protein concentration was determined spectrophotometrically using the extinction coefficient of  $36\,500\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  at 280 nm [12]. A  $\text{PbCl}_2$  solution of 1 mM was prepared in 10 mM Tris-HCl and diluted to various concentrations in Tris-HCl (pH 7.2).

### *FTIR spectroscopic measurements*

Infrared spectra were recorded on a FTIR spectrometer (Impact 420 model), equipped with deuterated triglycine sulphate (DTGS) detector and KBr beam splitter, using AgBr windows. Solution of  $\text{PbCl}_2$  was added dropwise to the protein solution with constant stirring to ensure the formation of homogeneous solution and to reach the target Pb concentrations of 0.125, 0.25 and 0.5 mM with a final protein concentration of 0.25 mM. Spectra were collected after 2h incubation of HSA or BSA with Pb solution at room temperature, using hydrated films. Interferograms were accumulated over the spectral range  $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$  with a nominal resolution of  $2\text{ cm}^{-1}$  and 100 scans. The difference spectra [(protein solution + Pb solution) – (protein solution)] were generated using water combination mode around  $2300\text{ cm}^{-1}$ , as standard [13]. When producing difference spectra, this band was adjusted to the baseline level, in order to normalize difference spectra.

### *Analysis of protein conformation*

Analysis of the secondary structure of HSA and BSA and their  $\text{PbCl}_2$  complexes was carried out on the basis of the procedure previously reported [14]. The protein secondary structure is determined from the shape of the amide I band, located around  $1650\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$ . The FTIR spectra were smoothed and their baselines were corrected automatically using Grams AI software. Thus the root-mean square (rms) noise of every spectrum was calculated. By means of the second derivative in the spectral region  $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$  six major peaks for HSA, BSA and complexes were resolved. The



above spectral region was deconvoluted by the curve-fitting method with the Levenberg-Marquadt algorithm and the peaks corresponds to  $\alpha$ -helix (1660-1654  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\beta$ -sheet (1637-1614  $\text{cm}^{-1}$ ), turn (1678-1670  $\text{cm}^{-1}$ ), random coil (1648-1638  $\text{cm}^{-1}$ ) and  $\beta$ -antiparallel (1691-1680  $\text{cm}^{-1}$ ) were adjusted and the area was measured with the Gaussian function. The area of all the component bands assigned to a given conformation were then summed up and divided by the total area [15,16]. The curve-fitting analysis was performed using the GRAMS/AI Version 7.01 software of the Galactic Industries Corporation.

### *Circular dichroism*

CD Spectra of HSA, BSA and their Pb complexes were recorded with a Jasco J-720 spectropolarimeter. For measurements in the far-UV region (178-260 nm), a quartz cell with a path length of 0.01 cm was used in nitrogen atmosphere. Protein concentration was kept constant (12.5  $\mu\text{M}$ ), while varying  $\text{PbCl}_2$  concentrations (0.125, 0.25 and 0.5 mM). An accumulation of three scans with a scan speed of 50 nm per minute was performed and data were collected for each nm from 260 to 180 nm. Sample temperature was maintained at 25  $^\circ\text{C}$  using a Neslab RTE-111 circulating water bath connected to the water-jacketed quartz cuvettes. Spectra were corrected for buffer signal and conversion to the Mol CD ( $\Delta\epsilon$ ) was performed with the Jasco Standard Analysis software. The protein secondary structure was calculated using CDSSTR, which calculates the different assignments of secondary structures by comparison with CD spectra, measured from different proteins for which high quality X-ray diffraction data are available [17,18]. The program CDSSTR is provided in CDPro software package which is available at the website: <http://lamar.colostate.edu/~sreeram/CDPro->

### *Fluorescence spectroscopy*

Fluorimetric experiments were carried out on a Varian Cary Eclipse. Solutions containing  $\text{PbCl}_2$  1 to 100  $\mu\text{M}$  in Tris-HCl (pH = 7.4) were prepared at room temperature ( $24 \pm 1$   $^\circ\text{C}$ ). Solutions of HSA and BSA containing 7.5  $\mu\text{M}$  in 10 mM Tris-

HCl (pH = 7.2) were also prepared at  $24 \pm 1$  °C. The fluorescence spectra were recorded at  $\lambda_{\text{exc}} = 280$  nm and  $\lambda_{\text{em}}$  from 287 to 500 nm. The intensity at 347 nm (tryptophan) was used to calculate the binding constant ( $K$ ) according to previous literature reports [19-24].

On the assumption that there are ( $n$ ) substantive binding sites for quencher ( $Q$ ) on protein ( $B$ ), the quenching reaction can be shown as following.



The binding constant ( $K_A$ ), can be calculated as:

$$K_A = [Q_n B] / [Q]^n [B] \quad (2)$$

Where  $[Q]$  and  $[B]$  are the quencher and protein concentration, respectively,  $[Q_n B]$  is the concentration of non fluorescent fluorophore—quencher complex and  $[B_0]$  gives total protein concentration.

$$[Q_n B] = [B_0] - [B] \quad (3)$$

$$K_A = ([B_0] - [B]) / [Q]^n [B] \quad (4)$$

The fluorescence intensity is proportional to the protein concentration as describe:

$$[B] / [B_0] \propto F / F_0 \quad (5)$$

Results from fluorescence measurements can be used to estimate the binding constant of Pb-protein complex. From eq 4:

$$\log [(F_0 - F) / F] = \log K_A + n \log [Q] \quad (6)$$

The accessible fluorophore fraction ( $f$ ) can be calculated by modified Stern-Volmer equation.

$$F_0 / (F_0 - F) = 1 / (fK [Q]) + 1/f \quad (7)$$

Where  $F_0$  is initial fluorescence intensity and  $F$  is fluorescence intensities in the presence of quenching agent (or interacting molecule).  $K$  is the Stern-Volmer quenching constant,  $[Q]$  is the molar concentration of quencher and  $f$  is the fraction of accessible fluorophore to a polar quencher, which indicates the fractional fluorescence contribution of the total emission for an interaction with a hydrophobic quencher [11]. The plot of  $F_0 / (F_0 - F)$  vs  $1 / [Q]$  yields  $f^{-1}$  as the intercept on  $y$  axis and  $(fK)^{-1}$  as the slope. Thus, the ratio of the ordinate and the slope gives  $K$ .

#### *X-ray photoelectron spectroscopy*

XPS was performed on a Kratos Axis Ultra spectrometer (Kratos Analytical Ltd., UK), using a monochromatic Al Ka X-ray source ( $k = 1486.6$  eV) with a power of 225 W, at a take-off angle of 90 degree relative to the sample surface. Two 250  $\mu\text{M}$  of the sample was dropped on an aluminum substrate and dried in vacuum desiccator overnight to obtain a thin film. The dried sample was then transferred to the XPS sample holder. The measurements were made under a high vacuum of  $10^{-9}$  torr, at room temperature. The surface of the sample was 20  $\text{mm}^2$ , and the investigated area was typically 192  $\text{mm}^2$ . Survey spectra for each sample over a binding energy range of 0–1300 eV were an average of three scans (at three different points) acquired at pass energy of 160 eV and resolution of 1 eV/step (lens in hybrid mode, which assures maximum sensitivity). High-resolution spectra of C 1s, N 1s and O 1s were an average of five scans acquired at a pass energy of 40 eV and resolution of 0.1 eV/step, for quantitative measurements of binding energy and atomic concentration. Because of the potential degradation of the surface during X-ray exposure, the spectra were collected in the same order (survey, C 1s, O 1s, N 1s) such that the amount exposure to X-rays was equivalent for all analyzed samples. The CasaXPS software was used for background subtraction (Shirley-type), peak integration, fitting and quantitative chemical analysis.

The C 1s (C–C) peak at 285 eV was used to calibrate the binding energy scale. Binding energies values are given at  $\pm 0.2$  eV. Gaussian peak profiles were used for spectral deconvolution of C 1s, O 1s and N 1s spectra [25-28].

## Results and Discussion

### *FTIR and CD spectra of Pb complexes with HSA and BSA*

The Pb(II) complexation with HSA and BSA was characterized by infrared spectroscopy and its derivative methods. The spectral shifting and intensity variations of protein amide I band at 1656-1655  $\text{cm}^{-1}$  (mainly C=O stretch) and amide II band at 1547-1543  $\text{cm}^{-1}$  (C-N stretching coupled with N-H bending modes) [14,15,29] were monitored upon Pb interaction. The difference spectra [(protein solution +  $\text{PbCl}_2$  solution) – (protein solution)] were obtained, in order to monitor the intensity variations of these vibrations and the results are shown in Figure 1. Similarly, the infrared self-deconvolution with second derivative resolution enhancement and curve-fitting procedures [14] were used to determine the protein secondary structures in the presence of Pb cations (Figure 2 and Table 1).

At low Pb(II) concentration (0.125 mM), decrease of intensity was observed for the protein amide I at 1656-1655 and amide II at 1547-1543  $\text{cm}^{-1}$ , in the difference spectra of the Pb-BSA and Pb-HSA complexes (Figs 1A and 1B, diff. 0.125 mM). The negative features located in the difference spectra for amide I and II bands at 1656, 1561  $\text{cm}^{-1}$  (Pb-BSA) and 1654, 1547  $\text{cm}^{-1}$  (Pb-HSA) are due to the loss of intensity of amide I and amide II bands upon Pb interaction (Fig. 1A and 1B, diff., 0.125 mM). This reduction of the intensity for the amide I and amide II bands is due to Pb binding to protein C=O, C-N and N-H groups. Additional evidence to support the Pb interactions with C-N and N-H groups comes from the shifting of the protein amide A band at 3300  $\text{cm}^{-1}$  (N-H stretching) in the free HSA and BSA to higher frequency at 3310-3315  $\text{cm}^{-1}$  upon lead cation interaction (spectra not shown). As Pb concentration increased to 0.5 mM, strong negative features were observed for amide I band at 1655,

1528  $\text{cm}^{-1}$  (Pb-BSA) and at 1652 (negative band), 1557  $\text{cm}^{-1}$  (positive band) (Pb-HSA), upon Pb complexation (Figs 1A and 1B, diff, 0.5 mM). In addition, spectral shifting and splitting were observed for the amide I from 1656 to 1659  $\text{cm}^{-1}$  (Pb-BSA) and from 1655 to 1663  $\text{cm}^{-1}$  (Pb-HSA) in the spectra of Pb-protein complexes (Fig. 1A and 1B, 0.5 mM complexes). The observed shifting and splitting of amide I band are due to Pb cation binding to protein C-O and C-N groups, while the decrease in the intensity of the amide I band in the spectra of the Pb-protein complexes suggests a major reduction of protein  $\alpha$ -helical structure at high metal ion concentrations [30].

A quantitative analysis of the protein secondary structure for the free HSA, BSA and their Pb complexes in hydrated films has been carried out and the results are shown in Figure 2 and Table 1. The free HSA has 57%  $\alpha$ -helix (1656  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\beta$ -sheet 14% (1628 and 1617  $\text{cm}^{-1}$ ), turn structure 13% (1669  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\beta$ -antiparallel 4% (1689  $\text{cm}^{-1}$ ) and random coil 12% (1637  $\text{cm}^{-1}$ ) (Fig. 2B and Table 1) consistent with the spectroscopic studies of human serum albumin [15,20]. The free BSA contains  $\alpha$ -helix 63% (1656  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\beta$ -sheet 16% (1612 and 1626  $\text{cm}^{-1}$ ), turn 12% (1678  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\beta$ -antiparallel 3% (1691  $\text{cm}^{-1}$ ) and random coil 6% (1638  $\text{cm}^{-1}$ ) (Fig. 2A and Table 1) consistent with the conformation of BSA reported [31,32]. Upon Pb cation interaction, a major decrease of  $\alpha$ -helix from 57% (free HSA) to 48% (Pb complex) with an increase in the turn structure from 13% to 17% (Pb complex) were observed (Fig. 2D and Table 1). Similarly, for BSA, a major decrease of  $\alpha$ -helix from 63% (free BSA) to 52% (complex) with an increase in the turn structure from 12% to 17% (Pb complex) were observed upon Pb complexation (Fig. 2B and Table 1).

### *CD spectra*

The conformational changes observed from infrared results for HSA and BSA and their Pb complexes are consistent with CD spectroscopic analysis shown in Table 2. The CD results show that free BSA has a high  $\alpha$ -helix content 60%,  $\beta$ -sheet 14%, turn 10% and random coil 16% (Table 2), consistent with the literature report [33]. The free HSA contains  $\alpha$ -helix 55%,  $\beta$ -sheet 16%, turn 14% and random coil 15% (Table 2). Upon Pb

cation complexation, major reduction of  $\alpha$ -helix was observed from 60% in free BSA to 50% in Pb-BSA and from 55% to 45% in the Pb-HSA complexes (Table 2). The decrease in  $\alpha$ -helix was accompanied by an increase in the  $\beta$ -sheet, turn and random coil structures (Table 2). The major reduction of the  $\alpha$ -helix with an increase in the  $\beta$ -sheet, turn and random structures are consistent with the infrared results, indicating a partial protein destabilization (Tables 1 and 2).

#### *Fluorescence spectra and stability of Pb complexes with HSA and BSA*

HSA contains a single polypeptide of 585 amino acids with only one tryptophan (Trp-214) located in subdomain II A. BSA contains two tryptophan residues Trp-134 and Trp-212 located in the first and second domains of protein hydrophobic regions. Tryptophan emission dominates both HSA and BSA fluorescence spectra in the UV region. The decrease of fluorescence intensity of HSA and BSA has been monitored at 347 nm for Pb-protein systems (Fig. 3A and 3B show representative results for each system). The plot of  $F_0 / (F_0 - F)$  vs  $1 / [\text{Pb}]$  (Fig. 3A' and 3B' show representative plots for Pb-protein complexes). Assuming that the observed changes in fluorescence come from the interaction between Pb cation and HSA or BSA, the quenching constant can be taken as the binding constant of the complex formation. The  $K$  values given here are averages of four-replicate and six-replicate runs for Pb-protein systems, each run involving several different Pb cation concentrations (Fig. 3A and 3B). The binding constants obtained were  $K_{\text{Pb-HSA}} = 8.2 (\pm 0.8) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  and  $K_{\text{Pb-BSA}} = 7.5 (\pm 0.7) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  (Fig. 3A' and 3B'). The association constants calculated for the Pb complexes suggest strong affinity for Pb-protein binding, compared to the other ligand-protein adducts [33,34].

In order to verify the presence of static or dynamic quenching in Pb-protein complexes we have plotted  $F_0/F$  against  $Q$  and the results are show in Fig. 4. The plot of  $F_0/F$  versus  $Q$  is linear for Pb-BSA and Pb-HSA adducts indicating that the quenching is mainly static in these Pb-protein complexes [24]. The  $K_q$  was estimated according to the Stern-Volmer equation:

$$F_0/F = 1 + k_q t_0 [Q] = 1 + K_D [Q] \quad (8)$$

where  $F_0$  and  $F$  are the fluorescence intensities in the absence and presence of quencher,  $[Q]$  is the quencher concentration and  $K_D$  is the Stern-Volmer quenching constant ( $K_q$ ), which can be written as  $K_D = k_q t_0$ ; where  $k_q$  is the bimolecular quenching rate constant and  $t_0$  is the lifetime of the fluorophore in the absence of quencher, 5.9 ns for BSA and 5.6 ns for HSA [10,23,24]. The quenching constants ( $K_q$ ) are  $2.5 \times 10^{11} \text{M}^{-1}/\text{s}$  for Pb-BSA and  $4.2 \times 10^{11} \text{M}^{-1}/\text{s}$  for Pb-HSA complexes (Fig. 4). Since these values are much greater than the maximum collisional quenching constant ( $2.0 \times 10^{10} \text{M}^{-1}/\text{s}$ ), thus the static quenching is dominant in these Pb-protein complexes [35].

The number of Pb cation bound per protein ( $n$ ) is calculated from  $\log [(F_0 - F)/F] = \log K_S + n \log [\text{Pb}]$  for the static quenching [35-40]. The linear plot of  $\log [(F_0 - F)/F]$  as a function of  $\log [\text{Pb}]$  extracted from Figure 5A and 5B. The  $n$  values from the slope of the straight line are 0.7 for Pb-HSA and Pb-BSA complexes, indicating of one Pb cation bound per protein (Fig. 5A and 5B).

#### *XPS studies and Pb-protein binding sites*

To determine the Pb-protein binding sites, we have carried out X-ray photoelectron spectroscopic study. Figures 6, 7 and 8 show the XPS results. The experimental atomic composition as determined from the XPS spectral analysis and the calculated oxygen and nitrogen to carbon (ON/C) ratio for all samples are presented in Table 3. Table 3 shows the experimental atomic composition as determined from the XPS spectral analysis and the calculated oxygen and nitrogen to carbon (ON/C) ratios for all samples. All XPS spectra reveal that the C, N and O atoms are the predominant species and they occur at 285, 401 and 532 eV, respectively (Figs 5, 6 and 7). The high resolution C-1 (C-C, C=C and C-H), C-2 (C-NH) and C-3 (C-O) of HSA and BSA are observed at about 285, 286 and 288 eV respectively (Fig. 6). The O-1 (C=O), O-2 (O-H) and O-3 (C-O) are located at about 531, 532, 534 eV, respectively (Fig. 7). Finally, N-1 (C-N), N-2 (NH<sub>2</sub>) and N-3 (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) are positioned at 400, 401 and 402 eV, respectively

(Fig. 8). These assignments are consistent with other literature reports [25-28, 41]. Experimental atomic compositions and O/C and N/C ratios obtained by XPS analysis for BSA, BSA-Pb, HSA and HSA-Pb are listed in Table 3. The analysis of data presented in Table 3 shows major changes in the percentages of carbon, oxygen and nitrogen atoms, while no major changes observed for sulfur atom (Table 3). It is interesting to note that the percentages of C, O and N atoms were decreased for BSA upon Pb complexation, while they increased for HSA on Pb interaction (Table 3). This could be indicative of a different binding patterns of Pb cations in BSA and HSA complexes. The major ratio changes observed for N and O are coming from direct Pb coordination with nitrogen and oxygen atoms, while the alterations of C ratios are related to the linkage of C atom to metal ion bonded N and O atoms (41). The XPS results show clearly that N and O atoms are the major metal ion binding sites in these Pb-protein complexes.

## **Conclusion**

Pb cations bind strongly to HSA and BSA *via* hydrophilic interactions with overall binding constants of  $K_{\text{Pb-HSA}} = 8.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  and  $K_{\text{Pb-BSA}} = 7.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ . The polypeptide O and N atoms are the main binding sites of Pb cations. Pb interaction alters protein secondary structure of both HSA and BSA causing a partial protein destabilization.

## **Acknowledgments**

This work is supported by a grant from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).



## References

1. <http://www.cdc.gov/nceh/lead/>, Center for Disease Control and Prevention, Accessed November 1, 2011.
2. Morales KA, Lasagne M, Gribenko AV, Yoon Y, Reinhart GD, et al. (2011) Pb<sup>2+</sup> as modulator of protein-membrane interactions. *J Am Chem Soc* 133: 10599-10611.
3. Kirberger M, Yang JJ (2008) Structural differences between Pb<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> binding sites in proteins: Implications with respect to toxicity. *J Inorg Biochem* 102: 1901-1909.
4. Eslam E, Liu D, Li T, Yang X, Jin X, et al. (2008) Effect of Pb toxicity on leaf growth, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of *Elsholtzia argyi*. *J Hazard Mater* 154: 914-926.
5. Qufei L, Fashui H (2009) Effects of Pb<sup>2+</sup> on the structure and function of photosystem II of *Spirodela polyrrhiza*, *Biol Trace Elem Res* 129: 251-260.
6. Carter DC, Ho JX (1994) Structure of serum albumin. *Adv Protein Chem* 45: 153-203.
7. Peters T (1996) All about albumin. Biochemistry, Genetics and Medical Applications. Academic Press, San Diego.
8. He XM, Carter DC (1992) Atomic structure and chemistry of human serum Albumin. *Nature* 358: 209-215.
9. Peters T (1985) Serum albumin. *Adv Protein Chem* 37: 161-245.
10. Tayeh N, Rungassamy T, Albani JR (2009) Fluorescence spectral resolution of tryptophan residues in bovine and human serum albumins. *J Pharm Biomed Anal* 50: 107-116.
11. Lakowicz JR (2006) In Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3rd ed. Springer: New York.
12. Painter L, Harding MM, Beeby PJ (1998) Synthesis and interaction with human serum albumin of the first 3,18-disubstituted derivative of bilirubin. *J Chem Soc Perkin Trans* 18: 3041-3044.

13. Dousseau F, Therrien M, Pezolet M (1989) On the spectral subtraction of water from the FT-IR spectra of aqueous solutions of proteins. *Appl Spectrosc* 43: 538-542.
14. Byler DM, Susi H (1986) Examination of the secondary structure of proteins by deconvoluted FTIR spectra. *Biopolymers* 25: 469-487.
15. Beauchemin R, N'soukpoe-Kossi CN, Thomas TJ, Thomas T, Carpentier R, et al. (2007) Polyamine analogues bind human serum albumin. *Biomacromolecules* 8: 3177-3183.
16. Ahmed A, Tajmir-Riahi HA, Carpentier R (1995) A quantitative secondary structure analysis of the 33 kDa extrinsic polypeptide of photosystem II by FTIR spectroscopy, *FEBS Lett* 363: 65-68.
17. Johnson WC (1999) Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structure. *Proteins Struct Funct Genet* 35: 307-312.
18. Sreerama N, Woody RW (2000) Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal Biochem* 287: 252-260.
19. Dufour C, Dangles O (2005) Flavonoid-serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1721: 164-173.
20. Froehlich E, Jennings JC, Sedaghat-Herati MR, Tajmir-Riahi HA (2009) Dendrimers bind human serum albumin. *J Phys Chem B* 11: 6986-6993.
21. He W, Li Y, Xue C, Hu Z, Chen X, et al. (2005) Effect of Chinese medicine alpinetin on the structure of human serum albumin. *Bioorg Med Chem* 13: 1837-1845.
22. Jiang M, Xie M X, Zheng D, Liu Y, Li XY, et al. (2004) Spectroscopic studies on the interaction of cinnamic acid and its hydroxyl derivatives with human serum albumin. *J Mol Struct* 692: 71-80.
23. Bi S, Ding L, Tian Y, Song D, Zhou X, et al. (2004) Investigation of the interaction between flavonoids and human serum albumin. *J Mol Struct* 703: 37-45.
24. Belatik A, Hotchandani S, Bariyanga J, Tajmir-Riahi HA (2012) Binding sites of retinol and retinoic acid with serum albumins. *Europ J Med Chem* 48: 114-123.

25. Frateur I, Lecoœur J, Zanna S, Olsson CO, Landolt A, et al. (2007) Adsorption of BSA on passivated chromium studied by a flow-cell EQCM and XPS. *Electrochim Acta* 52: 7600-7609.
26. Qin Q, Wang Q, Fu D, Ma J (2011) An efficient approach for Pb(II) and Cd(II) removal using manganese dioxide formed in situ. *Chem Eng J* 172: 68-74.
27. Ahmed MH, Keyes TE, Byrne JA, Blackledge CW, Hamilton JW (2011) Adsorption and photocatalytic degradation of human serum albumin on TiO<sub>2</sub> and Ag-TiO<sub>2</sub> films. *J Photochem Photobiol A* 222: 123-131.
28. Zubavichus Y, Zharnikov M, Shaporenko A, Fuchs O, Weinhardt L, et al. (2004) Soft X-ray induced decomposition of phenylalanine and tyrosine: a comparative study. *J Phys Chem A* 108: 4557-4565.
29. Krimm S, Bandekar J (1986) Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Adv Protein Chem* 38: 181-364.
30. Ahmed Ouameur A, Diamantoglou S, Sedaghat-Herati MR, Nafisi Sh, Carpentier R, et al. (2006) An overview of drug binding to human serum albumin: Protein folding and unfolding. *Cell Biochem Biophys* 45: 203-213.
31. Tian J, Liu J, Hu Z, Chen X (2005) Binding of the scutellarin to albumin using tryptophan fluorescence quenching, CD and FT-IR spectra. *Am J Immunol* 1: 21-23.
32. Grdadolnik J (2003) Saturation effects in FTIR spectroscopy: intensity of amide I and amide II bands in protein spectra. *Acta Chim Slov* 50: 777-788.
33. Kragh-Hansen U (1990) Structure and ligand binding properties of human serum albumin. *Dan Med Bull* 37: 57-84.
34. Kratochwil NA, Huber W, Muller F, Kansy M, Gerber PR (2002) Predicting plasma protein binding of drugs: a new approach. *Biochem Pharmacol* 64: 1355-1374.
35. Zhang G, Que Q, Pan J, Guo J (2008) Study of the interaction between icariin and human serum albumin by fluorescence spectroscopy. *J Mol Struct* 881: 132-138.
36. Liang L, Tajmir-Riahi HA, Subirade M (2008) Interaction of b-lactoglobulin with resveratrol and its biological implications, *Biomacromolecules* 9: 50-55.

37. Charbonneau D, Beauregard M, Tajmir-Riahi HA (2009) Structural analysis of human serum albumin complexes with cationic lipids, *J Phys Chem B* 113: 1777-1784.
38. Mandeville JS, Froehlich E, Tajmir-Riahi HA (2009) Study of curcumin and genistein interactions with human serum albumin. *J Pharm Biomed Anal* 49: 468-474.
39. Mandeville JS, Tajmir-Riahi HA (2010) Complexes of dendrimers with bovine serum albumin. *Biomacromolecules* 11: 465-472.
40. Dubeau S, Bourassa P, Thomas TJ, Tajmir-Riahi HA (2010) Biogenic and synthetic polyamines bind bovine serum albumin, *Biomacromolecules* 11: 1507-1515.
41. Barazzouk S, Daneault C (2011) Spectroscopic characterization of oxidized nanocellulose grafted with fluorescent amino acids. *Cellulose* 18: 643-653.

### Captions for Figures

**Figure 1.** Three-dimensional structures of HAS and BSA with tryptophan residues in green color. doi:10.1371/journal.pone.0036723.g001.

**Figure 2.** FTIR spectra in the region of  $1800\text{-}600\text{ cm}^{-1}$  of hydrated films (pH 7.4) for free BSA (0.25 mM) and its Pb complexes (**A**) and for free HSA (0.25 mM) and its Pb complexes (**B**) with difference spectra (diff.) (bottom two curves) obtained at different Pb concentrations (indicated on the figure).

**Figure 3.** Second derivative resolution enhancement and curve-fitted amide I region ( $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ ) for free BSA and HSA (0.25 mM) and their Pb complexes with 0.5 mM Pb concentration

**Figure 4.** Fluorescence emission spectra of Pb-BSA systems in 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 at 25 °C presented for (**A**) Pb-BSA: (a) free BSA (7.5  $\mu\text{M}$ ), (b-j) with Pb cationl at 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 30, 40 and 60  $\mu\text{M}$ ; (**B**) Pb- HSA: (a) free HSA (7.5  $\mu\text{M}$ ), (b-i) Pb at 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 30, 40 and 60  $\mu\text{M}$ . Inset:  $F_0 / (F_0 - F)$  vs  $1 / [\text{Pb}]$  for A' (Pb-BSA) and B' (Pb-HSA).

**Figure 5.** Stern-Volmer plots of fluorescence quenching constant ( $K_q$ ) for the Pb-BSA and Pb-HSA complexes at different Pb concentrations (A) Pb-BSA and (B) Pb-HSA.

**Figure 6.** The plot of  $\text{Log}(F_0 - F/F)$  as a function of  $\text{Log}(\text{Pb concentration})$ .

**Figure 7.** XPS spectra of C atoms for the free HSA and BSA and their Pb complexes.

**Figure 8.** XPS spectra of O atoms for the free HAS and BSA and their Pb complexes.

**Figure 9.** XPS spectra of N atoms for the free HSA and BSA and their Pb complexes.

**Table 1:** Secondary structure analysis (infrared spectra) for the free HSA and BSA and their Pb complexes in hydrated film at pH 7.4.

Amide I ( $\text{cm}^{-1}$ ) Components	free BSA (%) 0.25 $\mu\text{M}$	Pb (%) 0.5 mM	free HSA (%) 0.25 $\mu\text{M}$	Pb (%) 0.5 mM
1654-1660 $\alpha$ -Helix ( $\pm 4$ )	63	52	57	48
1614-1637 $\beta$ -Sheet ( $\pm 2$ )	16	15	14	11
1638-1648 Random ( $\pm 1$ )	6	9	12	24
1670-1678 Turn ( $\pm 2$ )	12	17	13	17
1680-1691 $\beta$ -antiparallel ( $\pm 1$ )	3	7	4	10

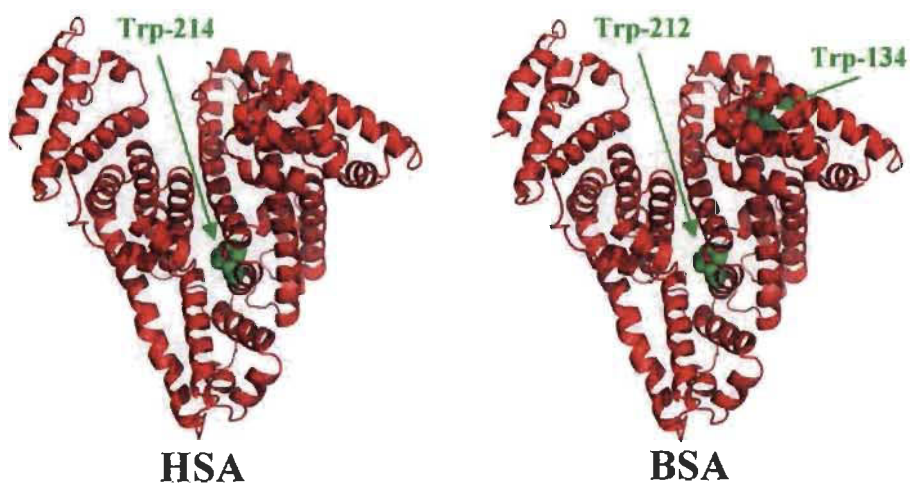
**Table 2:** Secondary structure of HSA and BSA complexes (pH 7.4) with Pb cation calculated by CDSSTR Software (CD Spectra).

<b>Components conformation</b>	<b>free BSA (%) 12.5 <math>\mu</math>M</b>	<b>Pb (%) 0.5 mM</b>	<b>free HSA (%) 12.5 mM</b>	<b>Pb (%) 0.5 mM</b>
<b><math>\alpha</math>-Helix (<math>\pm 3</math>)</b>	<b>60</b>	<b>50</b>	<b>55</b>	<b>45</b>
<b><math>\beta</math>-Sheet (<math>\pm 2</math>)</b>	<b>14</b>	<b>17</b>	<b>16</b>	<b>19</b>
<b>Turn (<math>\pm 1</math>)</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>14</b>	<b>16</b>
<b>Random (<math>\pm 2</math>)</b>	<b>16</b>	<b>18</b>	<b>15</b>	<b>20</b>

**Table 3.** Experimental atomic compositions and O/C and N/C ratios obtained by XPS analysis for BSA, BSA-Pb, HSA and HSA-Pb with  $\sim\pm 1\%$

Sample	Atomic content (%)					O/C	N/C
	C	O	N	S	Pb		
Free BSA	67.6	18.2	13.4	0.8	0.0	0.27	0.20
BSA-Pb	71.0	16.3	11.8	0.7	0.2	0.23	0.17
Free HSA	71.7	15.9	11.7	0.7	0.0	0.22	0.16
HSA-Pb	69.2	16.9	12.9	0.8	0.2	0.24	0.19



**Figure 1.**

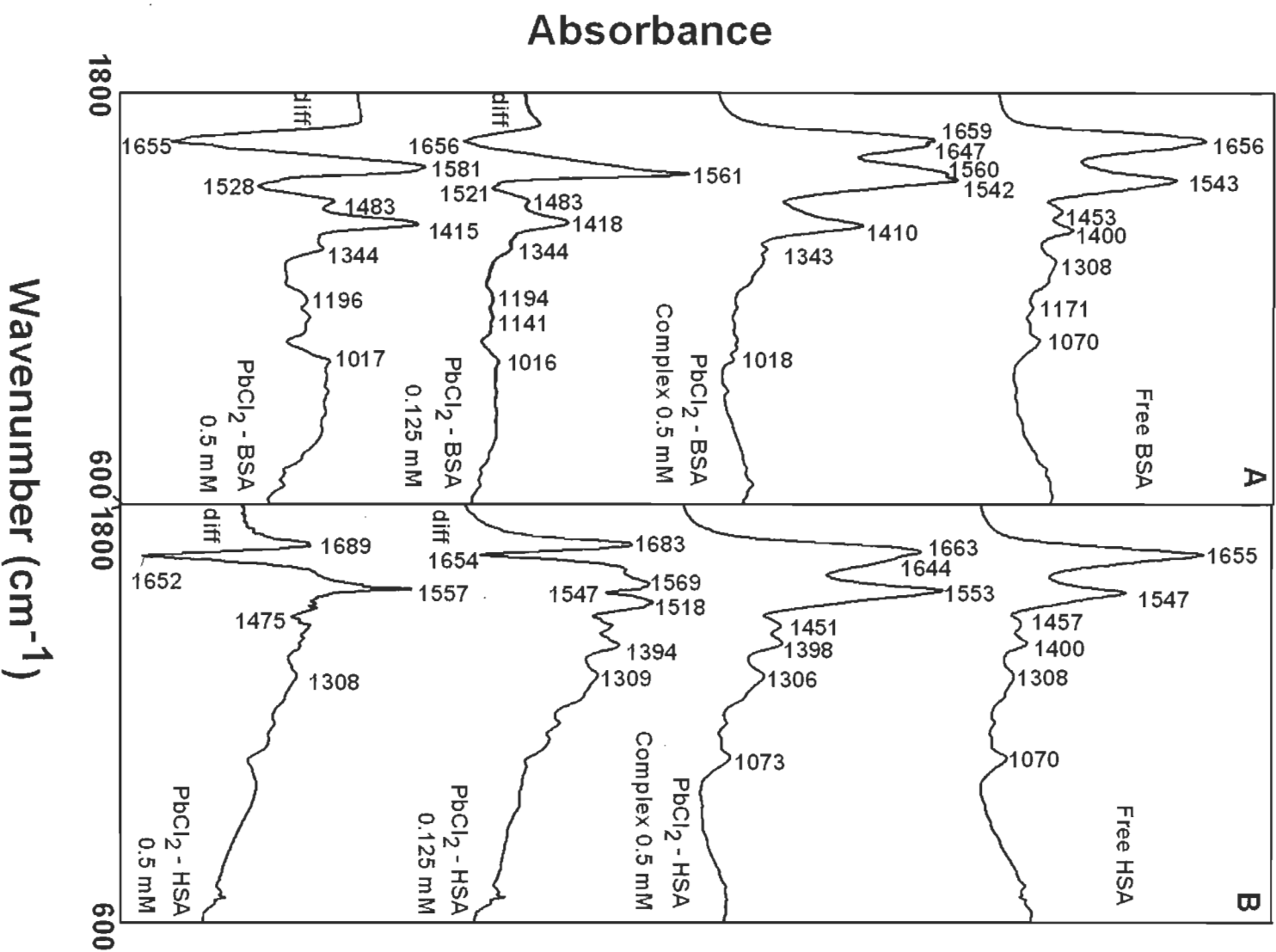


Figure 2.

Figure 3.

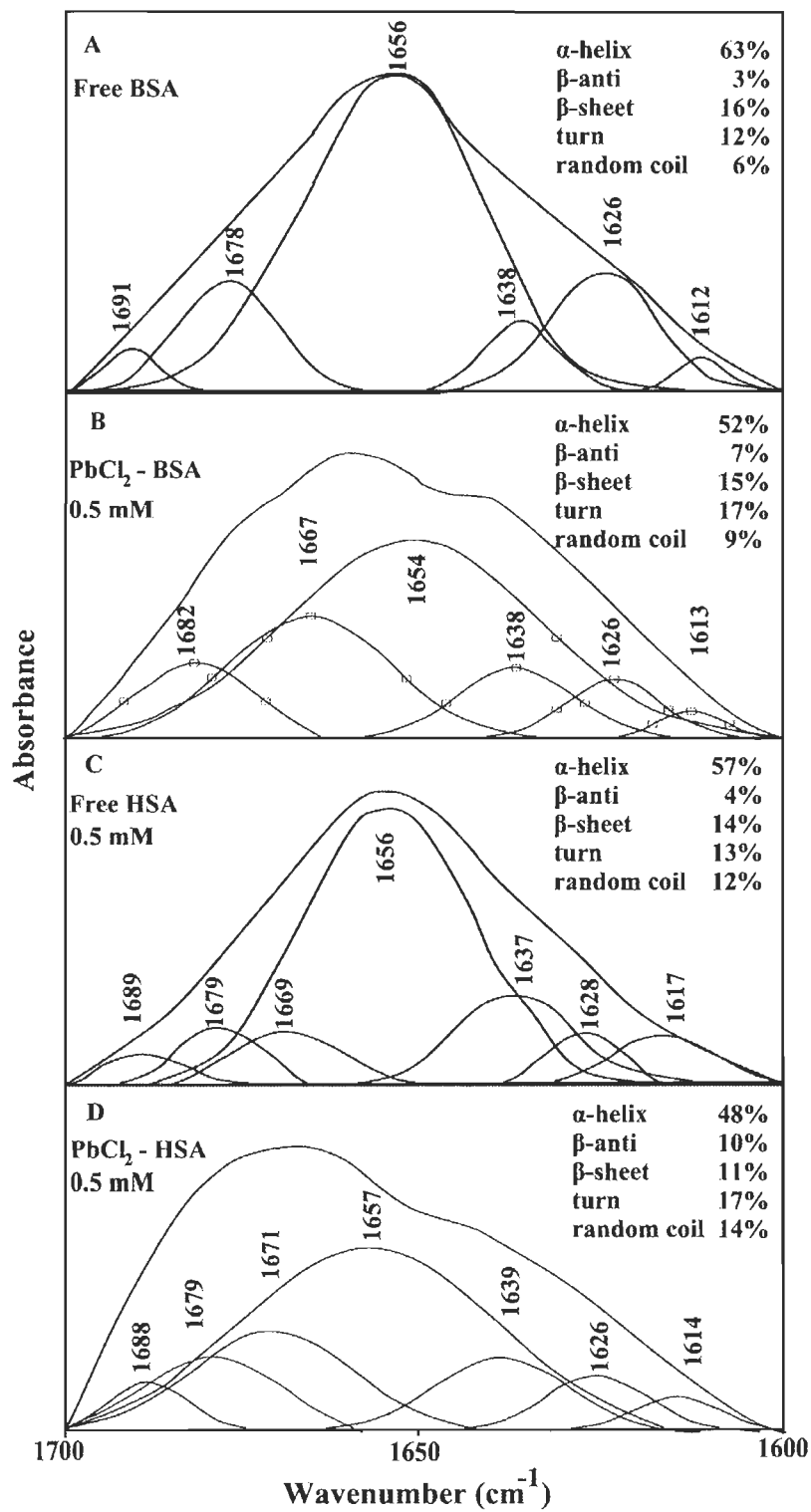


Figure 4.

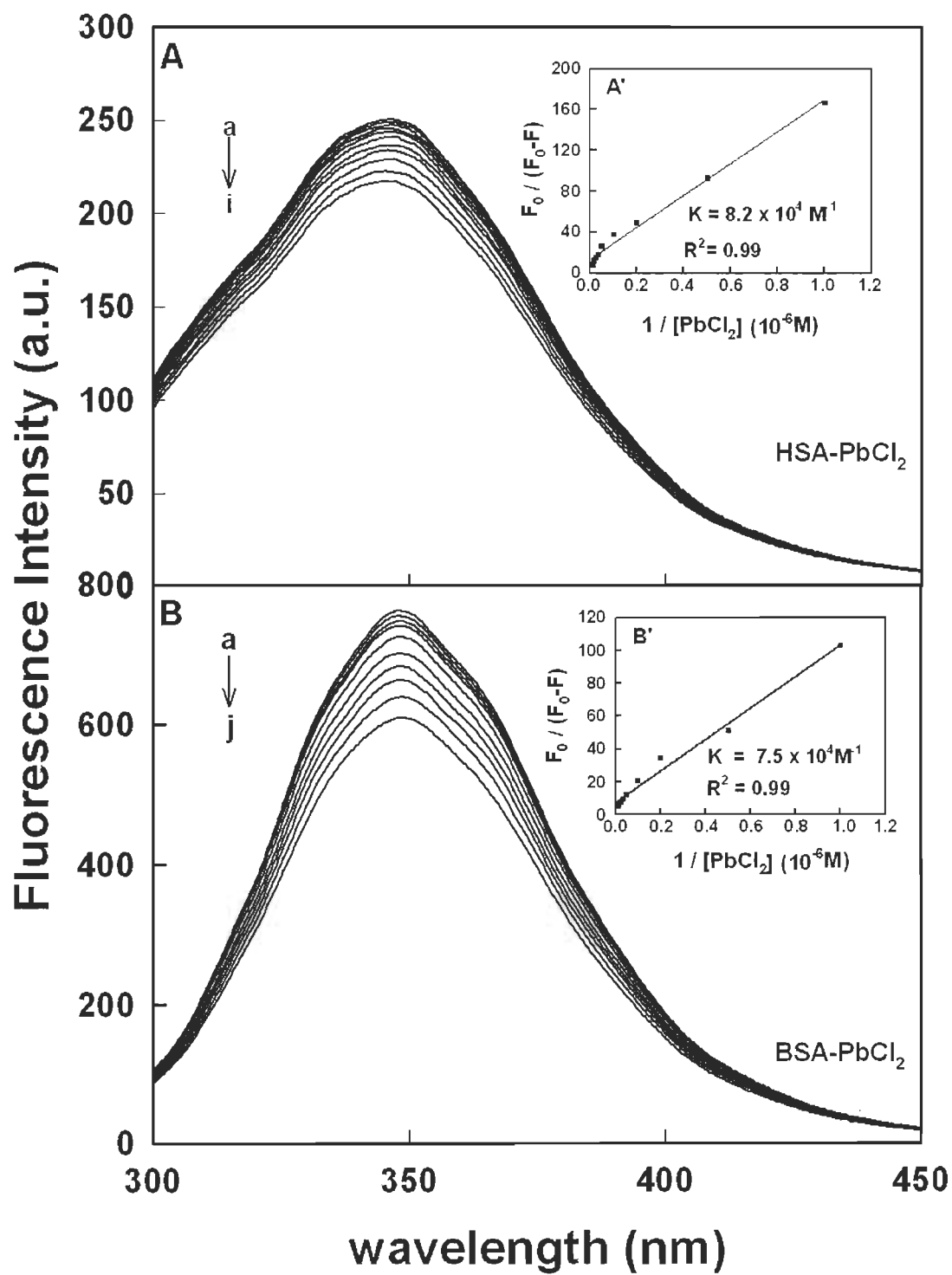


Figure 5.

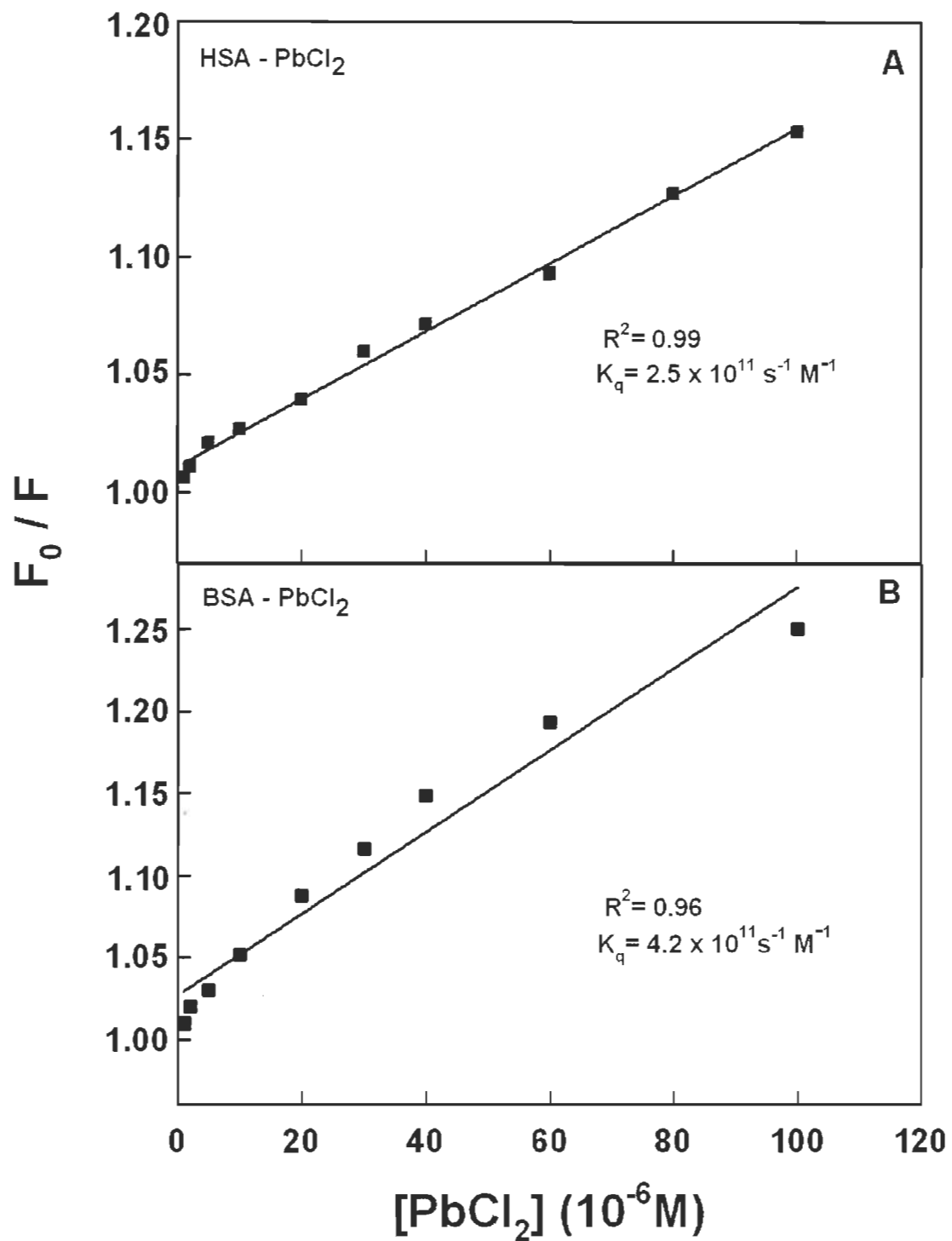


Figure 6.

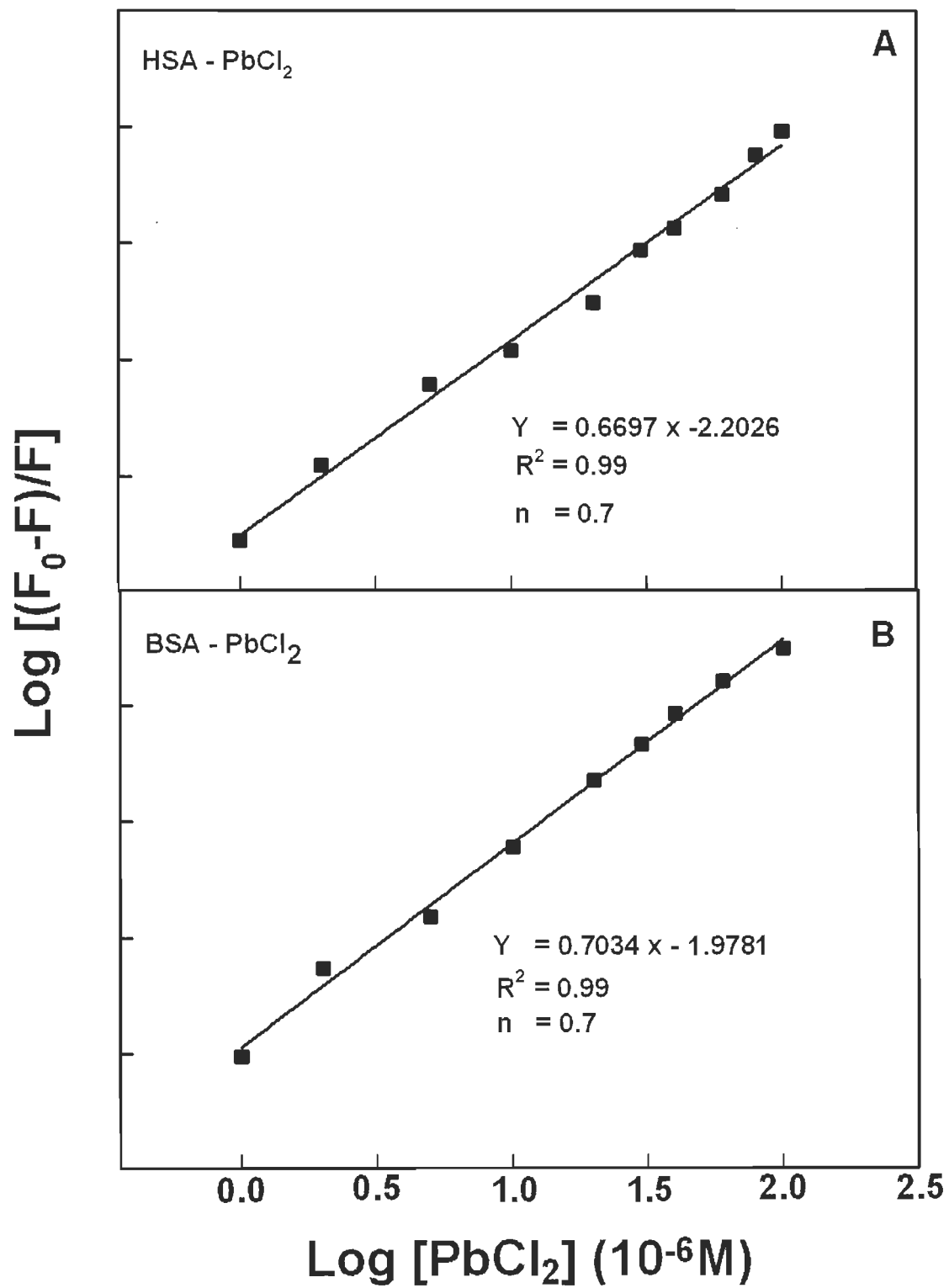


Figure 7.

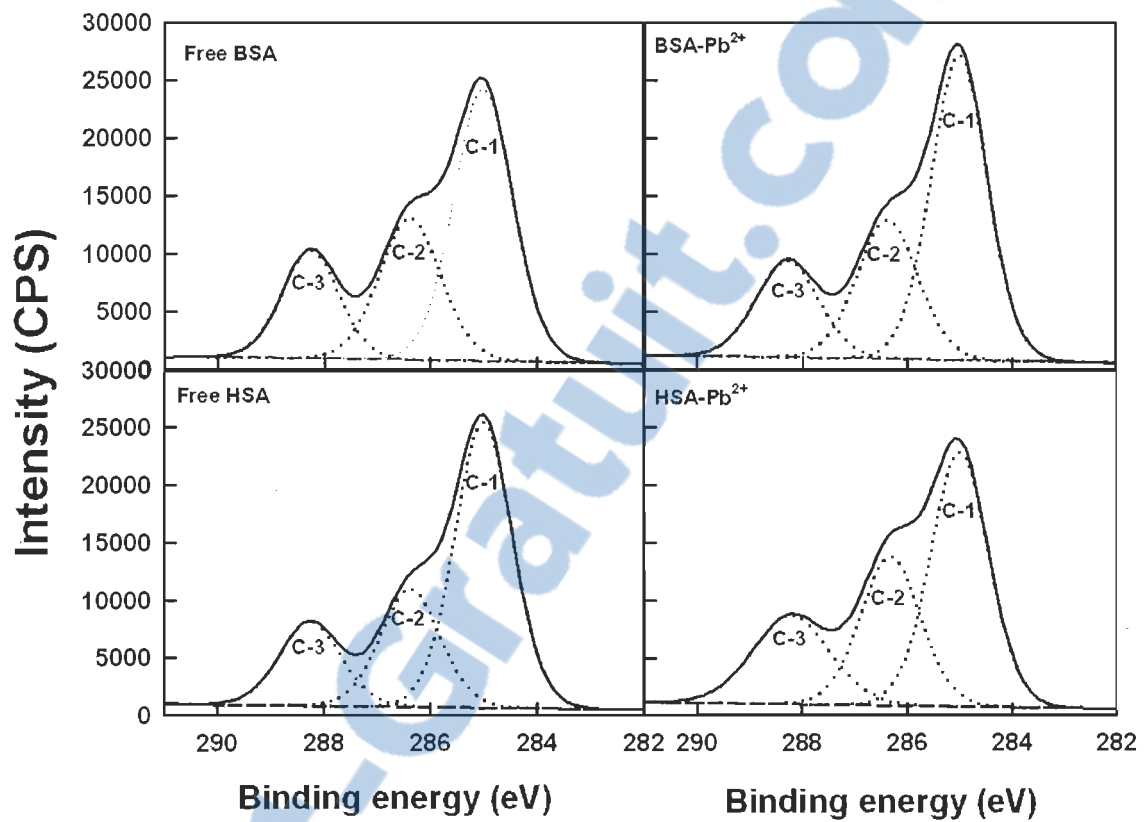


Figure 8.

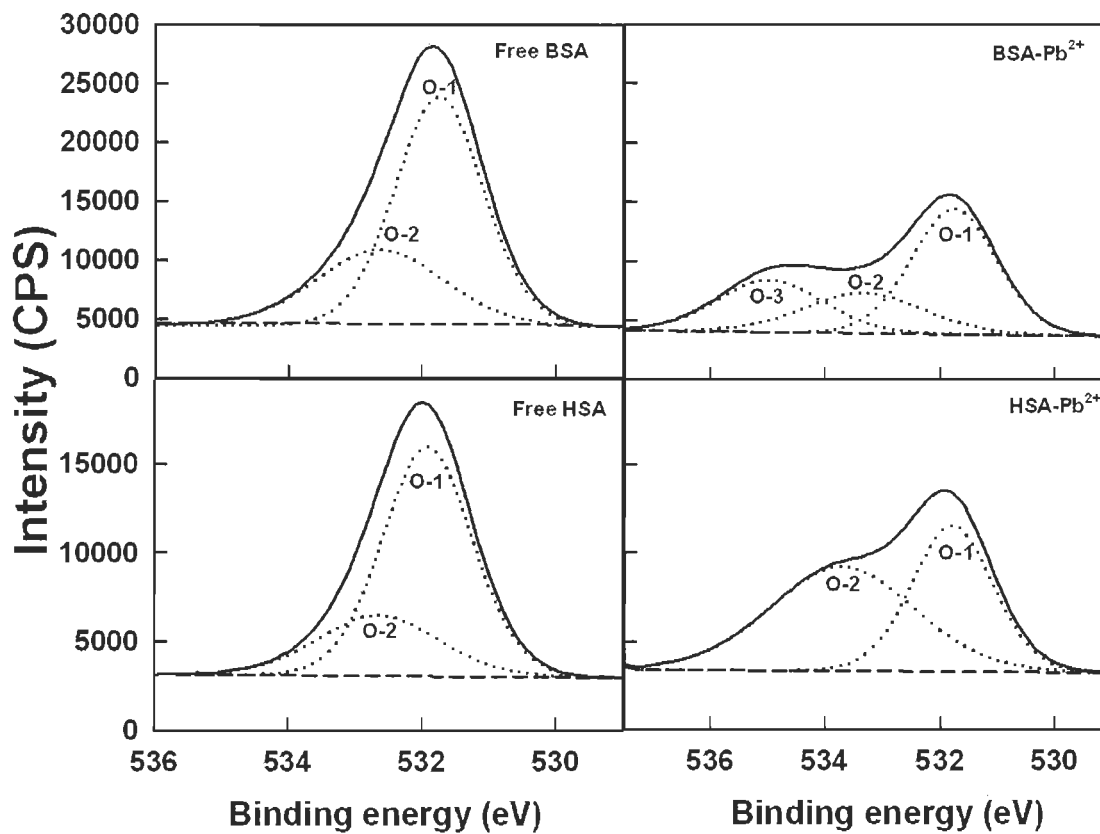
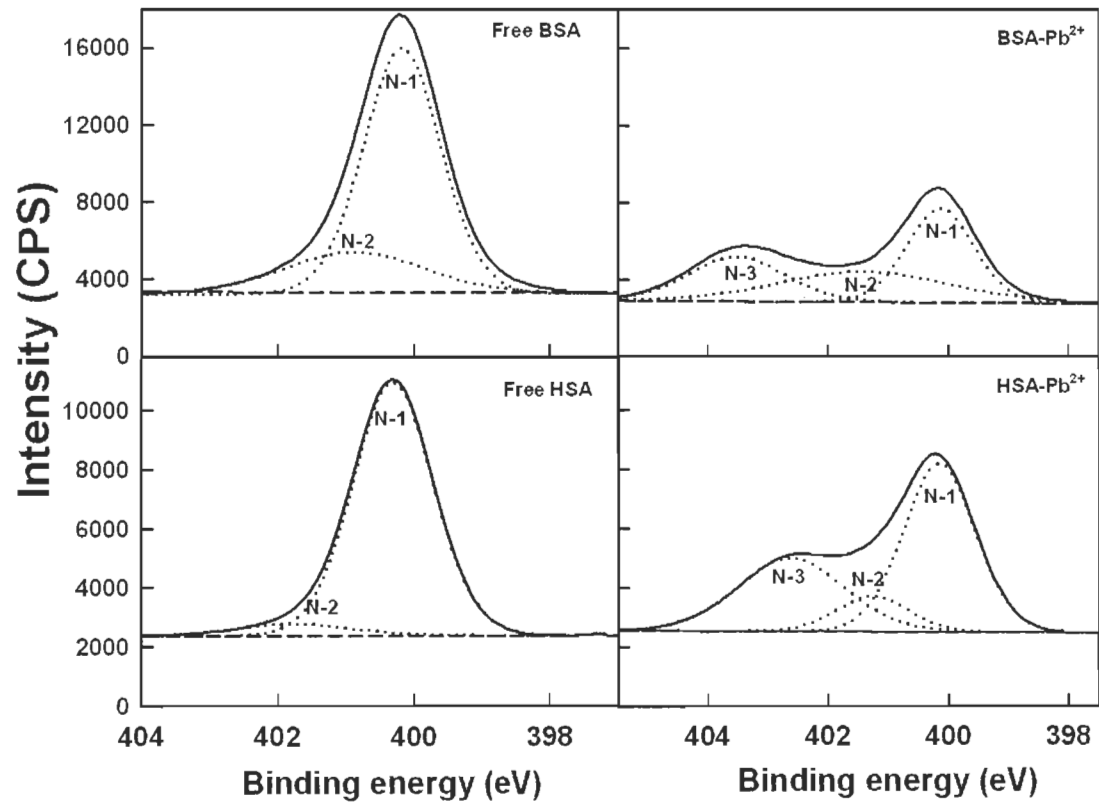




Figure 9.



## CHAPITRE IV

### INHIBITION OF THE WATER OXIDIZING COMPLEX OF PHOTOSYSTEM II AND THE REOXIDATION OF THE QUINONE ACCEPTOR QA<sup>-</sup> BY Pb<sup>2+</sup>

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en 2013 dans le journal PLOS One: Ahmed Belatik, Surat Hotchandani and Robert Carpentier, Inhibition of the water oxidizing complex of Photosystem II and the reoxidation of the quinone acceptor QA<sup>-</sup> by Pb<sup>2+</sup>. Volume 8 Issue 7 e 68142.

#### 4.1 Résumé

L'action toxique de  $Pb^{2+}$  sur le transport des électrons au niveau du photosystème II (PSII) a été étudiée dans les membranes des thylakoïdes isolés à partir de feuilles d'épinard. L'analyse par spectroscopie de fluorescence et par thermoluminescence a permis de déterminer le mode d'action de  $Pb^{2+}$  sur le PSII. L'invariance des caractéristiques de fluorescence de la chlorophylle a (*Chl a*) ainsi que de la molécule de magnésium tétraphénylporphyrine (MgTPP), une molécule structurellement analogue à la *Chl a*, en présence de  $Pb^{2+}$ , confirme que  $Pb^{2+}$  n'interagit pas directement avec les molécules de chlorophylle dans les antennes collectrices de lumière de PSII. Les résultats montrent que Pb interagit avec le complexe de dégagement d'oxygène perturbant ainsi la recombinaison de charge entre les quinones accepteur d'électrons au niveau du PSII et les états  $S_2$  du complexe  $Mn_4Ca$ . Le transfert d'électrons entre les quinones  $Q_A$  et  $Q_B$  est aussi grandement retardé en présence de  $Pb^{2+}$ . Ce qui est proposé être le résultat d'une modification transmembranaire du côté accepteur du PSII.

## 4.2 Deuxième article scientifique

### **Inhibition of the water oxidizing complex of Photosystem II and the reoxidation of the quinone acceptor $Q_A^-$ by $Pb^{2+}$**

Ahmed Belatik, Surat Hotchandani and Robert Carpentier\*

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

\* **Corresponding author:** Robert.Carpentier@uqtr.ca: Tel. 819-376-5011 (3300),  
Fax: 819-376-5084.

**Abstract**

The action of the environmental toxic  $\text{Pb}^{2+}$  on photosynthetic electron transport was studied in thylakoid membranes isolated from spinach leaves. Fluorescence and thermoluminescence techniques were performed in order to determine the mode of  $\text{Pb}^{2+}$  action in photosystem II (PSII). The invariance of fluorescence characteristics of chlorophyll a (Chl a) and magnesium tetraphenylporphyrin (MgTPP), a molecule structurally analogous to Chl a, in the presence of  $\text{Pb}^{2+}$  confirms that Pb cation does not interact directly with chlorophyll molecules in PSII. The results show that Pb interacts with the water oxidation complex thus perturbing charge recombination between the quinone acceptors of PSII and the  $\text{S}_2$  state of the  $\text{Mn}_4\text{Ca}$  cluster. Electron transfer between the quinone acceptors  $\text{Q}_A$  and  $\text{Q}_B$  is also greatly retarded in the presence of  $\text{Pb}^{2+}$ . This is proposed to be owing to a transmembrane modification of the acceptor side of the photosystem.

## Introduction

Heavy metals play essential cofactor roles as structural and catalytic components of enzymes in many physiological processes required for the normal development of plants. Over the course of evolution, plants have developed different mechanisms that control and respond to the intake and accumulation of both essential and nonessential heavy metals. However, some heavy metals such as lead can be highly toxic to cells and cell organelle functions even at very low concentrations. Although the influence of excessive dose of heavy metals on the photosynthetic activity of plants has been studied in many cultivated species (1-3), the mechanism of heavy metal toxicity on photosynthesis is still a matter of great debate. Some evidence points to their involvement as inhibitors of electron transport in light reactions (4-5) and in the inhibition of enzyme activity in dark reactions by the direct blocking of protein functions or displacement of endogenous metals (6-7).

Lead, found in the environment, comes from both natural and anthropogenic sources. The metal is present in the soil, but also in all other environmental compartments: water, air and even living beings (8). The toxicity of a metal depends on its chemical state as well as on environmental factors (9-10). In soil, Pb can be found in ionic form, or bound to the soil particles (11). It has two oxidation states, namely  $2^+$  and  $4^+$ . The tetravalent state is a strong oxidant but is not abundant in the environment. The divalent state, on the other hand, is more stable and prominent in the environment (12). The accumulation of Pb from atmospheric deposition or contaminated waste is largely stored in the soil, mainly in the surface layers and, more specifically, in the organic-rich layers (13). However, a small fraction of the metal is also absorbed by living organisms (micro-and meso-organisms, plants... etc.).

The photosystem II (PSII) complex is one of the two membrane-bound large multisubunit chlorophyll-protein complexes (PSII and PSI) of plants, algae and cyanobacteria embedded in the thylakoid membranes. PSII collects light energy, converts it into electro-chemical energy and drives electron transfer from water to PSI. On its acceptor side, PS II electron transport involves two acceptor quinones,  $Q_A$  and  $Q_B$

that are arranged around a non-heme iron. This non-heme iron is hexacoordinated by four histidines and two remaining ligand positions are taken by the oxygen atoms of bicarbonate as bidentate ligand (14-15). Further, the study of the effect of bicarbonate has suggested that the non-heme iron plays a role of an electron- transport regulator on the acceptor side of PSII. Although the precise mechanism of this process needs more study, the depletion of bicarbonate results in a decelerating of the electron transfer rate between  $Q_A$  and  $Q_B$  (16–20). The water oxidation complex (WOC) is located on the donor side of PSII. It is composed of a  $Mn_4Ca$  cluster where the successive absorption of four quanta by PSII results in the advancement of the S-states cycle from  $S_0 \rightarrow S_1 \rightarrow S_2 \rightarrow S_3 \rightarrow (S_4) \rightarrow S_0$ . The  $S_4$ -state decays to the  $S_0$ -state after the 4<sup>th</sup> flash with the concurrent oxygen evolution. The electrons are passed from the WOC to the reaction center  $P680^+$  through the secondary electron donor, Tyr<sub>Z</sub> (Tyrosine 161 of D1 subunit) (21).

At present, there are only a few reports regarding the adverse action of  $Pb^{2+}$  on the photosynthetic apparatus (22 and references therein). A decline of the photochemical quantum yield of PSII was observed in isolated thylakoid membranes from spinach (23). It was proposed that  $Pb^{2+}$  affects oxygen evolution by removing extrinsic polypeptides and/or  $Ca^{2+}$  or  $Cl^-$  ions associated with the water oxidizing complex of PSII (5, 24). Lead cation was also recently shown to affect PSI electron transport presumably due to binding near or at plastocyanin (25).

In this study, we have further investigated the mechanism of the action of  $Pb^{2+}$  in thylakoid membranes. The effects of the metal ion on the electron transport were studied using thermoluminescence and fluorescence spectroscopic techniques. Functional assays were used to determine the site of action and consequences of metal ion interaction in the thylakoid membranes and to explore the mode of action of the metal that causes the loss of photosystem II functions.

## Material and methods

### *Thylakoid membranes isolation*

Thylakoid membranes were prepared from fresh market spinach leaves (*Spinacia oleracea* L.) as described elsewhere (26), and were stored in the dark in 50 mM Hepes NaOH (pH 7.6), 0.33 M sorbitol, 2 mM EDTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM NaCl, and 10 mM KCl.

### *Chlorophyll fluorescence induction*

Chlorophyll *a* fluorescence induction (FI) measurements were performed at room temperature using the Plant Efficiency Analyser (Hansatech, King' Lynn, Norfolk, UK). The assay medium consisted of 50 mM Hepes-NaOH (pH 7.6), 0.33 M sorbitol, 2 mM EDTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, and 10 mM NaCl with a final Chl concentration of 25 µg mL<sup>-1</sup> for thylakoid membranes. Red excitation light peaking at 655 nm with an intensity of 1800 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> was obtained from six light emitting diodes. As the fluorescence signal during the first 40 µs is ascribed to artifacts due to a delay in response time of the instrument, these data were not included in the analysis of FI traces.

### *Thermoluminescence*

Measurements of thermoluminescence were performed using home-built equipment. The complete description of the design and functional aspects are described elsewhere (27-28). Thylakoid membranes were diluted to a final Chl concentration of 200 µg mL<sup>-1</sup> in a medium containing 50 mM Hepes-NaOH (pH 7.6), 0.33 M sorbitol, 2 mM EDTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, and 10 mM NaCl. About 300 µL of the suspension was added to the sample compartment (15 mm diameter) positioned just above Peltier plate and covered with a Hellma 202-OS disc window. The sample chamber was closed with a holder bearing the light guide connected to the photomultiplier. The sequence of incubation periods and flash illumination was as



follows. The samples were pre-incubated for 120 s at 20°C. Then the temperature was brought down to 2°C within 36 s and kept for 60 s. Two actinic single turn-over saturating white flashes of about 2  $\mu$ s pulse width (setting 10, XE-STC, Walz, Germany) were then applied to initiate charge separation in PSII. Finally, a linear warming (0.5°C s<sup>-1</sup>) of the samples in total darkness activated the recombination of PSII charge pairs that can be detected by the appearance of emission bands with characteristic temperature optima (27-28).

#### *Fluorescence measurements*

Fluorometric experiments were carried out at room temperature 24°C with a Perkin Elmer LS55 Spectrometer equipped with a red-sensitive photomultiplier R928. Samples were excited at 434 nm and fluorescence emission spectra were measured from 600 to 800 nm as described by Rajagopal et al (2003) (29). The excitation and emission spectral widths were fixed at 5 and 2.5 nm, respectively, and emission spectra were corrected according to the photomultiplier sensitivity using the correction factor spectrum provided by Perkin-Elmer.

#### *Flash-induced fluorescence decay kinetics*

In order to examine the reduction and oxidation kinetics of Q<sub>A</sub>, Chl fluorescence rise and its relaxation in the dark were measured with FL3500 Fluorometer (Photon Systems Instruments, Brno, Czech Republic) as described previously (30-31). Thylakoid membranes (Chl concentration of 25  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) were incubated for 3 min at room temperature in complete darkness without or with 50  $\mu$ M of DCMU before initiating the fluorescence measurements. Samples were excited with a 20  $\mu$ s red actinic flash from a LED peaking at 625 nm and prompt fluorescence was measured for 1 min. The first measurement was taken 20  $\mu$ s after the flash was given. The traces were averaged to estimate the half-life times and amplitudes of the fluorescence decay components using the following three exponential functions:

$$F(t) = F' + A_1 e^{-k_1 t} + A_2 e^{-k_2 t} + A_3 e^{-k_3 t} \quad (1)$$

where  $F(t)$  is the fluorescence value at time  $t$ ,  $k_n$  is the rate constant,  $A_n$  is the amplitude of the fluorescence relaxation phase, and  $F'$  is the stable minimal fluorescence at the end of the decay.

## Results

### *Chlorophyll fluorescence induction*

The kinetic curves of the fast Chl fluorescence rise were measured in isolated thylakoid membranes both untreated and those treated with various concentrations of  $\text{PbCl}_2$  as shown in Fig. 1. The FI traces, normalized at minimal values ( $F_0$ ), are characterized by a series of inflections in the rate of rise in the fluorescence intensity termed as OJIP transient (32-33). In isolated thylakoid membranes, the I step of the OJIP fluorescence, as observed by Bukhov et al 2003 (34), cannot be resolved visually due to the significant overlap between JI and IP phases (Fig. 1, Ctrl). However, Pospisil and Dau 2002 (35) and Boisvert et al 2006 (36) have decomposed the OJIP traces by fitting the experimental curves with a sum of three mono-exponential components. This method showed a good fit of the OJIP traces with the three components OJ, JI and IP, even though the inflection step I was absent (36). The I step can be restored by the addition of some different exogenous electron acceptors at the  $Q_B$  site of PSII (37). The treatment with different concentrations (10-400  $\mu\text{M}$ ) of lead increased the relative fluorescence intensity at J step while the rise towards the P step was retarded and the fluorescence intensity at P declined (Fig. 1). This suggests that the electron transfer between  $Q_A^-$  and  $Q_B$  was slowed down with the increasing  $\text{Pb}^{2+}$  concentration. However, at  $\text{Pb}^{2+}$  concentrations greater than 400  $\mu\text{M}$ , the OJ phase also began to decrease and the overall fluorescence induction was strongly damped (Fig. 1). Furthermore, the intensity of JIP phase also diminished with increased concentration of Pb cation. In other words, one observed a quenching of Chl fluorescence as the concentration of  $\text{PbCl}_2$  increased.

### *Fluorescence of Chl a and MgTPP*

The observed Chl fluorescence quenching (Fig. 1) may be the result of the direct interaction of  $\text{PbCl}_2$  with the excited states of Chl of PSII thereby altering its radiative characteristics. Therefore, in order to verify this possibility, the fluorescence of Chl a in ethanolic solution was studied in absence and presence of  $\text{PbCl}_2$  (Fig. 2A). The fluorescence of Chl a in this solution exhibits a maximum at 675 nm, which is characteristic of monomeric Chl a (38). As seen from the figure, the fluorescence properties of Chl a practically remained unchanged upon addition of  $\text{PbCl}_2$ . This suggests that  $\text{PbCl}_2$  has no direct effect on the excited singlet states of Chl a, and thus on its radiative properties. To further confirm this observation, fluorescence studies of MgTPP were performed in the presence of  $\text{Pb}^{2+}$  (Fig. 2B). The use of MgTPP is due to its structural analogy with Chl a as it is composed of the same porphyrin macrocycle with central Mg. In addition, the added advantage of using MgTPP is that it does not contain the phytol chain as is present in Chl a, and, as a result, can be more easily accessible to the additives. It is shown in Fig. 2B that  $\text{PbCl}_2$  had no effect on the fluorescence properties of MgTPP thus confirming the results obtained with Chl a.

### *Chlorophyll fluorescence induction parameters*

The Chl fluorescence properties of thylakoid membranes in the presence of  $\text{Pb}^{2+}$  were further subjected to the comprehensive analysis of fluorescence induction kinetics (Fig. 3). The initial fluorescence  $F_0$  (O-level), which describes the functional state of PSII reaction centers in terms of its openness in the dark-adapted state (39), remained virtually unchanged by the addition of Pb cations (Fig. 3A). However, in order to assess the effect of  $\text{PbCl}_2$  on the maximum quantum yield of the primary photochemistry of PSII in thylakoid membranes, the changes in the maximal fluorescence observed in dark adapted samples,  $F_m$ , when the excitons have been trapped and all the reaction centers of PSII are in closed state (40), were also examined. As seen from Fig. 3A,  $F_m$  greatly diminished as  $\text{Pb}^{2+}$  concentration increased. This decline in  $F_m$  leads to a decrease in the variable fluorescence  $F_v$  ( $F_v = F_m - F_0$ ) and, consequently,  $F_v/F_m$ , the maximal PSII photochemical quantum yield, also decreased (Fig. 3B). This decrease in  $F_v/F_m$  brings

about a simultaneous decline in  $F_v/F_0$  (result not shown), a parameter that accounts for the simultaneous variations in  $F_m$  and  $F_0$  for the determination of the maximum photochemical quantum yield of PSII (41). Since, as noted in Fig. 3A,  $F_0$  remains practically invariant with increasing Pb concentrations, the inhibitory effect of  $Pb^{2+}$  on the quantum yield of PSII photochemistry is, therefore, principally related to the changes in  $F_m$ .

#### *Flash-induced Chl fluorescence decay kinetics*

The fluorescence induction traces (Fig. 1) indicated that the reoxidation of  $Q_A$  was affected in the presence of  $PbCl_2$ . This observation was further verified using the fluorescence properties of dark adapted isolated thylakoid membranes submitted to a single turnover flash and normalized at minimal values (Fig. 4A). The fluorescence rise induced by the flash is due to the reduction of  $Q_A$ , the primary quinone acceptor of PSII, and the decay thereafter in the dark is related to the reoxidation of  $Q_A^-$  and consists of several kinetic phases. The amplitude of the fluorescence rise greatly decreased when the concentration of  $PbCl_2$  increased, especially at concentrations above 100  $\mu M$ . In order to characterize quantitatively the fluorescence decay kinetics, the dark decay was fitted with three exponential components (Table 1). The fast component is attributed to the reoxidation of  $Q_A^-$  by  $Q_B$  (42-43), the middle component is ascribed to the  $Q_A^-$  reoxidation in PSII centers with an empty  $Q_B$  site and is limited by the diffusion time of PQ to the  $Q_B$  binding site. The slow phase is associated with the reoxidation of  $Q_A^-$  through charge recombination with the  $S_2$  and/or  $S_3$  states of the  $Mn_4Ca$  cluster (42-43). The amplitudes and the half-life times of the components are shown in Table 1. The amplitude of the fast phase greatly decreased with increasing amounts of  $PbCl_2$ , this was accompanied by a strong increase in the half-life time of all three components of the decay kinetics (Table 1).

The decay was also measured in the presence of DCMU that blocks electron transfer between  $Q_A^-$  and  $Q_B$  (Fig. 4B). In this case, the reoxidation of  $Q_A^-$  is owing to its charge recombination with the donor side of PSII. The fluorescence decay in the

presence of DCMU can also be fitted with three exponential components (44-45). The fast component is due to the charge recombination with partially active  $Mn_4Ca$  clusters, the middle component arise from the recombination of  $S_2Q_B^-$  charge pairs. The slowest component is associated with PSII with an oxygen evolving center in the  $S_0$  state before the flash was applied. The amplitudes of the middle and slow components increased with  $PbCl_2$  at the expense of the fast component and their half-life times increased (Table 1).

### *Thermoluminescence*

Thermoluminescence was used to further explore the effects of  $PbCl_2$  on charge recombination between donor and acceptor sides of PSII. The TL glow curves for untreated (Ctrl) and  $Pb^{2+}$ -treated thylakoid membranes following two single turn-over white flashes are displayed in Fig. 5A. The TL signal (Fig. 5A, Ctrl) attained its maximal intensity at the temperature of  $38^\circ C$ , characteristic of the temperature optimum for the B band appearing in the range between  $30$  and  $40^\circ C$ , as previously reported for this type of material (46-47). The B band is attributed to the charge recombination of  $S_2/S_3Q_B^-$  pairs produced by linear electron transport in PSII (48-51). The intensity of the B band progressively diminished as the concentration of  $PbCl_2$  increased (Fig. 5A). The addition of  $20\mu M$   $PbCl_2$  produced 13% decrease in TL intensity, and in the presence of  $2mM$   $PbCl_2$ , the TL intensity was suppressed completely. Also, the decline of the band was accompanied by an upshift of the maximal temperature ( $T_m$ ) from  $38^\circ C$  to  $41^\circ C$ .

The changes in the amplitude and  $T_m$  of the B band could be related to changes in the properties of the  $S_n$  states of the  $Mn_4Ca$  cluster and/or to modification of the  $Q_B$  binding site in the presence of  $PbCl_2$ . In order to elucidate the site of action of  $PbCl_2$  in the electron transport chain, the TL glow curves were recorded following two single turn-over white flashes in the presence of  $50\mu M$  of PSII inhibitor DCMU, known to block the electron flow beyond  $Q_A$ . DCMU eliminated the B band with a simultaneous appearance of Q band with a maximum at  $17^\circ C$ , attributed to the back-flow of electrons from  $Q_A^-$  to the  $S_2$ -state (48-51) (Fig. 5B). The reason for the absence of B band is that

since DCMU stops the electron flow past  $Q_A$ , the formation of  $Q_B^-$  and state  $S_3$  is not realized (49). The addition of 20  $\mu\text{M}$   $\text{PbCl}_2$  already suppressed 12% of the Q band intensity. A progressive decrease of the Q band was observed when the concentration of  $\text{PbCl}_2$  was further increased. The addition of 2 mM  $\text{PbCl}_2$  caused the loss of more than 90% of Q band intensity. This loss was accompanied by a strong upshift of  $T_m$  from 17°C to 27°C.

## Discussion

The negative action of  $\text{Pb}^{2+}$  on PSII photochemistry and electron transport, uninfluenced by PSI activity, was studied in thylakoid membranes using various approaches specific for PSII. Chlorophyll fluorescence induction kinetics measurements (Fig. 1) have shown that the fluorescence was greatly quenched when  $\text{PbCl}_2$  was added. Several authors postulated that damage caused by heavy metal ions (such as  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , and  $\text{Pb}^{2+}$ ) to plants was due to the substitution of the central Mg from the Chl a molecules thus causing fluorescence quenching (52-54, 22). However, measurements of pure Chl a or MgTPP fluorescence in ethanolic solution (Fig. 2) have demonstrated that the addition of  $\text{PbCl}_2$  has no effect on the excited states of Chl a and the structure of the pigment remains intact. The fluorescence quenching observed during Chl fluorescence induction is, therefore, related to the modifications in the photochemical activity of PSII.

The OJIP traces constitute an essential tool to study the activity and integrity of the photosynthetic apparatus under different stress conditions, providing the information on PSII photochemistry such as the electron transport on both donor and acceptor sides of the photosystem (32-33, 55). The IP step of the Chl fluorescence induction has been correlated with the photoreduction of the PQ pool (56-57). Thus, the observed decline in IP phase indicates a strong inhibition of the accumulation of reduced PQ especially at  $\text{Pb}^{2+}$  concentrations above 400  $\mu\text{M}$  (Fig. 1). This coincided with a decrease in the  $F_v/F_m$  values due to a decrease in  $F_m$  (Fig. 3) (23). This part of the induction is known to be more sensitive to the unfavourable treatments in comparison with the photochemical phase (OJI) (58). Indeed, the perturbation in the structure-function relations of the WOC

has been shown to correlate with the quenching of the IP fluorescence rise that results in a decline of Fm (36, 58). The above is in line with the previous reports showing that  $Pb^{2+}$  causes the release of extrinsic polypeptides associated with the WOC together with the  $Ca^{2+}$  and  $Cl^-$  required as cofactors (5, 25). Therefore, the inhibition of JIP rise and the more significant damping of the whole fluorescence induction kinetics above  $400 \mu M Pb^{2+}$  are the result of the disorganization of the WOC causing the lack of electron flow towards the acceptor side of PSII. The damage of the  $Mn_4Ca$  cluster is also supported by the decline of both Q and B thermoluminescence bands. Such inhibition of both  $S_2Q_A^-$  and  $S_2Q_B^-$  charge recombination (Q and B band, respectively) shows that the  $S_2$  state of the WOC becomes unavailable as the common recombination partner with increasing concentrations of  $PbCl_2$  and indicates a dysfunction of the WOC.

On the other hand, the OJ phase is related to the reduction state of  $Q_A$  (56, 59). The relative increase of OJ in the presence of low concentrations of  $PbCl_2$  (Fig. 1) is strongly indicative of a delayed electron transfer from  $Q_A^-$  to  $Q_B$ . This was indeed verified using the measurements of Chl fluorescence decay kinetics following a single turn-over flash (Fig. 4). The fluorescence decay was greatly retarded with the life-time of all three components being significantly increased even at concentrations below  $400 \mu M PbCl_2$  (Table 1). The amplitude of the fast component, attributed to electron transfer from  $Q_A^-$  to  $Q_B$ , diminished with a concurrent increase of the other components. Also, the decreased rate of  $Q_A^-$  reoxidation resulted in an increased amplitude of the slow component attributed to the back reactions with the  $S_2$  state of the  $Mn_4Ca$  cluster (42-43). This corresponds with the increased amplitude of the middle component of the decay measured in the presence of DCMU (Table 1), a component also attributed to  $S_2/Q_A^-$  recombination (44-45). Therefore, the population of PSII centers with a reduced  $Q_A$  that is reoxidized through  $S_2/Q_A^-$  recombination is increased but the rate of this reoxidation is strongly declined most likely due to the stabilization of the  $S_2$  state of the WOC (see below).

The delayed reoxidation of  $Q_A^-$  maybe interpreted in terms of an active site of  $Pb^{2+}$  being near  $Q_A$  or  $Q_B$ . Indeed, similar data were previously used to conclude that an inhibitory site of various metal cations was located between  $Q_A$  and  $Q_B$  (Fig. 6) (60-62). However, the destabilization of the WOC discussed above may also cause the delayed  $Q_A^-$  reoxidation. It was indeed shown that the removal of the extrinsic polypeptides or  $Ca^{2+}$  from the WOC can cause the diminished rate of  $Q_A^-$  reoxidation through a transmembrane conformational effect (42). Removal of  $Ca^{2+}$  from the WOC also produces a modification in the mid-point potential of  $Q_A$  thus altering the electron transfer process between  $Q_A$  and  $Q_B$  (63, 43). It can be postulated that this conformational change modifies the bicarbonate binding that is required for proper electron transfer from  $Q_A^-$  to  $Q_B$  (17, 18). Therefore, it is plausible that the action of  $Pb^{2+}$  at the WOC would cause this same transmembrane effect as was also proposed for the inhibitory action of  $Ni^{2+}$  and polyamines (64-65). This view is supported by the strong progressive upshift of the  $T_m$  of Q and B thermoluminescence bands with increasing concentrations of  $Pb^{2+}$  (Fig. 5). Such large increase in thermoluminescence temperature was previously associated with the stabilization of the  $S_2$  state of the WOC due to the modification in the ligand environment of the  $Mn_4Ca$  complex following the depletion in  $Cl^-$  or in 33 kDa extrinsic polypeptide (66-67). Therefore, the shift of  $T_m$  towards higher temperatures may be due to a change in the population of PSII centers with a stabilized  $S_2$  state owing to the action of  $Pb^{2+}$  causing a retarded  $Q_A^-$  reoxidation at low  $Pb^{2+}$  concentrations. This may represent an intermediate step in the inhibition of the WOC that precedes the serious damping of the fluorescence induction observed at high  $Pb^{2+}$  concentrations (Fig. 1).

Although an active site of  $Pb^{2+}$  at or near  $Q_B$  cannot be fully excluded, the negative action of  $Pb^{2+}$  is postulated to proceed in two steps. During the intermediate step, the environment of the  $Mn_4Ca$  complex is disorganized and the  $S_2$  state of the WOC is stabilized which consequently affects  $Q_A^-$  reoxidation and increases  $S_2/Q_A^-$  charge recombination (though the recombination proceeds at a slower rate compared to the control). During the final phase, the WOC is damaged more seriously leading to a loss of charge recombination and of PQ reduction.



## References

1. Prasad MNV, Strzałka S (1999) Impact of heavy metals on photosynthesis. In: Heavy Metal Stress in Plants, from Molecules to Ecosystems. Prasad MNV, Hagemeyer J, editors. Berlin: Springer. 117p.
2. Shaffer M (2001) Waste lands: the threat of toxic fertilizer. California's Advocate for the Public Interest Los Angeles CA.
3. Baker AJM, Walker PL (1990) Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants, heavy metal tolerance in Plants. In: Shaw AJ. Evolutionary Aspects. CRC Press Boca Raton. pp. 155-177.
4. Giardi MT, Masojidek J, Godde D (1997) Discussion on the stresses affecting the turnover of the D1 reaction center II protein. *Plant Physiol* 101: 635-642.
5. Rashid A, Camm EL, Ekramoddoullah KM (1994) Molecular mechanism of action of  $Pb^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  on water oxidizing complex of photosystem II. *FEBS Lett* 350: 296-298.
6. Chugh LK, Sawhney SK (1999) Photosynthetic activities of *Pisum sativum* seedlings grown in presence of cadmium. *Plant Physiol Biochem* 37: 297-303.
7. Van Assche F, Clijsters H (1990) Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ* 13: 195-206.
8. Morlot M (1996) Aspects analytiques du plomb dans l'environnement, édition Lavoisier TEC&DOC.
9. Babich H, Stotzky G (1980) Environmental factors that influence the toxicity of heavy metals and gaseous pollutants to microorganisms. *Crit Rev Microbiol* 8: 99-145.
10. Wani PA, Khan MS, Zaidi A (2007) Chromium reduction, plant growth-promoting potentials and metal solubilization by *Bacillus* sp. isolated from alluvial soil. *Curr Microbiol* 54: 237-243.
11. Raskin I, Ensley BD (2000) Phytoremediation of toxic metals; using plants to clean up the environment. John Wiley and Sons New York.
12. Callender E (2003) Heavy Metals in the Environment-Historical Trends. In: Lollar BS, editors. Environmental Geochemistry. Treatise on Geochemistry. Elsevier-Pergamon, Oxford. pp. 67-105.

13. Sterckeman T, Douay F, Proix N, Fourier H (2000) Vertical distribution of Cd, Pb and Zn in soils near smelters in the North of France. *Environ Pollut* 107: 377-389.
14. Petrouleas V, Crofts AR (2005) The iron-quinone acceptor complex. In: Photosystem II. The light-driven water: plastoquinone oxidoreductase. Wydrzynski T Satoh K, editors. Springer Dordrecht The Netherlands. pp. 177-206.
15. Guskov A, Kern J, Gabdulkhakov A, Broser M, Zouni A, et al., (2009) Cyanobacterial photosystem II at 2.9-angstrom resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nat Struct Mol Biol* 16: 334-342.
16. Jursinic P, Warden J, Govindjee (1976) Major site of bicarbonate effect in system-II reaction evidence from ESR signal-II<sub>vf</sub>, fast fluorescence yield changes and delayed light-emission. *Biochim Biophys Acta* 440: 322-330.
17. Robinson HH, Eaton-Rye JJ, van Rensen S, Govindjee (1984) The effects of bicarbonate depletion and formate incubation on the kinetics of oxidation-reduction reactions of the Photosystem II quinone acceptor complex. *Z Naturforsch C* 39: 382-385.
18. Eaton-Rye JJ, Govindjee (1988) Electron-transfer through the quinone acceptor complex of Photosystem-II after one or 2 actinic flashes in bicarbonate-depleted spinach thylakoid membranes. *Biochim Biophys Acta* 935: 248-257.
19. Farineau J, Mathis P (1983) Effect of bicarbonate on electron transfer between plastoquinones in Photosystem II. In: Inoue Y, Crofts AR, Govindjee, Murata N, Renger G, Satoh K, editors. The oxygen evolving system of photosynthesis. Academic Press Inc. pp. 317-325.
20. Van Rensen JJS, Tonk WJM, Debruijn SM (1988) Involvement of bicarbonate in the protonation of the secondary-quinone electron-acceptor of Photosystem II via the nonheme iron of the quinone-iron acceptor complex. *FEBS Lett* 226: 347-351.
21. Renger G (2011) Light induced oxidative water splitting in photosynthesis: Energetics, kinetics and mechanism. *J Photochem Photobiol B* 104: 35-43.
22. Qufei L, Fashui H (2009) Effects of Pb<sup>2+</sup> on the structure and function of photosystem II of *Spirodela polyrrhiza*. *Biol Trace Element Res* 129: 251-260.
23. Boucher N, Carpentier R (1999) Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, and Pb<sup>2+</sup>-induced changes in photosystem II photochemical yield and energy storage in isolated thylakoid membranes: A study using simultaneous fluorescence and photoacoustic measurements. *Photosynth Res* 59: 167-174.

24. Rashid A, Popovic R (1990) Protective role of  $\text{CaCl}_2$  against  $\text{Pb}^{2+}$  inhibition in Photosystem II. *FEBS Lett* 271:181-184.
25. Belatik A, Hotchandani S, Tajmir-Riahi HA, Carpentier R (2013) Alteration of the structure and function of photosystem I by  $\text{Pb}^{2+}$ . *J Photochem Photobiol B* In Press.
26. Joly D, Bigras C, Harnois J, Govindachary S, Carpentier R (2005) Kinetic analyses of the OJIP chlorophyll fluorescence rise in thylakoid membranes. *Photosynth Res* 84: 107-112.
27. Ducruet JM (2003) Chlorophyll thermoluminescence of leaf discs: simple instruments and progress in signal interpretation open the way to new ecophysiological indicators. *J Exp Bot* 54: 2419-2430.
28. Gauthier A, Govindachary S, Harnois J, Carpentier R (2006) Interaction of N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine with photosystem II as revealed by thermoluminescence: reduction of the higher oxidation states of the Mn cluster and displacement of plastoquinone from the QB niche. *Biochim Biophys Acta* 1757:1547-1556.
29. Rajagopal S, Egorova EA, Bukhov NG, Carpentier R (2003) Quenching of excited states of chlorophyll molecules in submembrane fractions of photosystem I by exogenous quinones. *Biochim Biophys Acta* 1606: 147-152.
30. Putrenko II, Vasiliev S, Bruce D (1999) Modulation of flash-induced photosystem II fluorescence by events occurring at the water oxidizing complex. *Biochemistry* 38: 10632-10641.
31. Ono TA, Noguchi T, Nakajima Y (1995) Characteristic changes of function and structure of photosystem II during strong light photoinhibition under aerobic conditions. *Biochim Biophys Acta* 1229: 239-248.
32. Strasser RJ, Govindjee (1992) On the O-J-I-P fluorescence transients in leaves and D1 mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. In: Murata N, editors. *Research in Photosynthesis*, Kluwer Academic Publishers Dordrecht The Netherlands. pp. 23-32.
33. Strasser RJ, Srivastava A, Govindjee (1995) Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochem Photobiol* 61: 32-42.

34. Bukhov NG, Egorova EA, Govindachary S, Carpentier R (2004) Changes in polyphasic chlorophyll a fluorescence induction curve upon inhibition of donor or acceptor side of photosystem II in isolated thylakoids. *Biochim Biophys Acta* 1657: 121-130.
35. Pospisil P, Dau H (2002) Valinomycin sensitivity proves that light-induced thylakoid voltages result in millisecond phase of chlorophyll fluorescence transients. *Biochim Biophys Acta* 1554: 94-100.
36. Boisvert S, Joly D, Carpentier R (2006) Quantitative analysis of the experimental O–J–I–P chlorophyll fluorescence induction kinetic apparent activation energy and origin of each kinetic step. *FEBS J* 273: 4770-4777.
37. Joly D, Carpentier R (2007) The oxidation/reduction kinetics of the plastoquinone pool controls the appearance of the I-peak in the O–J–I–P chlorophyll fluorescence rise: Effects of various electron acceptors. *J Photochem Photobiol B* 88: 43-50.
38. Barazzouk S, Kamat P, Hotchandani S (2005) Photoinduced electron transfer between chlorophyll a and gold nanoparticles. *J Phys Chem* 109: 716-723.
39. Anderson JM, Park YI, Soon WS (1998) Unifying model for the photoinactivation of Photosystem II in vivo under steady-state photosynthesis. *Photosynth Res* 56: 1-13.
40. Lazar D (2006) The polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light *Funct Plant Biol* 33: 9-30.
41. Babani F, Lichtenthaler HK (1996) Light-induced and age-dependent development of chloroplasts in etiolated barley leaves as visualized by determination of photosynthetic pigments, CO<sub>2</sub> assimilation rates and different kinds of chlorophyll fluorescence ratios. *J Plant Physiol* 148: 555-566.
42. Putrenko II, Vasiliev S, Bruce D (1999) Modulation of flash-induced photosystem II fluorescence by events occurring at the water oxidizing complex. *Biochemistry* 38:10632-10641.
43. Pospisil P, Tyystjärvi E (1999) Molecular mechanism of high temperature-induced inhibition of acceptor side of photosystem II. *Photosynth Res* 62: 55-66.
44. Mamedov F, Stefansson H, Albersson PA, Styring S (2000) Photosystem II in different parts of the thylakoid membrane: a functional comparison between different domains. *Biochemistry* 39:10478-10486.

45. Mamedov F, Rintamaäki E, Aro EM, Andersson B, Styring S (2002) Influence of protein phosphorylation on the electron-transport properties of Photosystem II. *Photosynth Res* 74:61-72.
46. Vass I, Govindjee (1996) Thermoluminescence from the photosynthetic apparatus. *Photosynth Res* 48:117-126.
47. Sane PV (2004) Thermoluminescence: a Technique for Probing Photosystem II. In: Carpentier R, editors. *Photosynthesis Research Protocols Humana Press*. Totova New Jersey USA. pp. 229-248.
48. Rutherford AW, Crofts AR, Inoue Y (1982). Thermoluminescence as a probe of photosystem II photochemistry the origin of the flash-induced glow peaks. *Biochim Biophys Acta* 682: 457-165.
49. Belatik A, Essamine J, Hutchandani S, Carpentier R (2012) Afterglow thermoluminescence band measured in isolated chloroplasts. *Photochem Photobiol* 88: 67-75.
50. Ducruet JM, Roman M, Ortega JM, Janda T (2005) Role of the oxidized secondary acceptor Q<sub>B</sub> of photosystem II in the delayed afterglow chlorophyll luminescence. *Photosynth Res* 84: 161-166.
51. Demeter S, Vass I. (1984) Charge accumulation and recombination in photosystem II studied by thermoluminescence. Participation of the primary acceptor Q and secondary B in the generation of thermoluminescence in chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 764: 24-32.
52. Rebeiz CA, Castelfranco PA (1973) Protochlorophyll and chlorophyll biosynthesis in cell-free systems from higher plants. *Ann Rev Plant Physiol* 24: 129-72.
53. Wu JT, Lorenzen H (1984) Effect of copper on photosynthesis in synchronous *Chlorella* cells. *Botanical Bull Acad Sinica* 25: 125-32.
54. Wu X, Liao C, Chunxiang Q, Hao H, Xianqing L, et al. (2008) Effects of lead on activities of photochemical reaction and key enzymes of carbon assimilation in spinach chloroplast. *Biol Trace Element Res* 126: 269-279.
55. Kruger GHJ, Tsimilli-Michael M, Strasser RJ (1997) Light stress provokes plastic and elastic modifications in structure and function of Photosystem II in camellia leaves. *Plant Physiol* 101:265-277.

56. Boisvert S, Joly D, Carpentier R (2006) Quantitative analysis of the experimental O-J-I-P chlorophyll fluorescence induction kinetics: Apparent activation energy and origin of each kinetic step. *FEBS J* 273: 4770-4777.
57. Joly D, Carpentier R (2007) The oxidation/reduction kinetics of the plastoquinone pool controls the appearance of the I-peak in the O-J-I-P chlorophyll fluorescence rise: Effects of various electron acceptors. *J Photochem Photobiol B* 88: 43-50.
58. Schmidt W, Neubauer C, Kolbowski J, Schreiber U, Urbach W (1990) Comparaison of effects of air pollutants (SO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>) on intact leaves by measurement of chlorophyll fluorescence and P700 absorbance changes. *Photosynth Res* 25: 241-248.
59. Gauthier A, Joly D, Boisvert S, Carpentier R (2010) Period-four modulation of photosystem II primary quinone acceptor (QA) reduction/oxidation kinetics in thylakoid membranes. *Photochem Photobiol* 86: 1064-1070.
60. Mohanty N, Vass I, Demeter S (1989) Impairment of photosystem II activity at the level of secondary quinone electron acceptor in chloroplasts treated with cobalt, nickel and zinc ions. *Physiol Plant* 76: 386-390.
61. Yruela I, G Gatzen, R Picorel, AR Holzwarth (1996) Cu(II)-inhibitory effect on Photosystem II from higher plants. A picoseconds time-resolved fluorescence study. *Biochemistry* 35: 9469-9474.
62. Sigfridsson KGV, Bernat G, Mamedov F, Styring S (2004) Molecular interference of Cd<sup>2+</sup> with photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 1659: 19-31.
63. Krieger A, Weis E, Demeter S (1993) Low pH-induced Ca<sup>2+</sup> ion release in the water-splitting system is accompanied by a shift in the midpoint redox potential of the primary quinone acceptor QA. *Biochim Biophys Acta* 1144: 411-418.
64. Boisvert S, Joly D, Leclerc S, Govindachary S, Harnois J, et al. (2007) Inhibition of the oxygen-evolving complex of photosystem II and depletion of extrinsic polypeptides by nickel. *Biomaterials* 20: 879-889.
65. Beauchemin R, Gauthier A, Harnois J, Boisvert S, Govindachary S, et al. (2007) Spermine and Spermidine inhibition of photosystem II: Disassembly of the oxygen evolving complex and consequent perturbation in electron donation from Tyr<sub>Z</sub> to P680<sup>+</sup> and the quinone acceptors QA<sup>-</sup> to QB. *Biochim Biophys Acta* 1767: 905-912.

66. Homann PH, Madabusi LV (1993) Modification of the thermoluminescence properties of Ca<sup>2+</sup> depleted photosystem II membranes by the 23 kDa extrinsic polypeptide and by oligocarboxylic acids. *Photosynth Res* 35: 29-39.
67. Vass I, Ono T, Inoue Y (1987) Stability and oscillation properties of thermoluminescent charge pairs in the O<sub>2</sub>-evolving system depleted of Cl<sup>-</sup> or the 33 kDa extrinsic protein. *Biochim Biophys Acta* 892: 224-235.

## Figure legends

**Figure 1.** Typical traces of Chl a fluorescence rise in isolated thylakoid membranes in the absence (Ctrl) or in the presence of PbCl<sub>2</sub> added in various concentrations (μM, unless specified in mM) as indicated by numbers adjacent to traces. See Materials and methods for details.

**Figure 2.** Fluorescence emission spectra of: (A) ethanolic solution of Chl a (2.5 μM) alone (-) and in presence of 1 mM PbCl<sub>2</sub> (---); (B) ethanolic solution of MgTTPP (2.5 μM) alone (-) and in presence of 1 mM PbCl<sub>2</sub> (---). In both cases, the excitation wavelength was 433 nm.

**Figure 3.** Effect of various concentration of PbCl<sub>2</sub> on Chl fluorescence induction parameters in thylakoids membranes. (A) F<sub>m</sub>, F<sub>v</sub> and F<sub>0</sub>, vs PbCl<sub>2</sub> (B) F<sub>v</sub>/ F<sub>m</sub> vs PbCl<sub>2</sub>. Each point is the average of nine experiments.

**Figure 4.** Effect of PbCl<sub>2</sub> on the relaxation of single turnover flash-induced Chl fluorescence yields in thylakoids membranes with different lead concentrations: 0 (black), 10 (sky blue), 100 (red), 1000 (blue) and 2000 μM (green). The measurements were performed in the absence (A) or in the presence (B) of 50 μM DCMU and all the traces were normalized. Each trace is the average of ten experiments.

**Figure 5.** Thermoluminescence spectra measured in isolated thylakoid membranes in the absence (A) or presence of 50 μM DCMU. PbCl<sub>2</sub> was added in various concentrations (μM, unless specified in mM) as indicated by numbers adjacent to traces.

**Figure 6.** Schematic representation of the proposed inhibitory sites of Pb<sup>2+</sup> in PSII.



**Table 1.** Effect of PbCl<sub>2</sub> on the relative amplitude (A) and half-life time ( $t_{1/2}$ ) of the exponential decay components of Chl a fluorescence yield after a single turnover flash measured in thylakoid membranes in the absence and in the presence of 50  $\mu$ M DCMU.

<b>Without DCMU</b>						
PbCl <sub>2</sub> ( $\mu$ M)	<u>Fast Phase</u>		<u>Middle Phase</u>		<u>Slow Phase</u>	
	$t_{1/2}$ ( $\pm 10\mu$ s)	A ( $\pm 5\%$ )	$t_{1/2}$ ( $\pm 0.3$ ms)	A ( $\pm 3\%$ )	$t_{1/2}$ (0.4s)	A ( $\pm 2\%$ )
0	430	69	6.1	22	5.9	9
10	690	61	7.5	26	7.1	13
100	987	45	11.3	35	12.1	20
1000	1440	28	16.8	43	15.6	29
2000	1590	19	18.2	46	17.2	35

<b>With DCMU</b>						
PbCl <sub>2</sub> ( $\mu$ M)	<u>Fast Phase</u>		<u>Middle Phase</u>		<u>Slow Phase</u>	
	$t_{1/2}$ ( $\pm 5$ ms)	A ( $\pm 4\%$ )	$t_{1/2}$ ( $\pm 0.03$ s)	A ( $\pm 3\%$ )	$t_{1/2}$ ( $\pm 0.3$ s)	A ( $\pm 2\%$ )
0	298	41	1.79	47	18.5	12
10	1130	26	1.92	53	22.1	21
100	1560	19	2.25	58	23.6	23
1000	-	-	4.35	68	31.2	32
2000	-	-	4.86	69	31.9	31

Fig. 1

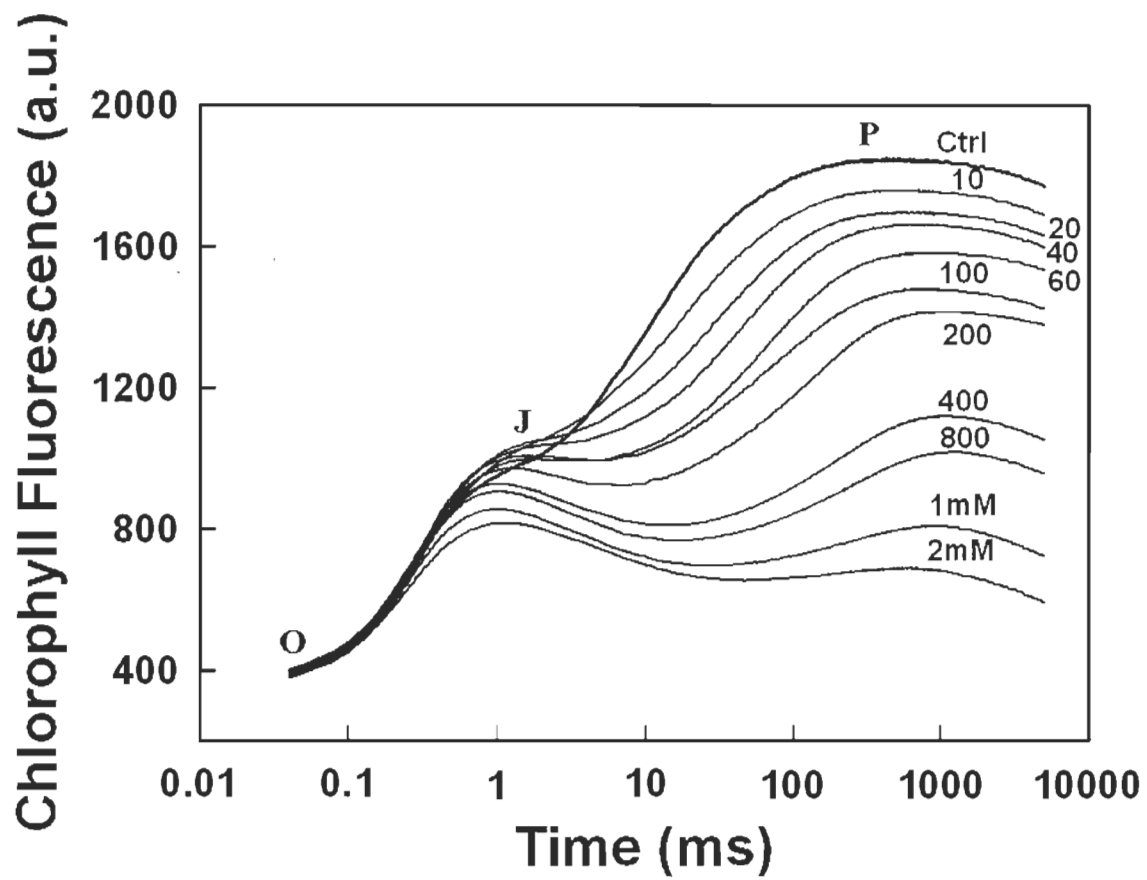


Fig. 2

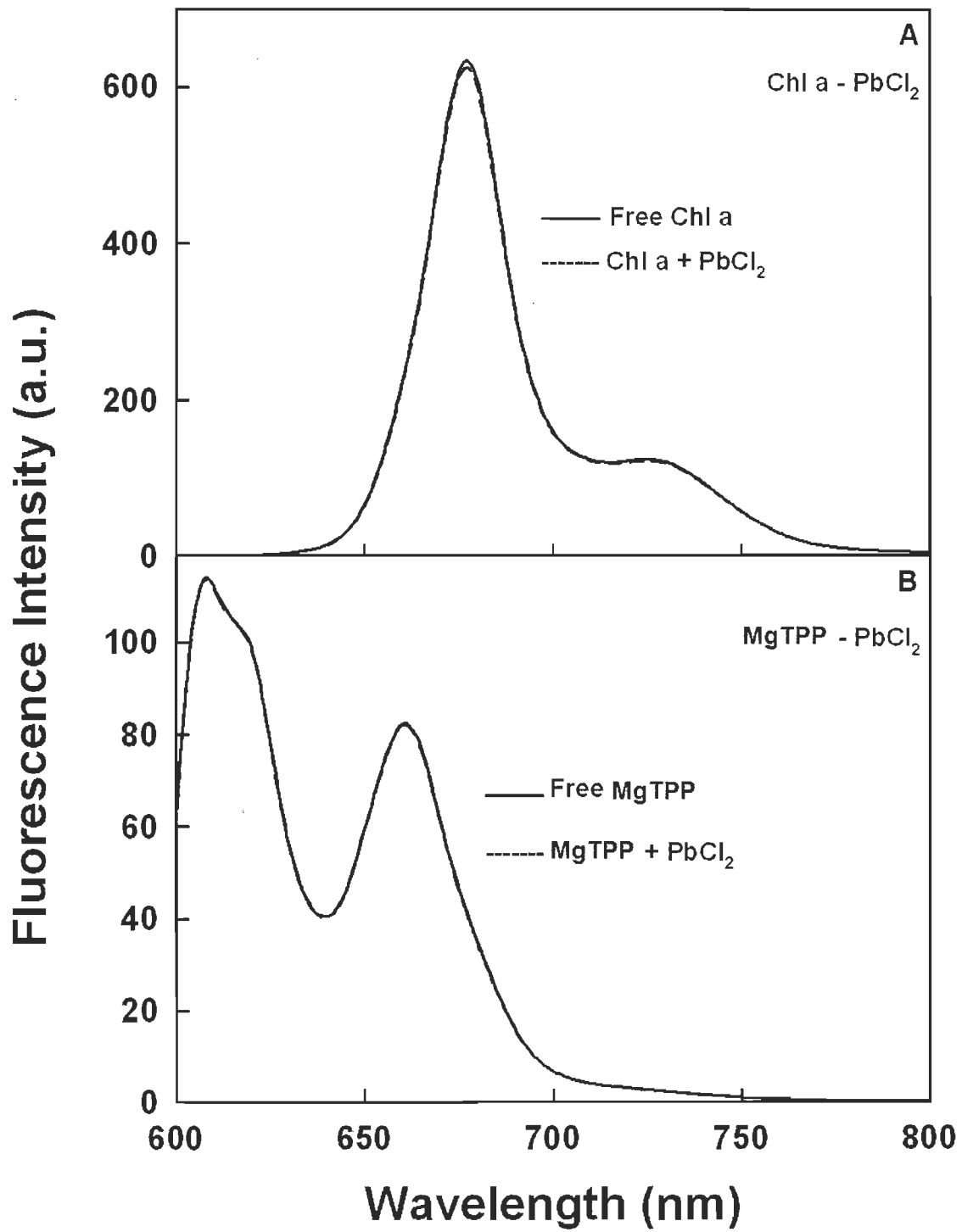


Fig. 3

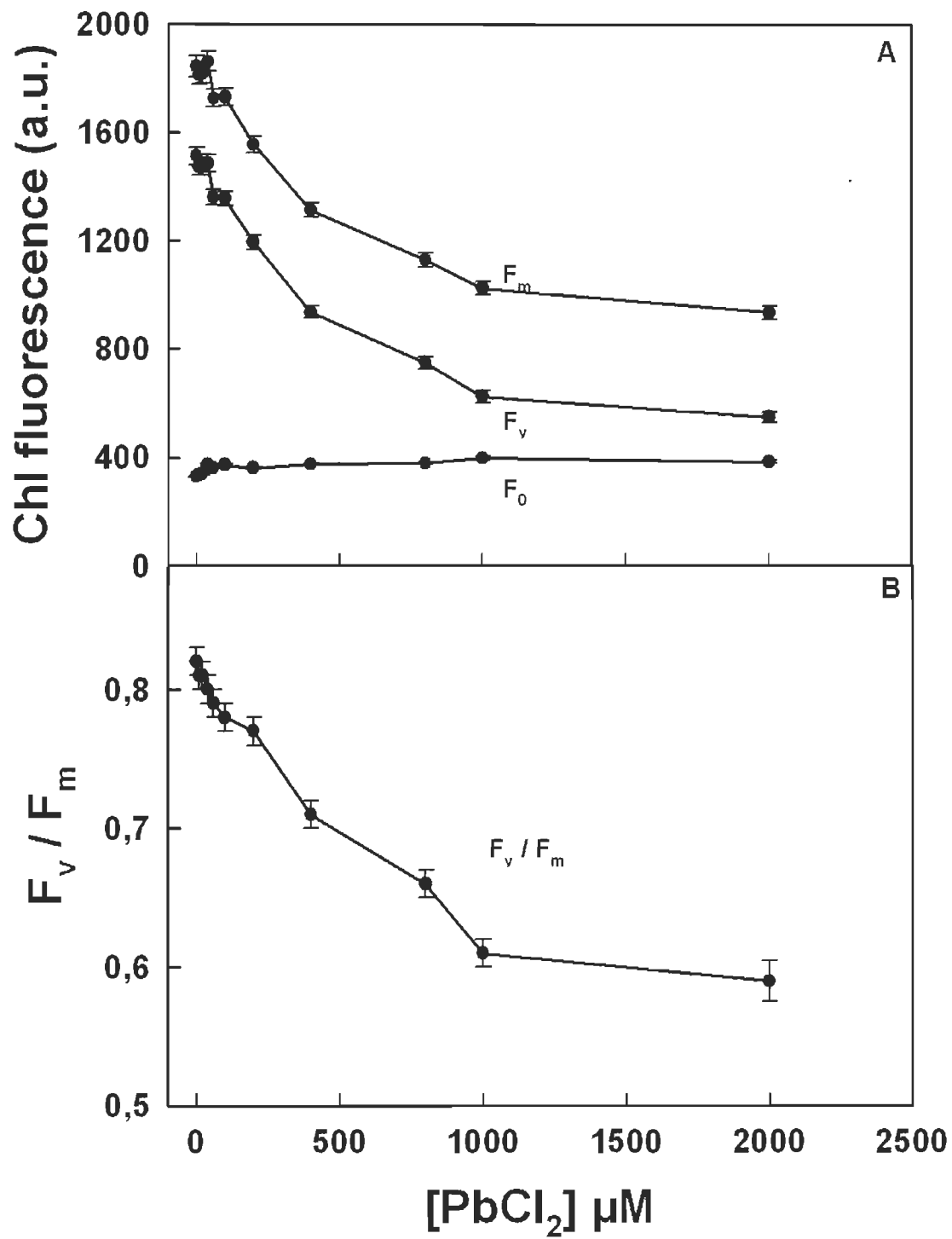


Fig. 4

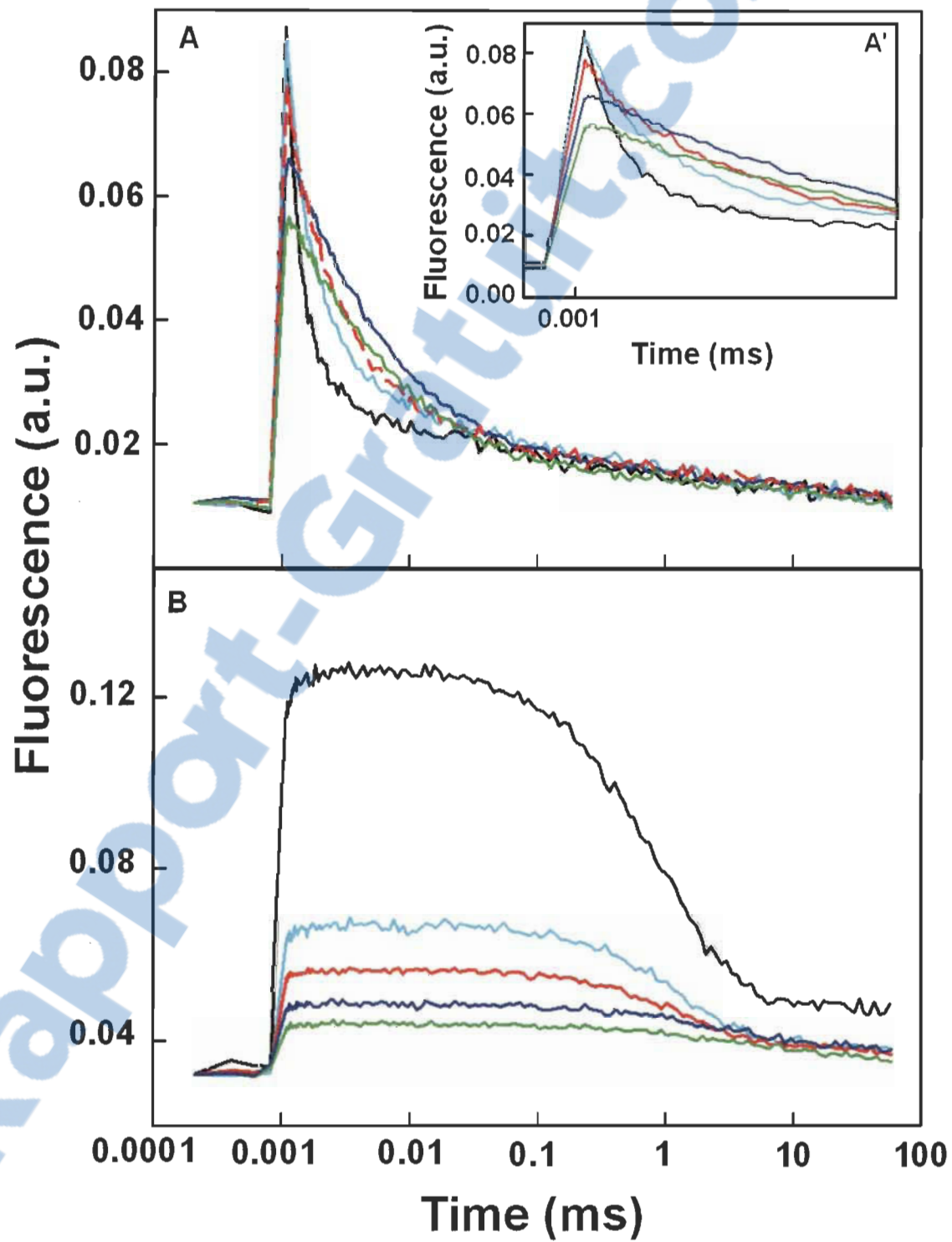


Fig. 5

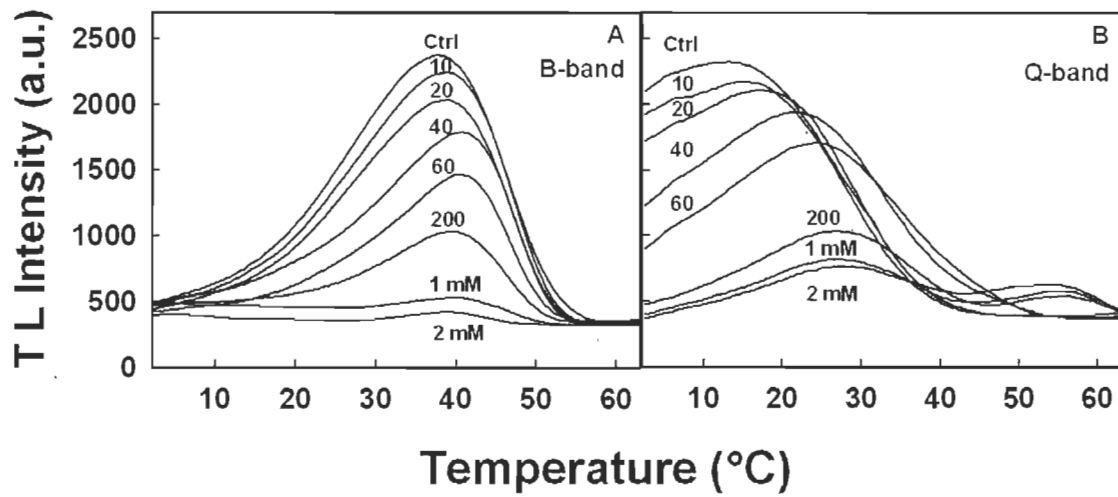
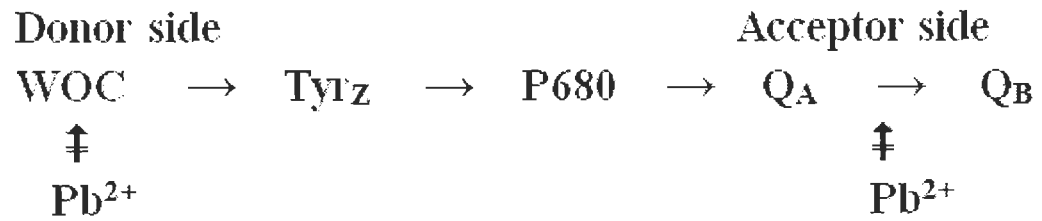


Fig. 6



## CHAPITRE V

### ALTERATION OF THE STRUCTURE AND FUNCTION OF PHOTOSYSTEM I BY $Pb^{2+}$

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en 2011 dans le journal, Journal of Photochemistry and Photobiology. Biology: Ahmed Belatik, Surat Hotchandani, Heidar-Ali Tajmir-Riahi and Robert Carpentier, Alteration of the Structure and Function of Photosystem I by  $Pb^{2+}$ . Volume 123: 41-47.



## 5.1 Résumé

Les effets toxiques de  $\text{Pb}^{2+}$  sur le transport des électrons dans l'appareil photosynthétique ont été étudiés dans les fractions membranaires enrichies de photosystème I (PSI) isolé des épinards. L'analyse structurale et spectroscopique par FTIR, fluorescence et spectroscopie de photoélectrons X (XPS) a montré que  $\text{Pb}^{2+}$  se lie aux protéines à travers les atomes d'azote et d'oxygène (le nombre de  $\text{Pb}^{2+}$  lié par PSI est 0,9) avec une constante de liaison de Stern Volmer de  $K_{\text{Pb-PSI}} = 4,9 \times 10^3 (\pm 0,2) \text{ M}^{-1}$ . Le  $\text{Pb}^{2+}$  a modifié la conformation du complexe protéique du PSI indiquant une déstabilisation structurelle partielle. Le transport d'électrons et les mesures de la photo-oxydation / réduction du P700 ont montré que l'interaction de  $\text{Pb}^{2+}$  avec le PSI a produit une limitation du côté donneurs d'électrons, probablement en raison de l'effet inhibiteur d'électrons du  $\text{Pb}^{2+}$  dans le voisinage de plastocyanine.

## 5.2 Troisième article scientifique

### **Alteration of the Structure and Function of Photosystem I by Pb<sup>2+</sup>**

Ahmed Belatik, Surat Hotchandani, Heidar-Ali Tajmir-Riahi and Robert Carpentier\*

Groupe de recherche en biologie végétale, Université du Québec à Trois-Rivières, C. P. 500, Trois-Rivières (Québec), G9A 5H7, Canada

**Keywords:** Pb cation, photosystem I, plastocyanin, fluorescence, XPS, electron transport.

**Abbreviations:** Asc, ascorbate; Chl, chlorophyll; Cyt, cytochrome; DCMU, 3 (3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea; DCPIP, 2,6-dichlorophenolindophenol; FR, far red; FTIR, Fourier transform infrared; MV, methylviologen; PC, plastocyanin; PSI, photosystem I; PSII, photosystem II; TMPD, N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine; XPS, X-ray photoelectron spectroscopy.

\* **Corresponding author:** Robert.Carpentier@uqtr.ca; Fax 819-376-5084

**Abstract**

The toxic effects of  $\text{Pb}^{2+}$  on photosynthetic electron transport were studied in photosystem I (PSI) submembrane fractions isolated from spinach. Structural and spectroscopic analysis using FTIR, fluorescence and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) showed that  $\text{Pb}^{2+}$  binds with proteins *via* oxygen and nitrogen atoms with an overall binding constant of  $K_{\text{Pb-PSI}} = 4.9 \times 10^3 (\pm 0.2) \text{ M}^{-1}$  and the number of bound  $\text{Pb}^{2+}$  cation was 0.9 per PSI complex.  $\text{Pb}^{2+}$  binding altered the protein conformation indicating a partial protein destabilization. Electron transport and P700 photooxidation/reduction measurements showed that the interaction of  $\text{Pb}^{2+}$  cations with PSI produced a donor side limitation of electron transport presumably due to  $\text{Pb}^{2+}$  binding to or in the vicinity of plastocyanin.

## Introduction

Lead is a potent environmental toxin that, as a result of human activity, has accumulated 1000-fold above its natural level of average 10 parts per million (ppm) with a range of 7 to 20 ppm present in surface agricultural soils across the United States [1-2]. Plants exposed to toxic metal cations need to develop some degree of tolerance to metal toxicity in order to survive because the photosynthetic organisms are highly sensitive to it [3]. While the noxious effects of lead on plant growth have been known for many years, the exact mechanism of  $Pb^{2+}$  toxicity still eludes the scientific community. Heavy metals in general can cause the disruption of many physiological functions and substitute for the essential ions as well (for reviews see: [4-6]). Indeed, it is well established that at high internal concentrations, Pb disturbs almost all physiological processes in plants.

Photosynthesis is one of the most Pb-sensitive processes in plants. Lead toxicity has multifunctional adverse effects on photosynthetic  $CO_2$  fixation *in vivo* and *in vitro*. Long term exposure results in reduced leaf growth, decreased level of photosynthetic pigments, altered chloroplasts ultra-structure and decreased enzymatic activity of  $CO_2$  assimilation [7-9]. *In vitro*, with isolated chloroplasts, the inhibition of photosynthetic electron transport and photochemical activity by  $Pb^{2+}$  has been observed [10-13]. However, its mode of action on the photosynthetic apparatus is not fully understood. Although some knowledge has been accumulated about the interaction of lead with PSII where it is reported that  $Pb^{2+}$  mainly affects the oxygen evolving complex [see 13 and references therein], very little information is available with regard to the action of  $Pb^{2+}$  on PSI.

PSI is a pigment-protein complex located in the thylakoid membrane of cyanobacteria, algae and chloroplasts of higher plants that mediates electron flow from PSII to  $NADP^+$ . The excitation energy in the antenna pigments of PSI is promptly transferred to P700 (a special pair of Chl *a* molecules and the primary electron donor in PSI). In its lowest electronically excited state, P700 donates an electron to the primary electron acceptor, A0 (a Chl *a* molecule). Charge separation and stabilization through

the secondary acceptor A1 (a phylloquinone molecule, the secondary electron acceptor), and terminal iron–sulfur [4Fe-4S] centers (FX, FA, and FB), result in the reduction of ferredoxin (Fd) located at the stromal side [14-15]. The P700<sup>+</sup> cation formed after charge separation is then re-reduced by the copper protein plastocyanin (PC), a mobile carrier of the thylakoids lumen. In turn, the oxidized PC receives electrons from Cyt b6/f. PSII photooxidizes water to oxygen and supplies electrons to Cyt b6/f [14, 16-18].

In this work, we have examined the interaction of Pb<sup>2+</sup> with PSI in isolated PSI submembrane fractions to determine the Pb<sup>2+</sup> binding site and the effect of metal ion interaction on the photosystem. Various spectroscopic approaches such as FTIR, XPS and fluorescence were applied along with measurements of oxygen uptake and P700 photooxidation/reduction kinetics to assess the effect of Pb<sup>2+</sup> on PSI structure and function. It was found that Pb-protein interaction greatly influenced the stability and conformation of PSI leading to the inhibition of the electron transfer process on the donor side of PSI. To our knowledge, this is the first study showing a possible inhibitory site of Pb<sup>2+</sup> on PC.

## **Materials and methods**

### *Isolation of PSI submembrane fractions*

PSI submembrane fractions were isolated from fresh spinach leaves obtained from the local market, according to the procedure reported [19] with some modifications [20]. The isolated preparations with Chl content of 2–3 mg Chl mL<sup>-1</sup> were suspended in a medium containing 20 mM Tricine-KOH buffer (pH 7.8), 10 mM NaCl, 10 mM KCl, and 5 mM MgCl<sub>2</sub>, and stored at -80°C until use. Chl concentration was determined in 80% acetone according to the published method [21]. The Chl a/b ratio was greater than 6.

### *FTIR spectroscopic measurements*

Infrared spectra were recorded on a FTIR spectrometer (Impact 420 model), equipped with deuterated triglycine sulphate (DTGS) detector and KBr beam splitter using AgBr windows. PbCl<sub>2</sub> was added to the PSI submembrane fractions to obtain the desired Pb<sup>2+</sup> concentrations of 0.125 and 0.5 mM. Spectra were collected after 4-h incubation of PSI with Pb at room temperature using hydrated films. Interferograms were accumulated over the spectral range 4000-600 cm<sup>-1</sup> with a nominal resolution of 2 cm<sup>-1</sup> and 100 scans. The difference spectra [(PSI submembrane fractions + Pb) – (PSI submembrane fractions)] were generated using the water combination mode at around 2300 cm<sup>-1</sup> as standard [22]. When producing difference spectra, this band was adjusted to the baseline level in order to normalize the difference spectra.

### *Analysis of protein conformation*

The analysis of the secondary structure of the proteins in the PSI submembrane fractions and their Pb<sup>2+</sup> complexes was carried out on the basis of the procedure previously reported [23]. The protein secondary structure was determined from the shape of the amide I band located around 1650-1660 cm<sup>-1</sup>. The FTIR spectra were smoothed and their baselines were corrected automatically using Grams AI software. Thus the root-mean square (rms) noise of every spectrum was calculated. By means of the second derivative in the spectral region 1700-1600 cm<sup>-1</sup>, six major peaks were resolved. The above spectral region was deconvoluted by the curve-fitting method with the Levenberg-Marquadt algorithm and the peaks, corresponding to  $\alpha$ -helix (1660-1654 cm<sup>-1</sup>),  $\beta$ -sheet (1637-1614 cm<sup>-1</sup>), turn (1678-1670 cm<sup>-1</sup>), random coil (1648-1638 cm<sup>-1</sup>) and  $\beta$ -antiparallel (1691-1680 cm<sup>-1</sup>), were adjusted and the area was measured with the Gaussian function. The area of all the component bands assigned to a given conformation were then summed up and divided by the total area [24-25]. The curve-fitting analysis was performed using the GRAMS/AI Version 7.01 software of the Galactic Industries Corporation.

*X-ray photoelectron spectroscopy*

XPS was performed on a Kratos Axis Ultra spectrometer (Kratos Analytical Ltd., UK), using a monochromatic Al K $\alpha$  X-ray source ( $E = 1486.6$  eV) with a power of 225 W at a take-off angle of  $90^\circ$  relative to the sample surface. 250  $\mu$ L of the sample which consisted of PSI submembrane fractions or PSI submembrane fractions mixed with PbCl $_2$  (500  $\mu$ M) were dropped on an aluminum substrate and dried in a vacuum desiccator overnight to obtain a thin film. The dried sample was then transferred to the XPS sample holder. The measurements were made under a high vacuum of  $10^{-9}$  torr at room temperature. The surface of the sample was 20 mm $^2$  and the investigated area was typically  $1 \times 2$  mm $^2$ . Survey spectra for each sample over a binding energy range of 0–1300 eV were an average of three scans (at three different points) acquired at a pass energy of 160 eV and resolution of 1 eV/step (lens in hybrid mode, which assures maximum sensitivity). High-resolution spectra of C 1s, N 1s and O 1s were an average of five scans acquired at a pass energy of 40 eV and resolution of 0.1 eV/step for quantitative measurements of binding energy and atomic concentration. Because of the potential degradation of the surface during X-ray exposure, the spectra were collected in the same order (survey, C 1s, O 1s, N 1s) such that the amount of exposure to X-rays was equivalent for all analyzed samples. The CasaXPS software was used for background subtraction (Shirley-type), peak integration, fitting and quantitative chemical analysis. The C 1s (C–C) peak at 285 eV was used to calibrate the binding energy scale. Binding energies values are given at  $\pm 0.2$  eV. Gaussian peak profiles were used for spectral deconvolution of all spectra as described before [26]. The assay medium contained 20 mM Tricine-KOH buffer (pH 7.8), 10 mM NaCl, 10 mM KCl, and 5 mM MgCl $_2$ , and a final chlorophyll concentration of 250  $\mu$ g mL $^{-1}$ . The magnesium metal binding energy was not recorded due to the poor signal to background counting ratio caused by the low core level cross-section of the Mg 1s level, as observed in other report [27].

### *Fluorescence spectroscopy*

Fluorometric experiments were carried out at room temperature ( $24.5 \pm 0.5$  °C) with a Perkin Elmer LS55 Spectrometer equipped with a red-sensitive photomultiplier R928. Photosynthetic samples were kept in the dark before use. PSI submembrane fractions were diluted to  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  with the buffer. PSI samples were excited at 436 nm and fluorescence emission spectra were recorded from 600 to 800 nm as previously reported [28]. The excitation and emission slit widths were fixed at 5 and 2.5 nm, respectively, and emission spectra were corrected according to the photomultiplier sensitivity using the correction factor spectrum provided by Perkin-Elmer.

### *Oxygen uptake measurements*

PSI-mediated electron transfer from reduced 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIPH<sub>2</sub>) to methylviologen (MV) was measured by light-induced O<sub>2</sub> consumption using a Clark type oxygen electrode at 24 °C as described earlier [29]. White light was provided by a 150 W quartz-halogen projector lamp. The samples were diluted in a buffer containing 20 mM Tricine-KOH (pH 7.8), 10 mM NaCl, 10 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 500  $\mu\text{M}$  MV, 1 mM NaN<sub>3</sub>, 100  $\mu\text{M}$  DCIP (or 50  $\mu\text{M}$  TMPD), 1 mM Asc, and 50  $\mu\text{M}$  DCMU to obtain PS I submembrane fractions with 10  $\mu\text{g Chl mL}^{-1}$ . Prior to the measurements, the samples were incubated in dark for 5 min.

### *Redox state of P700*

Photo-oxidation and subsequent dark reduction measurements of P700 were monitored as light-induced absorbance changes at 830 nm, ( $\Delta A_{830}$ ), at room temperature, using the dual wavelength emitter detector ED-P700DW connected via a PAM-101 fluorometer (Walz, Effeltrich, Germany). The ED-P700DW unit strictly detects the differential absorbance changes at 830 nm ( $\Delta A_{830}$ ) ascribed to the absorption due to P700<sup>+</sup> cation radical and removes the plastocyanin absorbance changes as described before [30-31]. Photon flux density of far-red (FR) light ( $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) was obtained by passing the beam from a Filtre-Lite light source (Microview, Thornhill, ON, Canada)



through a RG-9 filter (Schott, Mainz, Germany). The assay medium contained 20 mM Tricine-KOH buffer (pH 7.8), 10 mM NaCl, 10 mM KCl, and 5 mM MgCl<sub>2</sub>, and a final Chl concentration of 200 µg mL<sup>-1</sup>.

## Results

### *XPS studies*

In order to investigate the binding of Pb<sup>2+</sup> (used as PbCl<sub>2</sub>) to the PSI submembrane fractions, we have carried out X-ray photoelectron spectroscopic studies. Figure 1 shows the XPS results of C 1s, N 1s and O 1s levels with their respective deconvolutions. The C 1s signal for PSI submembrane fractions with or without Pb (Fig. 1A and A') fitted with three contributions corresponding to well identified carbon bonds present in the protein: the first named C<sub>1</sub>, at the lowest binding energy of 285.0 eV, is attributed to C-C, C=C and C-H; the peak C<sub>2</sub>, at 286.4 eV, is assigned to C-N and C-O single bonds, and the last peak C<sub>3</sub>, at 288.3 eV, is attributed to O=C-O and O=C-N (peptides bonds) [32-34, 26]. The N 1s XPS core level spectrum, obtained in the same conditions as the C 1s, is presented in Fig. 1B and B'. For the PSI submembrane fractions without Pb<sup>2+</sup>, the deconvolution (Fig. 1B) reveals the presence of two components, N<sub>1</sub>, at the binding energy of 400.1 eV, which has been attributed to C-N (amide band), while the peak N<sub>2</sub> at 402.1 eV corresponds to the protonated amino groups (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>). In the presence of Pb<sup>2+</sup> (Fig. 1B'), however, the deconvolution of the spectrum reveals the presence of three components, N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub> and N<sub>3</sub>, attributed to C-N, NH<sub>3</sub><sup>+</sup> and NH<sub>2</sub> and positioned at 400.1 eV 401.9 eV and 398.1 eV, respectively [35-37]. The high resolution of O 1s XPS spectra and its binding energy, obtained in the same conditions as for C 1s and N 1s, are shown in Fig. 1C and C'. The deconvolution gave two fitting peaks in O 1s curves (in both the presence and absence of Pb). The peaks indicated two different types of oxygen linkages. The peak at lower binding energy (531.3 eV) labeled as O<sub>1</sub> represents oxygen bonded to carbon in double bond (C=O), whereas the second one (532.8 eV) labeled as O<sub>2</sub> is characteristic of the C-O bond (Fig. 1C). The intensity of both oxygen peaks

decreased after treatment with  $\text{Pb}^{2+}$  (Fig. 1C'). These assignments are consistent with previous literature reports [38].

The results from XPS clearly show that N and O atoms are major metal ion binding sites in these PSI-Pb complexes. The experimental atomic compositions as determined from the XPS spectral analysis and the calculated oxygen and nitrogen to carbon ratios (O/C and N/C) for all samples (before and after  $\text{Pb}^{2+}$  treatment) are presented in Table 1. Major changes in the percentages of carbon, oxygen and nitrogen atoms are observed. It is interesting to note that the percentages for O and N atoms were decreased upon  $\text{Pb}^{2+}$  binding. The major ratio changes observed for N and O atoms indicate the direct  $\text{Pb}^{2+}$  coordination with nitrogen and oxygen, while the alterations of C ratios can be related to the linkage of C atom to N and O atoms [35-38].

#### *FTIR spectroscopy*

The effects of  $\text{Pb}^{2+}$  binding to the PSI submembrane fractions on protein structure were studied by infrared spectroscopy and its derivative methods. A quantitative analysis of the protein secondary structure of the PSI submembrane fractions without additive and with different  $\text{Pb}^{2+}$  concentrations in hydrated films has been carried out and the results are shown in Fig. 2. The free PSI has 56 %  $\alpha$ -helix ( $1650\text{ cm}^{-1}$ ),  $\beta$ -sheet 22% ( $1610, 1620$  and  $1630\text{ cm}^{-1}$ ), turn structure 5% ( $1665\text{ cm}^{-1}$ ), and  $\beta$ -antiparallel 17% ( $1680\text{ cm}^{-1}$ ) (Fig. 2A) consistent with the previous spectroscopic studies of PSI submembrane fractions [39]. Addition of  $125\text{ }\mu\text{M}$   $\text{PbCl}_2$  produced a decrease of  $\beta$ -antiparallel from 17% (free PSI) to 13% (Pb complex) and an increase in the turn structure from 5% to 12% was observed (Fig. 2B). Further, with raising the  $\text{Pb}^{2+}$  concentration to  $500\text{ }\mu\text{M}$ , the above changes were also accompanied by a decrease of  $\alpha$ -helix from 56% (free PSI) to 49% (Pb complex) with an increase of  $\beta$ -sheet from 22% to 27% (Fig. 2C). The conformational changes observed indicate of a partial protein destabilization.

### Fluorescence spectroscopy

Figure 3A shows the room temperature Chl fluorescence spectra of isolated PSI submembrane fractions in the absence or presence of various concentrations (1 to 200  $\mu\text{M}$ ) of  $\text{PbCl}_2$ . The fluorescence of untreated PSI submembrane fractions showed a peak at 682 nm and a shoulder at 736 nm as described before [28, 40]. The yield of Chl fluorescence declined with increasing concentration of  $\text{PbCl}_2$  (Fig. 3B). A decline of 4% was already observed at 1  $\mu\text{M}$  of  $\text{PbCl}_2$ , and at 200  $\mu\text{M}$  of  $\text{PbCl}_2$  up to 51% of the emission was lost. The extent of the quenching was similar for all wavelengths of the emission spectra. The inset of Fig. 3A shows that the quenching of Chl fluorescence by  $\text{Pb}^{2+}$  occurred according to the Stern-Volmer equation [41-42]:

$$F_0/F = 1 + K_{sv}[Q] \quad (1)$$

where  $F_0$  and  $F$  are the Chl fluorescence emission intensities in the absence and presence of quencher, respectively,  $K_{sv}$  is the Stern-Volmer quenching constant, and  $[Q]$  is the concentration of added  $\text{PbCl}_2$  quencher. From the slope of the linear fit, which characterizes the Stern-Volmer plot of the relative efficiency of  $\text{PbCl}_2$  quencher, the  $K_{sv}$  value was estimated to be  $4.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ .

On the assumption that there are ( $n$ ) substantive binding sites for quencher ( $Q$ ) on PSI submembrane fractions ( $P$ ), the binding reaction can be shown as follows:



The binding constant ( $K$ ), can be calculated as:

$$K = [Q_nP]/[Q]^n [P] \quad (3)$$

Where  $[Q]$  and  $[P]$  are the quencher and PSI concentration, respectively,  $[Q_nP]$  is the concentration of non fluorescent fluorophore—quencher complex and  $[P_0]$  gives total concentration.

$$[Q_n P] = [P_0] - [P] \quad (4)$$

$$K = ([P_0] - [P]) / [Q]^n [P] \quad (5)$$

The fluorescence intensity is proportional to the PSI submembrane fractions concentration, i.e.,

$$[P] / [P_0] \propto F / F_0 \quad (6)$$

Results from fluorescence measurements can be used to estimate the binding constant of Pb-PSI complex and the number (n) of the heavy metal  $Pb^{2+}$  bound per PSI submembrane fractions following eq. (7) [41-42].

$$\text{Log} [(F_0 - F) / F] = \text{log} K + n \text{log} [PbCl_2] \quad (7)$$

The linear plot of  $\text{log} [(F_0 - F) / F]$  vs  $\text{log} [PbCl_2]$  is shown in Fig. 4; the value of n from the slope of the straight line is 0.9, indicating that about one  $Pb^{2+}$  cation binds per PSI complex.

#### *Oxygen uptake*

The rates of light saturated  $O_2$  uptake observed in dark adapted PSI submembrane fractions are reported in Fig. 5. In the presence of DCIPH<sub>2</sub> as artificial electron donor and MV as electron acceptor,  $O_2$  uptake was strongly inhibited by the addition of  $Pb^{2+}$ . The inhibition increased with  $Pb^{2+}$  concentration (Fig. 5). A similar extent of inhibition was observed when the couple TMPD/Asc was used as electron donor instead of DCPIP/Asc.

#### *Redox state of P700*

The action of various concentrations of  $Pb^{2+}$  cation on electron transport in PSI were also studied using the oxidation and reduction kinetics of P700 measured after

irradiation of isolated submembrane fractions of PSI with FR light. Figure 6 shows the traces of  $\Delta A_{830}$  recorded with control (0.0), i.e., untreated submembrane fractions of PSI, and in PSI treated with various concentrations of  $\text{PbCl}_2$ . Positive change in  $\Delta A_{830}$  indicates photooxidation of P700. Without Pb, the photooxidation kinetics shows an initial fast rise followed by a slower phase that rapidly leads to a steady state. Increasing concentrations of Pb cation added as  $\text{PbCl}_2$  from 1  $\mu\text{M}$  to 200  $\mu\text{M}$  increased the amplitude of the slow phase of P700 photooxidation compared to PSI without additive and a steady state level was not attained during the illumination period. In the absence of  $\text{Pb}^{2+}$ , the termination of the FR light leads to a slow dark re-reduction of oxidized P700 (Fig. 6). Fig. 6 shows the rate and extent of this decay of  $\Delta A_{830}$  decreased markedly with increasing concentrations of Pb cation.

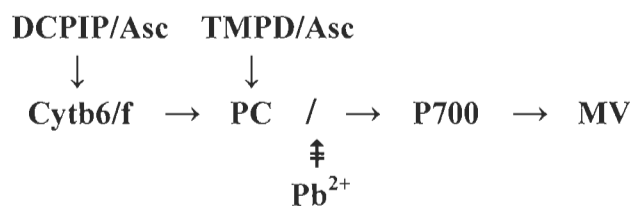
## Discussion

PSI submembrane fractions isolated from spinach were employed here as a model system to obtain a better insight into the Pb-induced changes on PSI. These PSI submembrane fractions are composed of about 260 Chl/RC [19-20, 39] and contain the components of PSI involved in cyclic electron transport, in amounts originally present in the intact chloroplast, including the Cytb6/f complex and PC [19-20, 39]. Therefore, they constitute a fully competent PSI electron transport system without the components of PSII.

Spectroscopic analysis of  $\text{Pb}^{2+}$  cation binding by FTIR and XPS showed that  $\text{Pb}^{2+}$  binds PSI polypeptides *via* O and N atoms with an overall binding constant  $4.9 \times 10^3 \text{M}^{-1}$ . Below 0.2 mM, the interaction of Pb was limited to the loss of  $\beta$ -antiparallel sheets (Fig. 2). However, more profound effects on the protein structure were noticed at higher concentrations. At 0.5 mM Pb content, the FTIR data indicated a strong perturbation of PSI with a significant loss of  $\alpha$ -helix structure, thus showing a strong chaotropic action of Pb cations at more elevated concentration. Measurements of Chl fluorescence quenching by  $\text{Pb}^{2+}$  at concentrations below 0.2 mM have shown that about 1 Pb cation was bound per PSI complex (Fig. 4). The modification of protein structure observed at

these  $\text{Pb}^{2+}$  concentrations, loss of  $\beta$ -antiparallel sheets, is thus limited to a specific region of PSI and most probably located at an extrinsic part of the PSI complex in the vicinity where  $\text{Pb}^{2+}$  has an accessible binding site.

Localization of this major binding site of  $\text{Pb}^{2+}$  was obtained using electron transport measurements. Oxygen uptake rates measured using MV as electron acceptor with either DCPIP/Asc or TMPD/Asc as artificial electron donor declined in a very similar manner with increasing concentrations of  $\text{Pb}^{2+}$  (Fig. 5). DCPIP donates electrons at the Cytb6/f complex but TMPD is oxidized by PC (see Scheme 1) [43]. The inhibition of oxygen uptake with TMPD as electron donor shows that  $\text{Pb}^{2+}$  inhibits electron transport at or beyond PC (Scheme 1).



**Scheme 1**

Inhibition on the donor site of PSI was demonstrated by the P700 photooxidation experiments (Fig. 6). It was shown previously that the inhibition of electron transport on the donor side of PSI was necessary to obtain a more complete oxidation of the photooxidizable P700 [15]. The stronger photooxidation observed in the presence of  $\text{Pb}^{2+}$  (Fig. 6) clearly indicates that electron transfer was limited on the donor side of PSI. The dark re-reduction of  $\text{P700}^+$  was greatly inhibited by  $\text{Pb}^{2+}$  due to this same donor side limitation. The dark decay of  $\Delta A_{830}$  is attributed to  $\text{P700}^+$  reduction by electrons transferred from Cyt b6/f to PC and then to  $\text{P700}^+$  [14]. Thus, it can be concluded that  $\text{Pb}^{2+}$  block the electron transfer between PC and P700 (Scheme 1).

From the above it is plausible that  $\text{Pb}^{2+}$  would bind near or at PC. Plastocyanin is an extrinsic polypeptide that contains a Cu ion [44]. As  $\text{Pb}^{2+}$  cations are already known to mimic the effects of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  at specific molecular targets [45-46],  $\text{Pb}^{2+}$  could

also perturb the Cu binding site of PC. This mode of inhibition in PSI would be similar to the inhibition in PSII where it is proposed to affect the extrinsic polypeptides associated with the oxygen evolving complex thus destabilizing the Mn cluster and the  $\text{Ca}^{2+}$  and/or  $\text{Cl}^-$  involved as cofactors [15]. It has been found that metal ions soluble in water can bind to protein and compete with other protein-binding metals such as Hg, Cd and Cu [44, 47-49]. It is shown here that  $\text{Pb}^{2+}$  interaction alters the protein conformation inducing a partial protein destabilization. An alteration of Cu binding in PC would certainly alter the electron transport activity. The inhibition of electron transport by  $\text{Pb}^{2+}$  thus likely operates through a similar process as  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  that are also associated with the inactivation of PC in the intersystem electron transport chain [44, 47-49].

## References

- [1] <http://www.cdc.gov/nceh/lead/>, Center for Disease Control and Prevention, 2011.
- [2] G.G. Holmgren, M.W. Meyer, R.L. Chaney, R.B. Daniels. Cadmium, lead, copper, and nickel in agricultural soils of the United States of America. *J. Environ. Qual.* 22 (1993) 335-348.
- [3] A.A. Meharg, Integrated tolerance mechanisms: constitutive and adaptive plant responses to elevated metal concentrations in the environment, *Plant Cell Env.* 17 (1994) 989-993.
- [4] R.K. Sharma, M. Agrawal, Biological effects of heavy metals: An overview, *J. Env. Biol.* 26 (2005) 301-313.
- [5] J. Garty, Biomonitoring Atmospheric Heavy Metals with Lichens: Theory and Application, *Crit. Rev. Plant Sci.* 20 (2001) 309-371.
- [6] F. Van Assche, H. Clijsters, Effects of metals on enzyme activity in plants, *Plant Cell Env.* 13 (1990) 195-206.
- [7] E. Islam, D. Liu, T. Li, X. Yang, X. Jin, Q. Mohmood, S. Tian, J. Li, Effect of Pb toxicity on leaf growth, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of *Elsholtzia argyi*, *J. Hazard. Mater.* 154 (2008) 914-926.
- [8] E. Parys, E. Romanowska, M. Siedlecka, J. W. Poskuta, The effect of lead on photosynthesis and respiration in detached leaves and in mesophyll protoplasts of *Pisum sativum*, *Acta Physiol. Plant.* 20 (1998) 313-322.
- [9] H.M. Rebechini, L. Hanzely, Lead-induced ultra-structural changes in chloroplasts of the hydrophyte, *Ceratophyllum demersum*, *J. Plant Physiol.* 73 (1974) 377-386.
- [10] C.D. Miles, J.R. Brandle, D.J. Daniel, O. Chu-Der, P.D. Schnare, D.J. Uhlik (1972) Inhibition of photosystem II in isolated chloroplasts by lead, *Plant Physiol.* 49:820-825.
- [11] I.S. Shearan, R. Singh, Effect of heavy metals on photosynthesis in higher plants. In: Abrol YP, Mohanty P, Govindjee (eds) *Photosynthesis: photoreactions to plant productivity*, Kluwer, Dordrecht, (1993) pp 451-468.
- [12] X. Wu, F. S. Hong, C. Liu, M.Y. Su, L. Zheng, F. Q. Gao, F. Yang, Effects of Pb<sup>2+</sup> on energy distribution and photochemical activity of spinach chloroplast, *Spectrochim. Acta Part A* 69 (2008) 738-742.



- [13] N. Boucher, R. Carpentier, Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, and Pb<sup>2+</sup>-induced changes in photosystem II photochemical yield and energy storage in isolated thylakoid membranes: A study using simultaneous fluorescence and photoacoustic measurements, *Photosynth. Res.* 59 (1999) 167-174.
- [14] A. Busch, M. Hippler, The structure and function of eukaryotic photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta* 1807 (2011) 864-877.
- [15] S. Govindachary, C. Bigras, J. Harnois, D. Joly, R. Carpentier, Changes in the mode of electron flow to photosystem I following chilling-induced photoinhibition in a C<sub>3</sub> plant, *Cucumis sativus* L, *Photosynth. Res.* 94 (2007) 333-245.
- [16] P. Pospisil, Enzymatic function of cytochrome b<sub>559</sub> in photosystem II, *J. Photochem. Photobiol. B.* 104 (2001) 341-347.
- [17] N. Bukhov, R. Carpentier, Alternative photosystem I-driven electron transport routes: Mechanisms and functions, *Photosynth. Res.* 82 (2004) 17-33.
- [18] M.A. Schöttler, C. A. A. Ralph Bock, Photosystem I: Its biogenesis and function in higher plants, *Biochim. Biophys. Acta* 168 (2011) 1452-1461.
- [19] F.A. Peters, L.J. Van Spanning, R. Kraayenhof, Studies on well coupled Photosystem I-enriched subchloroplast vesicles. Optimization of ferredoxin-mediated cyclic photophosphorylation and electric potential generation, *Biochim. Biophys. Acta* 724 (1983) 159-165.
- [20] J. Harnois, N. Msilini, R. Carpentier, Isolation of photosystem I submembrane fractions. In: Carpentier R (ed) *Photosynthesis Research Protocols*, 2nd Edition, Springer Science, New York, (2011) pp. 11-15.
- [21] R.J. Porra, W.A. Thompson, P.E. Kriedemann, Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophyll a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta.* 975 (1989) 384-394.
- [22] F. Dousseau, M. Therrien, M. Pezolet, On the spectral subtraction of water from the FT-IR spectra of aqueous solutions of proteins, *Appl. Spectrosc.* 43 (1989) 538-542.
- [23] D.M. Byler H. Susi, Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra, *Biopolymers.* 25 (1986) 469-487.

- [24] R. Beauchemin, J. Harnois, R. Rouillon, H.A. Tajmir-Riahi, R. Carpentier, Interaction of polyamines with proteins of photosystem II: Cation binding and photosynthetic oxygen evolution, *J. Mol. Struct.* 833 (2007) 169-174.
- [25] A. Ahmed, H.A. Tajmir-Riahi, R. Carpentier, A quantitative secondary structure analysis of the 33 kDa extrinsic polypeptide of photosystem II by FTTR spectroscopy, *FEBS Lett.* 363 (1995) 65-68.
- [26] A. Belatik, S. Houtchandani, R. Carpentier, H.A. Tajmir-Riahi, Locating the binding sites of Pb(II) ion with human and bovine serum albumins, *PLoS ONE* 7 (2012) 1-9.
- [27] L. Bekalé, S. Barazzouk, S. Houtchandani, Beneficial role of gold nanoparticles as photoprotector of magnesium tetraphenylporphyrin, *J. Mat. Chem.* 22 (2012) 2943-2951.
- [28] S. Rajagopal, E.A. Egorova, N. Bukhov, R. Carpentier, Quenching of excited states of chlorophyll molecules in submembrane fractions of Photosystem I by exogenous quinines, *Biochim. Biophys. Acta.* 1606 (2003) 147-152.
- [29] S. Rajagopal, N. Bukhov, R. Carpentier, Changes in the structure of chlorophyll-protein complexes and excitation energy transfer during photoinhibitory treatment of isolated photosystem I submembrane particles, *J. Photochem. Photobiol. B*, 62 (2002) 194-200.
- [30] N. Bukhov, E. A. Egorova, R. Carpentier, Electron flow to photosystem I from stromal reductants in vivo: The size of the pool of stromal reductants controls the rate of electron donation to both rapidly and slowly reducing photosystem I units, *Planta* 215 (2002) 812-820.
- [31] A. Belatik, J. Essemine, S. Houtchandani, R. Carpentier, Afterglow thermoluminescence measured in isolated chloroplasts, *Photochem. Photobiol.* 88 (2012) 67-75.
- [32] A. Azioune, F. Siroti, J. Tanguy, M. Jouini, M. M. Chehimi, B. Miksa, S. Slomkowski, Interactions and conformational changes of human serum albumin at the surface of electrochemically synthesized thin polypyrrole films, *Electrochim. Acta* 50 (2005) 1661-1667.
- [33] G. Beamson, D. Briggs, High Resolution XPS of Organic Polymers - The Scienta ESCA 300 Database, Wiley, Chichester, UK. (1992).

- [34] C.D. Tidwell, D.G. Castner, S.L. Golledge, B.D. Ratner, K. Meyer, B. Hagenhoff, A. Benninghoven, Static time-of-flight secondary ion mass spectrometry and x-ray photoelectron spectroscopy characterization of adsorbed albumin and fibronectin films, *Surf. Interface Anal.* 31 (2001) 724-733.
- [35] R.J.J. Jansen, H. Van Bekkum, XPS of nitrogen-containing functional groups on activated carbon, *Carbon* 33 (1995) 1021-1027.
- [36] Y. Zubavichus, M. Zharnikov, A. Shaporenko, O. Fuchs, L. Weinhardt, C. Heske, E. Umbach, J.D. Denlinger, M. Grunze, Soft X-ray induced decomposition of phenylalanine and tyrosine: A comparative study, *J. Phys. Chem. A* 108 (2004) 4557-4565.
- [37] Y. Zubavichus, O. Fuchs, L. Weinhardt, C. Heske, E. Umbach, J.D. Denlinger M. Grunze, Soft X-ray-induced decomposition of amino acids: An XPS, mass spectrometry, and NEXAFS study, *Rad. Res.* 161 (2004) 346-358.
- [38] J. Panga, W. Jian, L. Wangc, C. Wua, Y. Liua, J. Hea, X. Tangd, X-ray photoelectron spectroscopy analysis on surface modification of Konjac glucomannan membrane by nitrogen plasma treatment, *Carbohydrate Polymers* 88 (2012) 369-372.
- [39] S. Rajagopal, N.G. Bukov, H.A. Tajmir-Riahi, R. Carpentier, Control of energy dissipation and photochemical activity in photosystem I by NADP-dependent reversible conformational changes, *Biochemistry* 42 (2003) 11839-11845.
- [40] N. Bukhov, S. Govindachary, E.A. Egorova, R. Carpentier, Interaction of exogenous quinones with membranes of higher plant chloroplasts: Modulation of quinone capacities as photochemical and non-photochemical quenchers of energy in Photosystem II during light-dark transitions, *Biochim. Biophys. Acta.* 1604 (2003) 115-123.
- [41] B. Valeur, *Molecular fluorescence: principles and applications*, Wiley-VCH, Weinheim. (2002) 72-90.
- [42] J.R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Plenum Press, New York. (1983) 278-316.
- [43] N. Boucher, R. Carpentier, Heat-stress stimulation of oxygen uptake by photosystem I involves the reduction of superoxide radicals by specific electron donors, *Photosynth. Res.* 35 (1993) 213-218.
- [44] S. Katoh, A. Takamiya, Nature of copper-protein binding in spinach plastocyanin, *J. Biochem.* 55 (1964) 378-387.

- [45] M. Kirberger, J.J. Yang, Structural differences between  $Pb^{2+}$ - and  $Ca^{2+}$ -binding sites in proteins: Implications with respect to toxicity, *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 1901-1909.
- [46] K.A. Morales, M. Lasagne, A.V. Gribenko, Y. Yoon, G.D. Reinhart, J.C. Lee, W. Cho, P. Li, T.I. Igumenova,  $Pb^{2+}$  as modulator of protein-membrane interactions, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 10599-10611.
- [47] R. Tamilarasan, D.R. McMillin, Absorption spectra of  $d^{10}$  metal ion derivatives of plastocyanin, *Inorg. Chem.* 25 (1986) 2037-2040.
- [48] H.R. Engeseth, D.R. McMillin, A new assignment of the disulfide linkage in stellacyanin, *FEBS Lett.* 171 (1984) 257-261.
- [49] R.C. Honeycutt, D.W. Krogmann, Inhibition of chloroplast reactions with phenylmercuric acetate, *Plant Physiol.* 49 (1972) 376-380.

### Captions for Figures

**Figure 1.** XPS spectra for the free PSI submembrane fractions and its mixture with 500  $\mu\text{M}$   $\text{PbCl}_2$ . A: C atoms, B: N atoms and, C: O atoms. See Materials and methods for details.

**Figure 2.** Second derivative resolution enhancement and curve-fitted amide I region ( $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ ) for free PSI submembrane fractions (A) and their Pb complexes with 0.125 and 0.5 mM Pb (B and C, respectively). See Materials and methods for details.

**Figure 3.** (A) Chlorophyll fluorescence emission spectra of PSI submembrane fractions at 25 °C: (trace a) free PSI, (traces b-h) with added  $\text{Pb}^{2+}$  at 5, 10, 15, 30, 60, 100 and 200  $\mu\text{M}$ . Inset:  $F_0/F$  vs  $[\text{PbCl}_2]$  for PSI-Pb. (B) Decline of Chl fluorescence intensity at 682 nm with increasing  $\text{PbCl}_2$  concentration. See Materials and methods for more details.

**Figure 4.** The plot of  $\text{Log}(F_0-F/F)$  as a function of  $\text{Log}[\text{PbCl}_2]$ . The data of this figure are taken from Fig. 3.

**Figure 5.** Light induced oxygen uptake rates of PSI submembrane fractions at  $24.5 \pm 0.5$  °C as function of  $\text{PbCl}_2$  concentration with DCPIP/Asc (triangles) or TMPD/Asc (circles) as electron donors. Each experimental point is an average of 5 measurements and 100% oxygen uptake means 0% inhibition. All experimental conditions are given in Materials and Methods section.

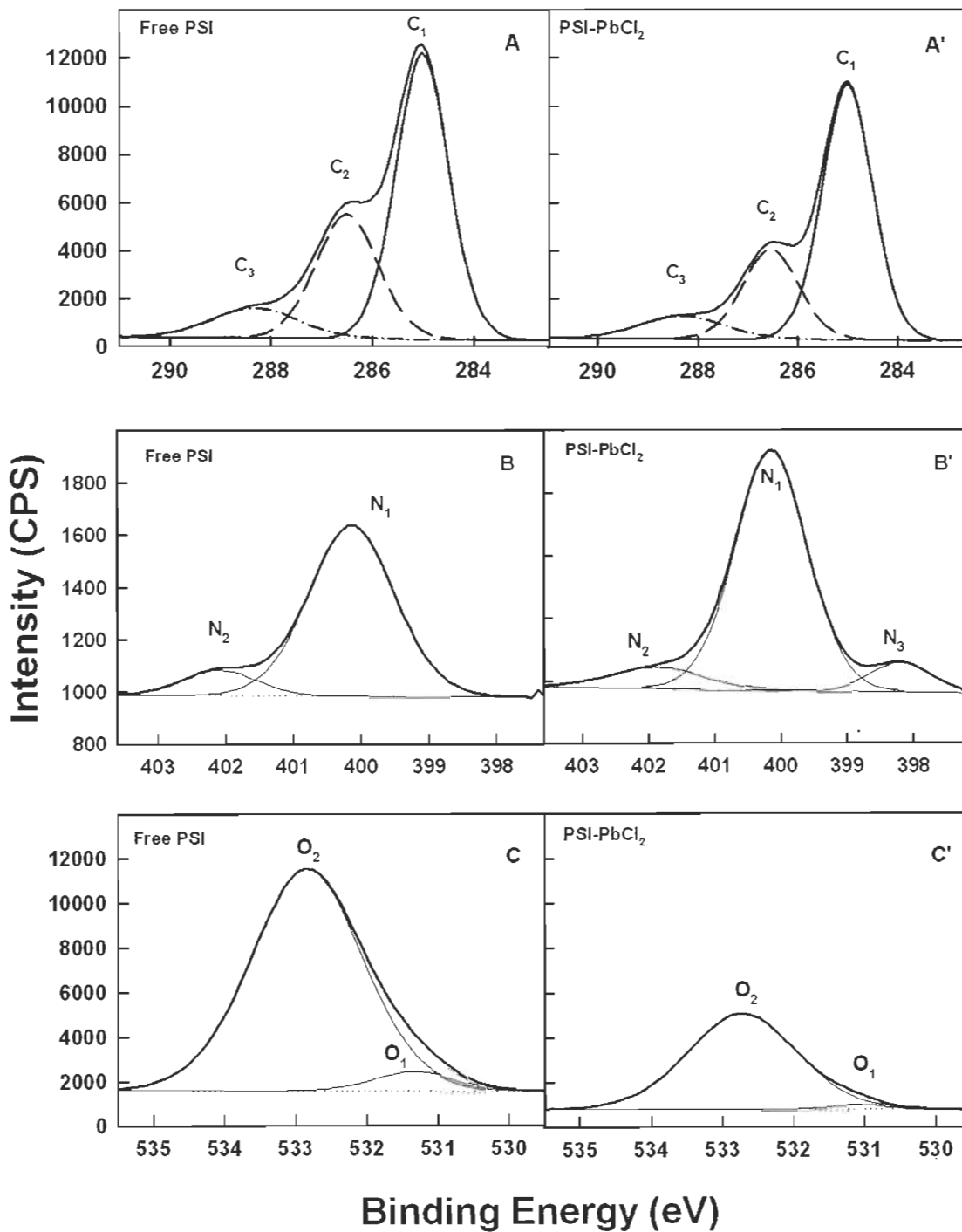
**Figure 6.** Original traces of the FR-light ( $15\text{ s}$  width,  $75\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ ) induced oxidation and dark re-reduction kinetics of P700 monitored as absorbance changes at 830 nm in PSI submembrane fractions, without additive (0.0) or treated with various  $\text{PbCl}_2$  concentrations (40-200 $\mu\text{M}$ ). Down and up arrows indicate FR-light on and off, respectively.

**Table 1.** Experimental atomic composition and, O/C and N/C ratios obtained by XPS analysis for free PSI submembrane fractions and PSI-Pb complexes. Error in determination is  $\pm 0.5\%$ .

Sample	Atomic content (%)				O/C	N/C
	C	O	N	Pb		
Free PSI	73.6	23.2	3.2	0	0.31	0.04
PSI-Pb	75.5	21.9	2.5	0.1	0.29	0.03

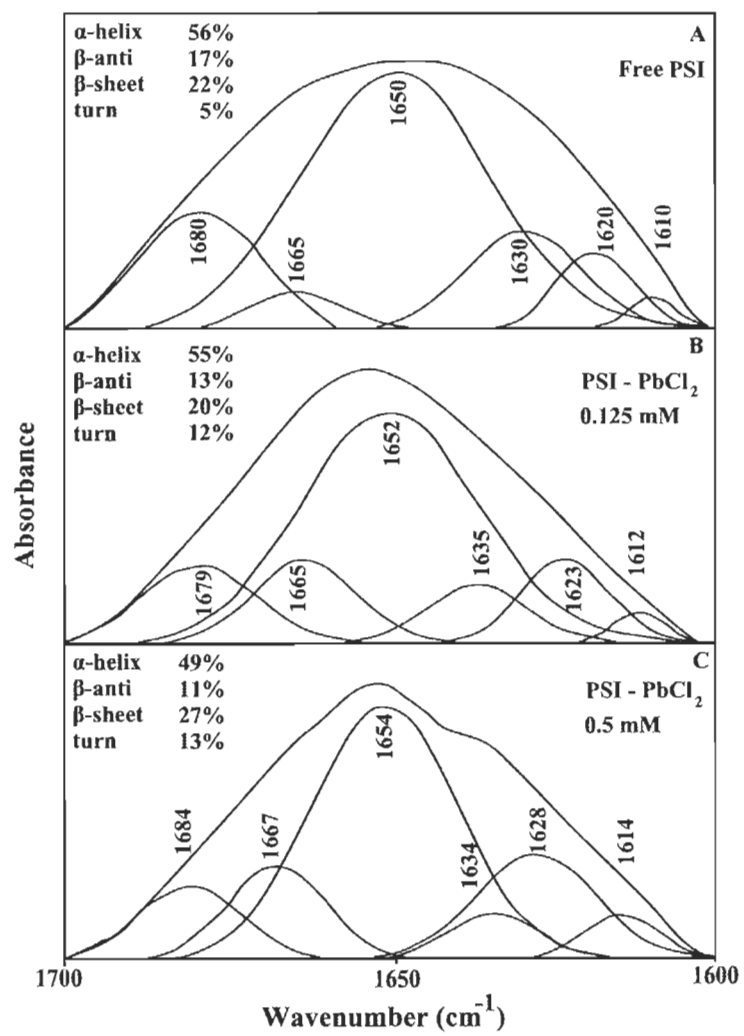
Belatik et al.

Fig. 1



Belatik et al.

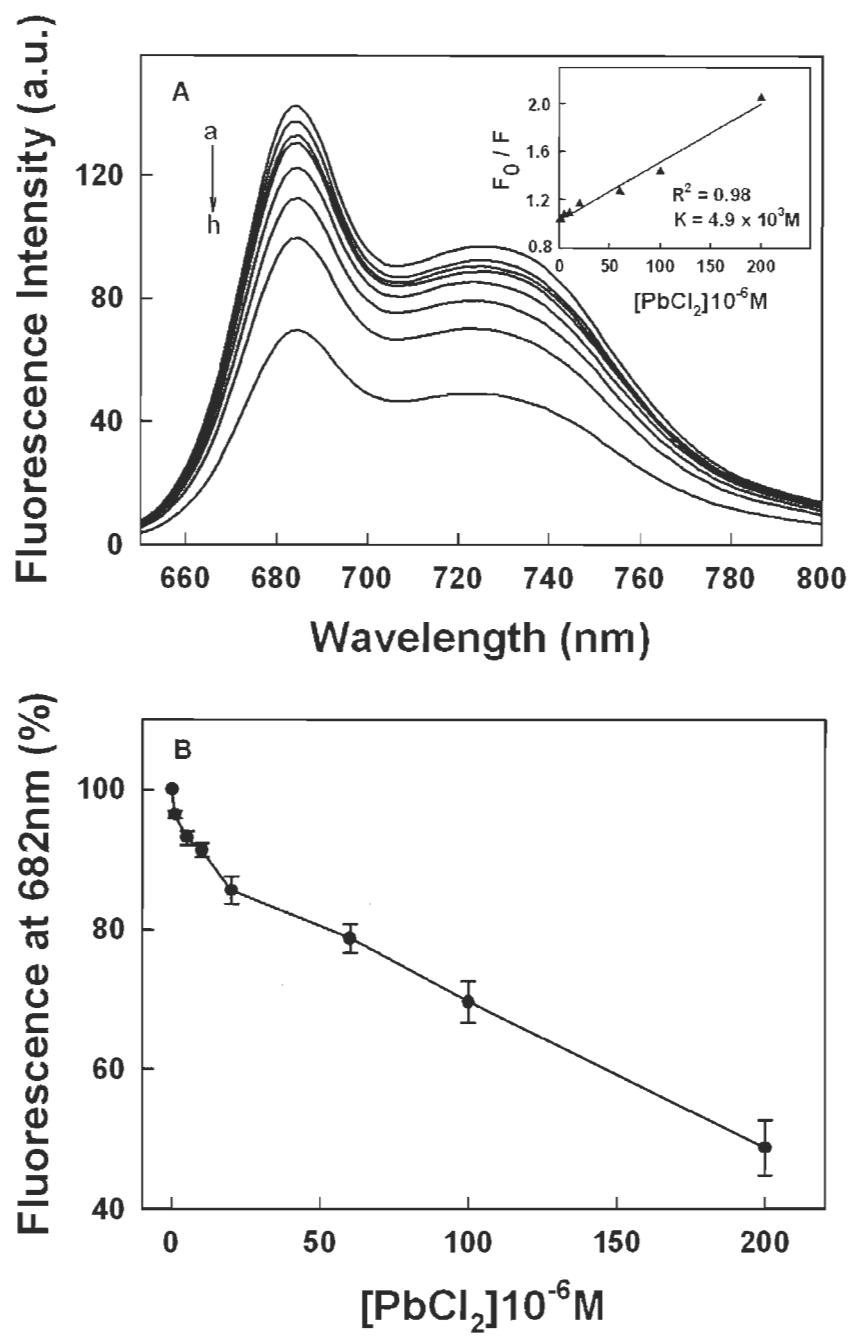
Fig. 2





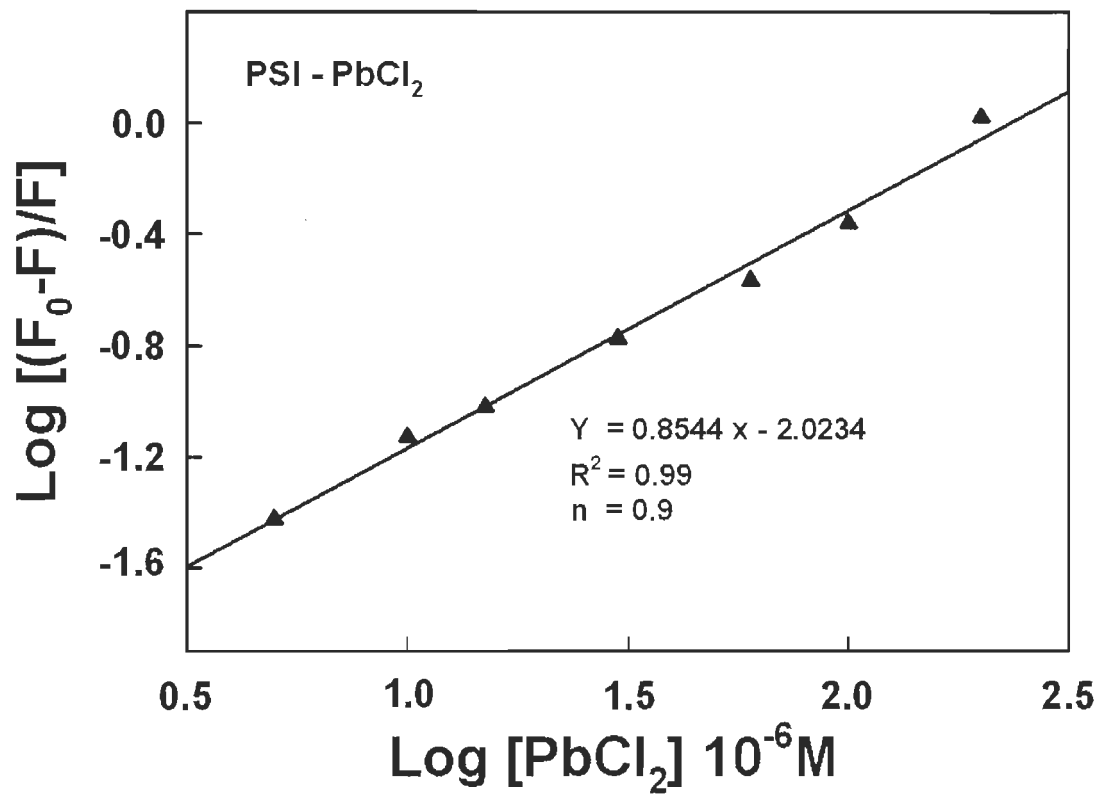
Belatik et al.

Fig. 3



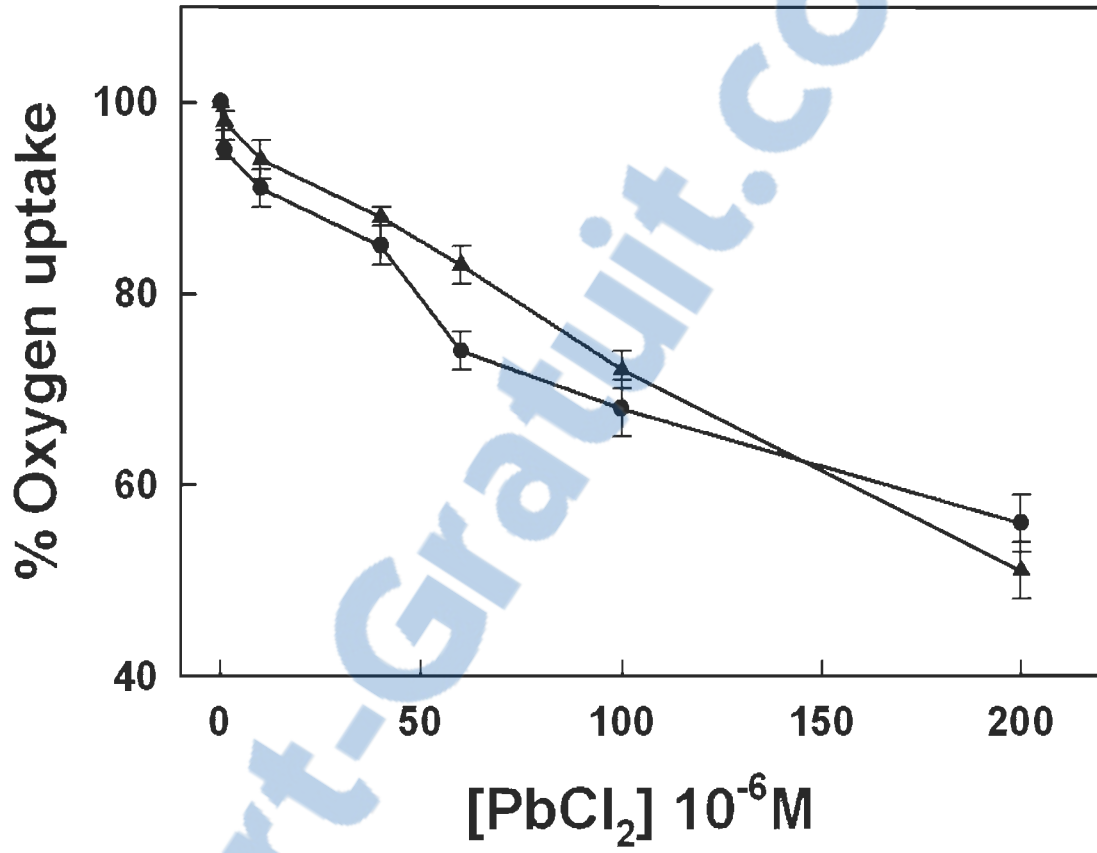
Belatik et al.

Fig. 4



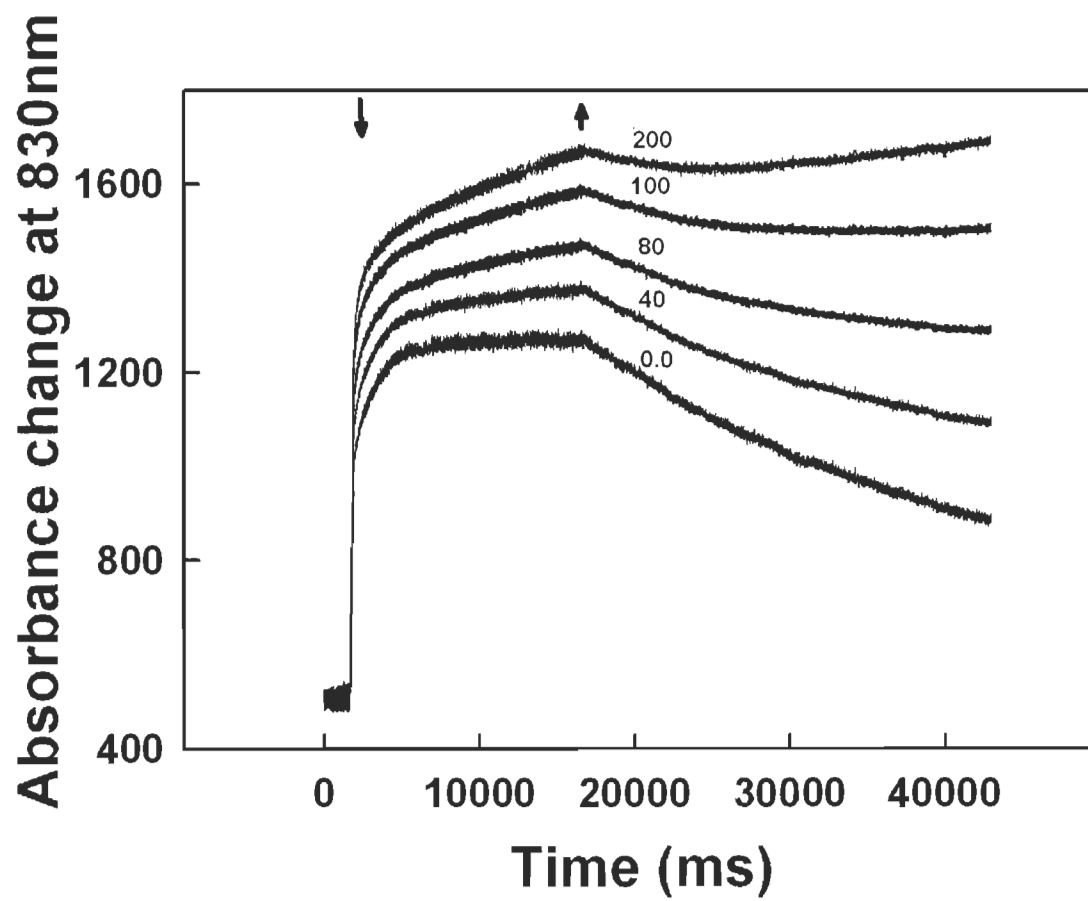
Belatik et al.

Fig. 5



Belatik et al.

Fig. 6



## CHAPITRE VI

### CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Parmi tous les métaux lourds, les problèmes liés aux rejets de Pb, dans l'écosystème et à son transfert potentiel vers les organismes vivants, sont certainement les plus préoccupants. À ce jour, le plomb n'a aucune fonction métabolique connue. Il présente une toxicité néfaste pour les êtres vivants même à de faibles concentrations. Son transfert et son accumulation dans les différents compartiments des écosystèmes, notamment les plantes, génère par conséquent un risque majeur pour les équilibres écologiques et la santé publique. Les plantes représentent donc une voie privilégiée de transfert de cet élément vers la chaîne alimentaire. Bien que les mécanismes exacts, impliqués dans la toxicité du plomb, soient encore mal compris, l'accumulation de cet élément engendre de nombreux troubles au niveau cellulaire et moléculaire des plantes. Dans les dernières décennies, les études biologiques réalisées pour étudier les effets toxiques du Pb sur la santé des plantes ont été consacrées à évaluer soit leurs métabolismes, leurs biodisponibilités ou leurs croissances. Mais malheureusement beaucoup moins d'attention a été accordée à l'étude des sites biologiques spécifiques de l'effet toxique du Pb.

L'objectif général des travaux de cette thèse était de mieux comprendre les modes et sites de liaison du plomb dans l'appareil photosynthétique. Trois approches ont ainsi été mises en œuvre. Premièrement, étudier les sites de liaison et les modes d'interaction du plomb avec les protéines. Il nous a fallu dans un premier temps sélectionner une protéine dont la structure et les facteurs modifiant sa structure sont déjà bien établis à savoir les albumines. Le second aspect consistait à déterminer les sites et déduire les modes d'action du Pb sur l'activité photosynthétique du PSII et du PSI.

## 6.1 Étude des interactions entre les albumines et le plomb (Pb)

Le premier but de nos travaux était d'étudier les interactions, les sites et modes de liaison des albumines avec le plomb. La compréhension de la nature de ces interactions nous a permis de mieux comprendre les sites et modes de liaison du plomb avec des protéines de l'appareil photosynthétique. Les résultats présentés au chapitre III montrent les interactions entre le plomb et les albumines (HSA et BSA) moyennant différentes techniques spectroscopiques et biophysique à savoir, la mesure de FTIR, CD, XPS et la fluorescence.

Les résultats de spectroscopie FTIR ont fourni les premières données concernant la complexation du plomb avec les protéines d'albumines (HSA et BSA), puisque cette technique appliquée dans l'infrarouge moyen ( $4000$  à  $400\text{ cm}^{-1}$ ) permet de déterminer la conformation des structures secondaires d'une protéine. Les albumines sont caractérisées par la bande amide I avec une forte intensité à  $1655\text{-}1656\text{ cm}^{-1}$ , attribuables à l'étirement de la liaison C=O et la bande protéique amide II d'intensité moyenne de  $1543\text{-}1547\text{ cm}^{-1}$ , principalement attribuable à l'étirement de la liaison C-N et au balancement dans le plan de la liaison N-H (Figure 3.2, chapitre III) (Byler et Susi 1986, Krimm et Bandekar 1986). Comme les spectres des complexes albumines-Pb (Figure 3.2) ne présentaient pas de déplacement majeur dans les bandes spectrales protéiques amide I et II, les spectres de différences [(Pb + albumines) - (Pb)] ont été déterminés pour caractériser la variation d'intensité de chacune de ces bandes. L'autodéconvolution par transformée de Fourier et l'augmentation de la résolution par dérivée seconde ont ensuite été utilisées afin de déterminer les structures secondaires de chacun des complexes des albumines avec le plomb.

À faible concentration de plomb ( $125\text{ }\mu\text{M}$ ), des variations majeures dans l'intensité des bandes protéiques amide I et amide II, respectivement à  $1655\text{-}1656$  et  $1543\text{-}1547\text{ cm}^{-1}$ , sont observées dans les spectres de différence (Figure 3.2, diff). Les bandes négatives observées à  $1654\text{-}1656$  et  $1561\text{-}1569\text{ cm}^{-1}$  (BSA et HSA) dans les spectres de différence sont associées à l'augmentation de l'intensité des bandes amide I et II à  $1655\text{-}1656$  et  $1543\text{-}1547\text{ cm}^{-1}$ , par l'interaction du Pb avec les albumines (BSA et

HSA). La diminution de l'intensité des bandes amides I et II est due à l'altération de la conformation protéique causée par la liaison du plomb aux groupements polypeptidiques des protéines. La même tendance a été accentuée à de fortes concentrations (500  $\mu\text{M}$ ) (Figure 3.2).

L'analyse quantitative de la structure secondaire des albumines (BSA et HSA) libre et de ses complexes avec le plomb a été réalisée (Figure 3.3 et Tableau 3.1). La structure secondaire de la protéine libre est composée de 63 et 57 % d'hélice  $\alpha$  (1654-1660  $\text{cm}^{-1}$ ), 16 et 14 % de feuillet  $\beta$  (1614-1637  $\text{cm}^{-1}$ ), 3 et 4 % de feuillet  $\beta$  antiparallèle (1680-1691  $\text{cm}^{-1}$ ), 12 et 13 % de coude  $\beta$  (1670-1678  $\text{cm}^{-1}$ ) et 6 et 12 % de pelote statistique (1638-1648  $\text{cm}^{-1}$ ) pour BSA et HSA, respectivement, ce qui est compatible avec les études spectroscopiques publiées précédemment pour albumines (Ahmed et al. 1995; Froehlich et al. 2009). De façon compatible avec la diminution de l'intensité des bandes observées dans les spectres de différence des complexes protéiques obtenus avec l'ajout du plomb (Figure 3.2. diff.), la proportion de la structure en hélice a diminué de 63% pour BSA libre à 52 % pour BSA-Pb et de 57 % pour HSA libre à 48 % pour HSA-Pb, pendant que la proportion de la structure en feuillet  $\beta$  antiparallèle augmente de 3 % pour BSA libre à 7 % pour BSA-Pb et de 4 % pour HSA libre à 10 % pour HSA-Pb (Figure 3.2 et Tableau 3.1). Ces modifications observées dans la structure des albumines mettent en évidence un certain degré de dénaturation de la structure protéique après l'ajout du plomb. Cela suggère que le Pb est capable d'interagir avec les protéines des albumines moyennant des liaisons avec les atomes d'oxygène et d'azote des groupements polypeptidiques C=O, C-O, C-N et N-H des albumines.

Les résultats de spectroscopie de dichroïsme circulaire (CD) ont permis de confirmer les données obtenues en spectroscopie FTIR concernant la complexation du plomb avec les albumines (HSA et BSA), puisque cette technique appliquée dans le spectre UV lointain (190 à 250 nm) permet également de déterminer la conformation des structures secondaires d'une protéine. À une concentration de plomb de 0.5 mM, la proportion de la structure en hélice  $\alpha$  a diminué de 60% pour BSA libre à 50 % pour BSA-Pb et de 55 % pour HSA libre à 45 % pour HSA-Pb, pendant que la proportion des

coudes augmente de 10 % pour BSA libre à 15 % pour BSA-Pb et de 14 % pour HSA libre à 16 % pour HSA-Pb (Tableau 3.2). Comme pour les résultats de spectroscopie FTIR, les changements de conformation observés en spectroscopie CD sont indicatifs d'une dénaturation partielle des protéines des albumines lors de leur complexation avec le plomb (Tableau 3.2).

La fluorescence des albumines (HSA et BSA) en présence du plomb a été caractérisée afin d'élucider davantage l'effet du Pb sur la conformation des protéines. Le spectre d'émission de la fluorescence des albumines, excitées à 280 nm, a montré une bande majeure à 340-360 nm (Figure 3.4 A et B), attribuable à la fluorescence intrinsèque des acides aminés aromatiques, en particulier les tryptophanes (Trp) (Trp-214 pour HSA, et, Trp-134 et Trp-212 pour BSA). Il est connu que la fluorescence de Trp est dominante par rapport à celle des autres acides aminés. L'ajout du plomb n'a pas modifié le spectre de fluorescence des acides aminés des albumines, quoiqu'une baisse graduelle de l'intensité de la bande a été enregistrée en présence de différentes concentrations de Pb (1-60  $\mu\text{M}$ ) (Figure 3.4 A et B). Cette baisse n'a pas été accompagnée par un décalage vers des longueurs d'onde différentes. Ce résultat peut être expliqué par l'environnement hydrophobe entourant le Trp avant et après l'interaction avec le Pb.

Les constantes de liaison de Pb avec les albumines (HSA et BSA) ont été déterminées en utilisant la méthode de fluorescence; le tracé de  $F_0 / (F_0 - F)$  vs  $1/$  (concentration de Pb) est linéaire (où  $F_0$  est la fluorescence initiale des albumines libres à 280 nm et,  $F$  est la fluorescence mesurée à différentes concentrations de plomb), ce qui permet d'estimer la constante de Stern Volmer ( $K_{SV}$ ) à partir de l'équation 3.7 (Figure 3.4). Les constantes de Stern Volmer calculées sont de  $8.2 (\pm 0.8) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  pour HSA et de  $7.5 (\pm 0.7) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  pour BSA. Les  $K_{SV}$  calculées pour les complexes albumines-Pb démontrent manifestement des interactions plus fortes pour HSA que BSA. Les constantes d'association calculées pour les complexes de Pb avec les albumines indiquent une forte affinité pour la liaison Pb-protéines, et ce, en comparaison



des complexes présentant des interactions protéine-ligand fortes (Kragh-Hansen, 1990; Kratochwil et al. 2002).

L'objectif de cette étude (chapitre III) était d'étudier l'effet du plomb sur les propriétés physico-chimiques des protéines. La spectroscopie des photoélectrons X est parmi les techniques la mieux adaptée pour atteindre notre objectif, afin de pouvoir effectuer une étude comparative. Il s'agit en particulier de comparer les effets sur les propriétés des albumines avant et après l'ajout d'élément métallique. L'identification des interactions du plomb avec les albumines est effectuée à partir de la valeur de l'énergie de liaison obtenue par la reconstruction des spectres XPS. Ces derniers sont étalonnés en énergies de liaison ce qui permet l'identification directe de la nature et de l'origine des pics étudiés par l'intermédiaire des tables des énergies de liaison des espèces. La reconstruction des pics est précédée par la soustraction du bruit de fond. Lorsque les atomes sont engagés dans un composé chimique, les niveaux de cœur réagissent à la modification de l'environnement par rapport à l'atome isolé, avec en particulier des variations d'énergie de liaison d'orbitale. Cette variation de pic est calculée par rapport à un pic témoin d'un élément pur, dont l'état métallique est pris comme référence. La raie de C1s, à  $285 \pm 0.2$  eV, a été utilisée pour calibrer les énergies de liaison des différents éléments et pour corriger les effets de charge. La concentration atomique superficielle des éléments présents dans chaque échantillon a été calculée en supposant une distribution homogène de tous les éléments, en utilisant des facteurs de sensibilité déterminés pour le type d'analyseur d'énergie cinétique des électrons. Les figures 3.7, 3.8 et 3.9 montrent les résultats de spectroscopie XPS de  $Pb^{2+}$  avec les albumines (HSA et BSA). La composition atomique expérimentale déterminée à partir de l'analyse spectrale XPS nous a permis de calculer le ratio de l'oxygène et de l'azote par rapport au carbone présent dans les échantillons (ON / C) (Tableau 3.1). L'analyse des spectres révèle que les atomes C (285 eV), N (401 eV) et O (532 eV) sont les espèces prédominantes (Figures 3.7, 3.8 et 3.9). Les affectations à haute résolution des pics  $C_1$  (C-C, C = C et C-H),  $C_2$  (C-NH),  $C_3$  (C-O),  $O_1$  (C= O),  $O_2$  (O-H),  $O_3$  (C-O),  $N_1$  (C-N),  $N_2$  ( $NH_2$ ) et  $N_3$  ( $NH^{3+}$ ) sont compatibles avec des résultats publiés auparavant (Zubavichus et al. 2004; Frateur et al. 2007; Barazzouk et Daneault, 2011). Les données présentées dans le tableau 3.3 présentent de grands écarts dans les pourcentages de

carbone, avec l'oxygène et l'azote, alors qu'il n'y a pas de changements majeurs pour l'atome de soufre. Il est intéressant de noter que les pourcentages des atomes de O et N, par rapport aux atomes de C, ont été diminués pour Pb-BSA ( $0,03 \pm 0,01$ ) tandis qu'ils ont été augmentés pour le complexe Pb-HSA ( $0,03 \pm 0,01$ ) avec le même seuil de déplacement, mais dans des sens différents (Tableau 3.3). Cela confirme que le plomb ne réagit pas de la même façon avec BSA et HSA. En effet, la surface de BSA est plus hydrophobe que celle de HSA. Les principaux changements observés dans les rapports d'azote et d'oxygène avec le carbone viennent de la coordination directe du plomb avec l'azote et l'oxygène (Barazzouk et Daneault, 2011). Les résultats XPS montrent clairement que les atomes N et O sont les principaux sites de fixation des ions métalliques dans ces complexes protéine-Pb.

## 6.2 Étude de l'effet toxique du Pb sur le photosystème II

L'effet inhibiteur de plomb sur l'activité de transport linéaire d'électron au niveau du PSII a été caractérisé en détail avec l'analyse des propriétés de l'induction de fluorescence dans les échantillons de thylakoïdes (Figure 4.1). Les tracés d'induction de fluorescence (IF) illustrent la réduction progressive des quinones localisées du côté accepteur du PSII avec trois phases nommées O-J, J-I et I-P (Strasser et Govindjee, 1992; Strasser et al. 1995, Lazar 2006). Puisque la fluorescence du PSI est considérée comme n'étant pas variable, les variations dans le niveau de fluorescence sont attribuées uniquement à l'état du PSII (Lazar, 1999 et 2006). Le niveau de fluorescence débutera au niveau minimal,  $F_0$  ou 0, et augmentera en moins d'une seconde jusqu'au niveau maximal,  $F_m$  ou P, en passant par deux pics d'inflexions, J et I, visibles à environ 1 ms et 30 ms de la période d'illumination, respectivement (Strasser et al. 1995, Lazar 2006). Cependant, dans les membranes de thylakoïdes, le point I dans la courbe d'induction de fluorescence n'est plus apparent et on se retrouve en présence d'une courbe biphasique (OJP) (Figure 4.1). De ce fait, Pospisil et Dau (2000 et 2002) ont montré par une analyse quantitative que dans les membranes de thylakoïdes, la montée de fluorescence demeurait triphasique. Bukhov *et al.* (2003) ont ensuite montré que l'ajout de N,N,N':N'-tetraméthyl-p-phénylènediamine (TMPD) modifiait de façon importante l'IF des

membranes de thylakoïdes pour provoquer une séparation claire des phases J-I et I-P, donnant ainsi un tracé similaire à ceux obtenus dans des systèmes intacts comme dans les feuilles et les chloroplastes intacts.

Les résultats de traitement des échantillons de membranes de thylakoïdes avec différentes concentrations (de 10 à 400  $\mu\text{M}$ ) de plomb ont provoqué une augmentation de la phase OJ, tandis que l'intensité de la fluorescence chlorophyllienne maximale ( $F_m$ ) a diminué progressivement (Figure 4.1). La première phase (O-J) reflète la réduction de la quinone acceptrice primaire,  $Q_A$ , du PSII (Strasser et Govindjee, 1992). Ceci suggère que le transfert d'électrons entre  $Q_A$  et  $Q_B$  a été ralenti avec l'augmentation de la concentration de  $\text{Pb}^{2+}$ . Cependant, à des concentrations de  $\text{Pb}^{2+}$  supérieures à 400  $\mu\text{M}$ , la phase OJ a également commencé à diminuer et l'induction de fluorescence globale a été fortement atténuée (Figure 4.1). La phase IP de l'induction de fluorescence a été corrélée à la photoréduction du pool de plastoquinone (PQ) (Boisvert et al. 2006; Joly et Carpentier 2007). Ainsi, la baisse observée en phase IP indique une forte inhibition de l'accumulation de pool de PQ réduit surtout à des concentrations en  $\text{Pb}^{2+}$  supérieures à 400  $\mu\text{M}$  (Figure 4.1). Ceci suggère que le complexe de dégagement d'oxygène (CDO) est devenu incapable de fournir les électrons au PSII pour réduire convenablement les quinones localisées du côté accepteur du PSII.

Pour valider cette interprétation, l'analyse des paramètres de l'induction de fluorescence des *Chls* dans les membranes de thylakoïdes a été déterminée. La fluorescence initiale  $F_0$  est considéré comme représentant la dissipation sous forme de fluorescence des excitons dans les antennes avant qu'ils n'atteignent les centres réactionnels (CR) du PSII complètement ouverts (Mathis et Paillotin, 1981). Tandis que, la fluorescence maximale ( $F_m$ ) représente un état complètement fermé des PSII (Lazar, 1999). La montée de fluorescence de 0 à P se ferait donc en parallèle avec le passage graduel des PSII d'un état ouvert, où ils peuvent recevoir des excitations, vers un état fermé, où les PSII ont atteint un niveau maximal de réduction de ses accepteurs (Zhu et al. 2005). La fluorescence initiale,  $F_0$ , n'a pas été influencée par l'ajout de  $\text{Pb}^{2+}$ . Cependant, la fluorescence maximale,  $F_m$ , a diminué considérablement en parallèle avec

l'augmentation de la concentration en  $Pb^{2+}$ , entraînant une baisse importante dans la fluorescence variable ( $F_v = F_m - F_0$ ) ce qui conduit à une baisse dans le rendement photochimique du PSII ( $F_v / F_m$ ). De ce fait, l'effet inhibiteur de  $Pb^{2+}$  sur le rendement photochimique du PSII est donc principalement lié à la diminution dans  $F_m$ . Cette baisse dans la fluorescence maximale qui a coïncidé parfaitement avec la modification structurale des protéines observée par spectroscopie FTIR, est à l'origine de l'inhibition de l'activité du CDO qui devient incapable de fournir les électrons au côté accepteur du PSII.

Afin de vérifier si l'atténuation de la fluorescence de chlorophylle (*Chl*) observée dans la figure 4.1 est le résultat de l'interaction directe entre  $PbCl_2$  et les antennes collectrices de lumières du PSII, la fluorescence de la molécule de *Chl a* dans une solution d'éthanol a été étudiée en absence et en présence de  $PbCl_2$  (Figure 4.2 A). Comme il est démontré dans la figure, les propriétés de fluorescence de cette molécule sont pratiquement restées inchangées lors de l'ajout de  $PbCl_2$ . Ceci suggère que  $PbCl_2$  n'a pas d'effet direct sur l'état excité singulet de *Chl*, et donc sur ses propriétés radiatives. Pour confirmer cette observation, les études de fluorescence de MgTPP ont été réalisées en absence et en présence de  $Pb^{2+}$  (Figure 4.2 B). L'utilisation de MgTPP est due à son analogie structurale avec la molécule de chlorophylle, du fait qu'elle est composée du même macrocycle porphyrine avec Mg central. En outre, l'avantage supplémentaire d'utilisation de MgTPP, c'est qu'elle ne contient pas la chaîne phytol présent dans la chlorophylle, et, par conséquent, peut être plus facilement accessible aux ajouts de  $Pb^{2+}$ . Il est montré dans la figure 4.2 B que  $PbCl_2$  n'a eu aucun effet sur les propriétés de fluorescence de MgTPP confirmant ainsi les résultats obtenus avec la chlorophylle a (*Chl a*). Ce résultat confirme que les changements observés au niveau du PSII ne sont pas dus à l'effet sur les molécules de chlorophylles.

Pour mieux comprendre l'effet inhibiteur du plomb sur le transfert d'électrons entre les deux quinones accepteurs d'électrons ( $Q_A$  et  $Q_B$ ) au niveau du PSII, la cinétique de déclin de fluorescence après un flash de lumière saturante a été mesurée (Figure 4.4). Les cinétiques de déclin de fluorescence des membranes de thylakoides en présence de

PbCl<sub>2</sub> sont montrées sur une échelle logarithmique (Figure 4.4). L'augmentation de la fluorescence induite par flash est due à la réduction de Q<sub>A</sub>, quinone acceptrice primaire du photosystème II, et par la suite, la décroissance dans l'obscurité est liée à la réoxydation de Q<sub>A</sub><sup>-</sup> et se compose de plusieurs phases cinétiques. L'amplitude de la montée de fluorescence a diminué fortement quand la concentration de PbCl<sub>2</sub> a augmenté, en particulier à des concentrations supérieures à 100 μM. Afin de caractériser quantitativement la cinétique de déclin de fluorescence, le déclin à l'obscurité a été décomposé en trois phases exponentielles (Tableau 4.1). La phase rapide est attribuée à la réoxydation de Q<sub>A</sub><sup>-</sup> par Q<sub>B</sub> (Putrenko et al. 1999; Pospisil et Tyystjarvi, 1999), la phase moyenne est attribuée à la réoxydation Q<sub>A</sub><sup>-</sup> dans les centres du PSII, avec le site Q<sub>B</sub> vide, et limité par le temps de diffusion de PQ au site Q<sub>B</sub>. La phase lente est associée à la réoxydation de Q<sub>A</sub><sup>-</sup> avec la recombinaison des charges des états S<sub>2</sub> et/ou S<sub>3</sub> du complexe de Mn<sub>4</sub>Ca (Putrenko et al. 1999; Pospisil et Tyystjarvi, 1999). Les amplitudes et les temps de demi-vie des composants de chaque phase sont présentés dans le tableau 4.1. L'amplitude de la phase rapide a grandement diminué avec l'augmentation des concentrations de PbCl<sub>2</sub>, cela s'est accompagné par une forte augmentation du temps de demi-vie (Tableau 4.1). Le déclin de fluorescence a également été mesuré en présence de DCMU qui bloque le transfert d'électrons entre Q<sub>A</sub> et Q<sub>B</sub> (Figure 4.4 B). La décomposition du déclin de fluorescence a été faite en trois composantes. L'amplitude et le temps de demi-vie de chacune des phases sont démontrés pour les membranes de thylakoides en présence de DCMU traité avec PbCl<sub>2</sub> (Tableau 4.1). Les amplitudes des composantes moyennes et lentes ont été augmentées en parallèle avec la concentration de PbCl<sub>2</sub> au détriment de la composante rapide et leurs temps de demi-vie (Tableau 4.1). Le résultat confirme que la réoxydation de Q<sub>A</sub> est plus lente dans les échantillons traités avec du Pb<sup>2+</sup>, puisque le transfert d'électron entre Q<sub>A</sub> et Q<sub>B</sub> est grandement retardé.

La thermoluminescence (TL) a été utilisée pour explorer davantage les effets de PbCl<sub>2</sub> sur les recombinaisons de charges entre les côtés donneur et accepteur de PSII. Les courbes d'émission de TL pour les membranes de thylakoïdes sans traitement (Ctrl) et celles traitées avec du PbCl<sub>2</sub> ont été effectuées avec deux flashes saturants (Figure 4.5). La courbe de TL (Ctrl) montre un maximum d'émission d'intensité lumineuse avec

un pic d'une température maximale de 38 °C qui coïncide avec la température optimale (30-40 °C) pour la bande B dans ce type de matériel (Ducruet, 2003). Cette dernière provient de la recombinaison de charges des états  $S_2/S_3Q_B^-$  produites par le processus de transport linéaire d'électrons au niveau du PSII (Ducruet et al. 2005). La figure 4.5 révèle également que le rendement de l'intensité de la bande B et sa température maximale sont dépendants de la concentration du  $Pb^{2+}$  ajoutée. En présence de 20  $\mu M$  de  $PbCl_2$ , la bande B a perdu 13 % de sa fluorescence totale avec un léger déplacement du maximum d'émission vers des températures plus élevées (de 38 °C à 41 °C). En présence de 2 mM  $PbCl_2$ , l'intensité de TL a été complètement supprimée. Les changements dans l'amplitude et la  $T_m$  de la bande B pourraient être liés à des changements dans les propriétés des états S du complexe de manganèse  $Mn_4Ca$  et/ou à une modification du site de liaison  $Q_B$  en présence de  $PbCl_2$ .

Afin de mieux élucider le site d'action de  $PbCl_2$  dans la chaîne de transport des électrons, les courbes de TL ont été enregistrées en présence de 50  $\mu M$  DCMU, connus pour bloquer le flux d'électrons au-delà de  $Q_A$ . L'ajout de DCMU se traduit par la suppression de la bande B pour les thylakoïdes (Ducruet et al. 2005; Belatik et al. 2012). La suppression des bandes B s'accompagne par l'apparition de la bande Q correspondant à la recombinaison de charges  $S_2Q_A^-$  (Vassiliev et al. 2001). L'inhibition du flux d'électrons entre  $Q_A$  et  $Q_B$  empêche la réalisation des états  $S_3$  et bloque l'arrivée des électrons de la quinone secondaire  $Q_B$  qui sont responsables des recombinaisons des charges  $S_3Q_B$  et  $S_3Q_B^-$  ainsi que  $S_2Q_B$  et  $S_2Q_B^-$ . La figure 4.5 B montre les courbes de TL des membranes de thylakoides isolés des épinards sans traitement ainsi que ceux traités avec différentes concentrations de  $PbCl_2$ . La courbe de TL (Ctrl) montre un maximum d'émission d'intensité lumineuse avec un pic d'une température maximale de 17 °C qui coïncide avec la température optimale (10-20 °C) pour la bande Q dans ce type de matériel (Ducruet et al. 2005). Une diminution progressive de la bande Q a été observée lorsque la concentration de  $PbCl_2$  a été augmentée, avec 20  $\mu M$  de  $PbCl_2$  l'intensité de la bande Q a été réduite de 12 %. L'addition de 2 mM  $PbCl_2$  a causé la perte de plus de 90 % de l'intensité de cette bande avec un fort déplacement du maximum d'émission vers des températures plus élevées (de 17 °C à 27 °C). La bande Q est également

accompagnée par un fort décalage du  $T_m$  vers des températures plus élevées. Les changements dans l'amplitude et le  $T_m$  de la bande Q peuvent être reliés à des changements dans les propriétés des états S du complexe de manganèse.

### 6.3 Étude de l'effet toxique du Pb sur le photosystème I (PSI)

Afin de déterminer le site de liaison de  $Pb^{2+}$  sur les membranes de PSI, la technique XPS a été utilisée. L'analyse des échantillons de PSI libre et de ses complexes avec le plomb (Pb-PSI) a été faite en irradiant de manière non monochromatique. La concentration atomique superficielle des éléments présents dans chaque échantillon a été calculée en supposant une distribution homogène de tous les éléments, en utilisant des facteurs de sensibilité déterminés pour le type d'analyseur d'énergie cinétique des électrons. La figure 5.1 montre les résultats de spectroscopie XPS de  $Pb^{2+}$  avec les fractions membranaires de PSI. La composition atomique expérimentale déterminée à partir de l'analyse spectrale XPS nous a permis de calculer le ratio de l'oxygène et de l'azote par rapport au carbone présent dans les échantillons (ON / C) (Tableau 5.1). Les affectations à haute résolution des pics  $C_1$  (285.0 eV: C-C, C = C et C-H),  $C_2$  (286.4 eV: C-NH),  $C_3$  (288.3 eV: C-O),  $O_1$  (531.3eV: C= O),  $O_2$  (532.8 eV: C-O, O-H),  $N_1$  (400.1 eV: C-N),  $N_2$  (402.1 eV: NH2) et  $N_3$  (398.1 eV: NH3+) sont compatibles avec des résultats publiés auparavant (Beamson et Briggs, 1992; Jansen et Van Bekkum, 1995; Tidwell et al. 2001; Zubavichus et al. 2004 a et b; Azioune et al. 2005; Panga et al. 2012). Les données présentées dans le tableau 5.1 présentent le même écart dans les pourcentages de carbone, avec l'oxygène et l'azote, comme celui enregistré avec les albumines (Tableau 3.1). Les principaux changements observés dans les rapports d'azote et d'oxygène avec le carbone viennent de la coordination directe du plomb avec l'azote et l'oxygène (Barazzouk et Daneault, 2011). Les résultats XPS montrent clairement que les atomes N et O sont les principaux sites de fixation des ions métalliques. Cela est en concordance avec des résultats publiés auparavant pour des complexes protéine-Pb (Beamson et Briggs, 1992; Jansen et Van Bekkum, 1995; Tidwell et al. 2001; Zubavichus et al. 2004 a et b; Azioune et al. 2005; Panga et al. 2012).

Afin de mieux compléter les résultats XPS, la technique de spectroscopie FTIR nous a fourni plusieurs données concernant la complexation de plomb avec les fractions membranaires de PSI. Le spectre FTIR de PSI présente une bande large de forte intensité à  $3298\text{ cm}^{-1}$ , laquelle correspond à la bande protéique amide A attribuable à l'étirement de la liaison N-H (Krimm et Bandekar 1986). Comme les spectres des complexes PSI-Pb ne présentaient pas de déplacement majeur dans les bandes spectrales protéiques amidées, les spectres de différences [(Pb + PSI) - (Pb)] ont été déterminés pour caractériser la variation d'intensité de chacune de ces bandes. L'autodéconvolution par transformée de Fourier et l'augmentation de la résolution par dérivée seconde ont ensuite été utilisées afin de déterminer les structures secondaires de chacun des complexes des fractions membranaires de PSI avec le plomb. L'analyse quantitative de la structure secondaire de PSI libre et de ses complexes avec le plomb a été réalisée (Figure 5.2). La structure secondaire de la protéine libre est composée à 56 % d'hélice  $\alpha$  ( $1650\text{ cm}^{-1}$ ), à 22 % de feuillet  $\beta$  ( $1610, 1620$  et  $1630\text{ cm}^{-1}$ ), à 17 % de feuillet  $\beta$  antiparallèle ( $1680\text{ cm}^{-1}$ ), à 5 % de coude  $\beta$  ( $1665\text{ cm}^{-1}$ ) pour les fractions membranaires de PSI, ce qui est compatible avec les études spectroscopiques publiées précédemment (Rajagopal et al. 2003).

De façon consistante avec la diminution de l'intensité des bandes observées dans les spectres de XPS obtenus avec l'ajout de  $125\text{ }\mu\text{M}$  de  $\text{PbCl}_2$  (Figure 5.1), la proportion de la structure de feuillet  $\beta$  antiparallèle a diminué de 17 % pour PSI libre à 13 % pour PSI-Pb accompagné d'une augmentation de coude  $\beta$  de 5 % pour PSI libre à 12 % pour PSI-Pb (Figure 5.2 B). Après ajout de  $500\text{ }\mu\text{M}$  de  $\text{PbCl}_2$ , la proportion de la structure en hélice  $\alpha$  a diminué de 56 % pour PSI libre à 49% pour PSI-Pb accompagné d'une augmentation de feuillet  $\beta$  de 22 % pour PSI libre à 27 % pour PSI-Pb (Figure 5.2 C). Toutes ces modifications observées dans la structure des membranes de PSI, mettent en évidence un certain degré de dénaturation de la structure protéique après l'ajout du plomb. Cela suggère que le Pb est capable d'interagir avec les protéines du PSI moyennant des liaisons avec les atomes d'oxygène et d'azote des groupements polypeptidiques.



L'effet du plomb sur les propriétés photochimiques des membranes photosynthétiques a été étudié dans des fractions membranaires de PSI. La figure 5.3 montre le spectre de fluorescence mesuré à la température ambiante chez les membranes de PSI en l'absence et en présence de différentes concentrations (1 à 200  $\mu\text{M}$ ) de  $\text{PbCl}_2$  à une longueur d'onde d'excitation de 436 nm. La courbe mesurée dans l'échantillon non traité a montré un pic maximal à 682 nm avec un épaulement à 736 nm, caractéristique d'émission de fluorescence pour ce type de matériels (Bukhov et al. 2003; Rajagopal et al. 2003). Les spectres d'excitation de fluorescence sont identiques lorsque l'on observe la fluorescence du côté des faibles longueurs d'onde (682 nm) ou du côté d'épaulement (736 nm) du spectre d'émission, aucun déplacement du spectre d'excitation n'est observé. La variation relative de l'intensité de fluorescence mesurée au maximum de chaque bande vibronique est la même. L'inhibition est d'autant plus forte que la concentration en  $\text{Pb}^{2+}$  augmente, avec 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{PbCl}_2$  l'intensité de fluorescence a été réduite de 90 % (Figure 5.4). Le quenching suit la relation de Stern-Volmer (équation 5.1). La courbe de tendance dans l'intervalle de concentration étudiée (1 au 200  $\mu\text{M}$ ) est linéaire avec un coefficient de corrélation de 0.98. La pente a donné une valeur de  $K_{SV}$  de  $4.9 \times 10^3 \text{M}^{-1}$ . Ce résultat obtenu est similaire à des études faites auparavant et qui ont donné des valeurs de même ordre de grandeur pour le PSI et PSII (Bukhov et al. 2003; Rajagopal et al. 2003). D'une part, la constante d'association calculée pour les complexes de plomb avec les fractions membranaires de PSI indique une forte affinité pour la liaison Pb-protéines, et ce, en confirmant les résultats obtenus par XPS. D'autre part, le nombre de liaisons ( $n = 0.9$ ) que fait le Pb avec les fractions membranaires de PSI a été estimé à partir des résultats de fluorescence.

Les résultats de consommation d' $\text{O}_2$  ont fourni des données suggérant l'inhibition du transport d'électron au niveau du PC. Comme le 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP) et le  $\text{N},\text{N},\text{N}',\text{N}'$ -tetraméthyl-p-phenylenediamine (TMPD) n'ont pas le même site d'action au niveau de la chaîne de transport d'électrons, il devient intéressant de vérifier le résultat qu'on peut avoir avec différents donneurs n'ayant pas les mêmes sites d'actions. L'utilisation de deux différents donneurs d'électrons permettra de localiser le site exact d'inhibition de transport d'électrons au niveau du PSI. Le premier donneur

utilisé est le TMPD, donneur d'électrons au niveau de la plastocyanine tandis que le second, DCPIP, est un donneur d'électrons au niveau de Cyt b<sub>6</sub>f (Boucher et Carpentier, 1993). En effet, la figure 5.5 a montré que Pb<sup>2+</sup> a inhibé le transport d'électrons au niveau des fractions membranaires de PSI, de la même façon, en présence des deux donneurs d'électrons. Cette inhibition confirme que le Pb<sup>2+</sup> interagit au niveau du PC. D'ailleurs d'autres études avec d'autres métaux lourds ont confirmé l'inhibition dans le même endroit et probablement cela est dû à la compétition qui peut avoir les métaux ajoutés avec le complexe de cuivre (Kato et Takamiya, 1964; Honeycutt et Krogmann, 1972; Engeseth et Mc Millin, 1984; Tamilarasan et Mc Millin, 1986).

Durant nos expériences effectuées sur des échantillons des fractions membranaires de PSI éclairés par une lumière rouge lointaine ( $75 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), la photooxydation de P700 a été drastiquement affectée par l'ajout de PbCl<sub>2</sub>, suggérant ainsi une inhibition de l'activité du PSI. En effet, la mesure du changement d'absorbance à 820 nm, qui estime le pourcentage des PSI actifs, a montré que la photo oxydation du P700 a été considérablement retardée ainsi que la quantité totale de P700 oxydé dans les échantillons en présence de PbCl<sub>2</sub> (Figure 5.3). Ce résultat propose que le transfert d'électrons entre le côté donneur et le P700 a été affecté. Cet effet peut expliquer aussi l'augmentation du niveau ainsi que la vitesse de la photooxydation de P700 à l'état stationnaire. En effet, le changement de conformation des polypeptides du PSI exposés au stroma, causé par le Pb<sup>2+</sup>, peut entraîner la dissociation des cofacteurs du côté donneurs et par la suite l'inhibition du transfert d'électrons dans le PSI. Cette inhibition peut augmenter la probabilité d'une recombinaison avec les P700<sup>+</sup>, augmentant ainsi la photo oxydation du P700 et par conséquent l'absorbance à 820 nm. Bien que le mécanisme exact de cette inhibition soit encore inconnu, notre hypothèse de travail stipule que le plomb permet une interaction spécifique avec les fractions hydrophiles des protéines du PSI au niveau de la PC, bloquant ainsi le transfert d'électrons entre la PC et le P700.

## 6.4 Perspectives

Bien que les données biophysique et biologique se complètent et permettent d'appréhender l'état de l'activité photosynthétique de la plante sous stress métallique, un certain nombre d'informations sont requises pour confirmer ou infirmer les hypothèses qui ont été formulées. Nos travaux laissent entrevoir de nombreuses perspectives d'expérimentations permettant de répondre à ces interrogations. Ainsi, à l'issue de ce travail, il serait intéressant de réaliser des approches comparatives entre des plantes tolérantes et non tolérantes de métaux, pour comprendre les mécanismes de toxicité du plomb, mais également ceux de tolérance à ce métal. Au-delà de cette perspective générale, plusieurs expérimentations peuvent être envisagées pour répondre à certaines questions spécifiques abordées au cours de nos travaux.

Dans le chapitre III, nous avons montré que le plomb est capable d'interagir avec des protéines. Cette interaction provient d'une liaison avec les atomes d'oxygène et d'azote des groupes polypeptidique des albumines. Cependant, un point important demeure ambigu: où se fixe exactement le plomb sur les protéines? Pour y répondre, il serait intéressant d'étudier les sites exacts d'action de  $Pb^{2+}$  sur des protéines par modélisation moléculaire. Bien que les données des techniques de modélisation demeurent controversées, la comparaison à travers le docking moléculaire, de réaction de différents métaux lourds avec plusieurs protéines, peut nous permettre d'avoir une approche informatique des sites de liaisons. Il pourrait également être intéressant d'étudier les interactions entre le  $Pb^{2+}$  et les protéines extrinsèques isolées, afin de mieux éclaircir les modes d'action de plomb en comparant les résultats obtenus avec ceux du PSII et PSI. Cependant, le plus grand défi de cette dernière étude consisterait à préserver la structure native des protéines extrinsèques après leur isolation.

La deuxième partie du travail (chapitre IV et V) a mis en évidence que le plomb affecte, avec le même seuil de concentration (5  $\mu M$ ), aussi bien le PSI que le PSII par l'inhibition de transport d'électrons au niveau du complexe de fer (entre  $Q_A$  et  $Q_B$ ), du complexe de dégagement d'oxygène et de la plastocyanine. Il serait donc important de

vérifier ces résultats par des méthodes de modélisation moléculaire ainsi que des études *in vivo* avec les mêmes seuils de concentrations.

Enfin, l'effet toxique du  $\text{Pb}^{2+}$  sur l'appareil photosynthétique pourrait être considéré comme un modèle pour étudier les mécanismes d'action des métaux lourds sur les cellules animales et humaines soumises à ce type de stress.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Santé Canada : [http://www.hc-sc.gc.ca/cps-spc/pubs/indust/heavy\\_metals-metaux\\_lourds/index-fra.php#a4](http://www.hc-sc.gc.ca/cps-spc/pubs/indust/heavy_metals-metaux_lourds/index-fra.php#a4)
- Ahmed A, Tajmir-Riahi HA, Carpentier R (1995) A quantitative secondary structure analysis of the 33 kDa extrinsic polypeptide of photosystem II by FTIR spectroscopy, FEBS Lett 363: 65-68.
- Ahmed Ouameur, A., Diamantoglou, S., Sedaghat-Herati, M. R., Nafisi, S. H., Carpentier R. and Tajmir-Riahi. H. A. (2006). An overview of drug binding to human serum albumin: Protein folding and unfolding. Cell. Biochem. Biophys. 45: 203-213.
- Adriano, D.C. (2001). Copper: In trace elements in terrestrial environments, biogeochemistry, bioavailability, and risks of metal, Ed D C Adriano. 499-546.
- Amunts, A., Drory, O. and Nelson, N. (2007). The structure of a plant photosystem I supercomplex at 3.4 Å resolution, Nature. 447: 58-63.
- Atkins, P. W., de Paula, J. (2004). In Chimie Physique; DeBoeck Ed.; Oxford University Press. 934-940.
- Azioune, A. Siroti, F. Tanguy, J. Jouini, M. Chehimi, M.M. Miksa, B. Slomkowski, S. (2005). Interactions and conformational changes of human serum albumin at the surface of electrochemically synthesized thin polypyrrole films. Electrochim. Acta. 50: 1661-1667.
- Baker, A.L.M. (1981). Accumulators and excluders – Strategies in the response of plants to heavy metals. Journal of Plant Nutrition 3:643-654.
- Baker, N. R. (2008). Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo, Annual Review of Plant Biology. 59: 89-113.
- Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. and Schliefer, K.-H. (1992). The Prokaryotes. Springer-Verlag, Berlin.
- Baize, D. (2007). Teneurs totales en éléments traces métalliques dans le sols (France). INRA éditions, Paris. 409-410.

- Barazzouk, S. and Daneault, C. (2011). Spectroscopic characterization of oxidized nanocellulose grafted with fluorescent amino acids. *Cellulose* 18: 643-653.
- Battersby, A. R. (1987). Nature's pathways to the pigments of life. *Nat. Prod. Reports*. 4: 83-87.
- Belatik, A. Essemine, J. Houtchandani, S. Carpentier, R. (2012). Afterglow thermoluminescence measured in isolated chloroplasts. *Photochem. Photobiol.* 88: 67-75.
- Beamson, G. and Briggs, D. (1992). *High Resolution XPS of Organic Polymers -The Scienta ESCA 300 Database*, Wiley, Chichester, UK.
- Ben-Shem, A., Frolow, F. and Nelson, N. (2003). The crystal structure of plant Photosystem I. *Nature*. 426: 630-635.
- Blankenship, R. E. (2002) *Molecular mechanisms of Photosynthesis*. Oxford: Blackwell Science Ltd., pp. 328.
- Boisvert, S., Joly, D. and Carpentier, R. (2006). Quantitative analysis of the experimental O-J-I-P chlorophyll fluorescence induction kinetics: Apparent activation energy and origin of each kinetic step. *FEBS J* 273: 4770-4777.
- BRGM (2004). *Guide méthodologique du plomb appliqué à la gestion des sites et des sols pollués. Rapport final*, BRGM/RP-52881-FR.
- Boucher, N. and Carpentier, R. (1993). Heat-stress stimulation of oxygen uptake by photosystem I involves the reduction of superoxide radicals by specific electron donors, *Photosynth. Res.* 35: 213-218.
- Bukhov, N. G., Govindachary, S., Egorova, E. A., Joly, D., Carpentier, R. (2003) "N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine initiates the appearance of a wellresolved I peak in the kinetics of chlorophyll fluorescence rise in isolated thylakoids", *Biochim. Biophys. Acta* 1607: 91-96.
- Bukhov, N., Govindachary, S., Egorova, E.A. and Carpentier, R. (2003). Interaction of exogenous quinones with membranes of higher plant chloroplasts: Modulation of quinone capacities as photochemical and non-photochemical quenchers of energy in Photosystem II during light-dark transitions, *Biochim. Biophys. Acta.* 1604: 115-123.
- Bukhov, N. and Carpentier, R. (2004). Alternative photosystem I-driven electron transport routes: mechanisms and functions. *Photosynthesis Research.* 82: 17-33.

- Burda, K. (2007). Dynamics of electron transfer in photosystem II. *Cell Biochem Biophys.* 47: 271-284.
- Busch, A. and Hippler, M. (2011). The structure and function of eukaryotic photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1807: 864-877.
- Byler, D. M and Susi, H. (1986). Examination of the secondary structure of proteins by deconvoluted FTIR spectra. *Biopolymers.* 25: 469-487.
- Callender, E. (2003). Heavy Metals in the Environment-Historical Trends. In: B.S. Lollar (Ed.), *Environmental Geochemistry. Treatise on Geochemistry.* Elsevier-Pergamon, Oxford. 67-105.
- Carter, D. c. and Ho, L. X. (1994). Structure of serum albumin. *Adv. Protein Chem.* 45: 153-203.
- Carpentier, R., Larue B. and Leblanc, R. M. (1984). Photoacoustic spectroscopy of *Anacystis nidulans* III. Detection of photosynthetic activities, *Arch. Biochem.Biophys.* 228: 534-543.
- Carter, D. C. and Ho, J. X. (1994). Structure of serum albumin. *Adv Protein Chem.* 45: 153-203.
- Clemens, S., Palmgren, M.G. and Kräner, U. (2002). A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science.* 7: 309-315.
- Colandini, V. (1997). Effet des structures réservoirs à revêtement poreux sur les eaux pluviales : Qualité des eaux et devenir des métaux lourds. Thèse Chimie et microbiologie de l'eau : Université de Pau et de l'Adour. 278.
- Curry, S., Brick, P. and Frank, N. P. (1999). Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies. *Biochim. Biophys. Acta.* 1441: 131-140.
- Dahmani-Muller, H. (1996). Localisation et approche de spéciation de métaux lourds (Zn, Pb, Cd) dans des végétaux adaptés aux friches industrielles. INRA, Versailles, DEA-S.T.E.Paris XII val de Marne. 46.
- DalCorso, G., Pesaresi, P., Masiero, S., Aseeva, E., Nemann, D.S., Finazzi, G., Joliot, P., Barbato, R. and Leister, D. (2008). A complex containing PGRL1 and PGR5 is involved in the switch between linear and cyclic electron flow in *Arabidopsis*, *Cell.* 132: 273-285.

- Demmig-Adams, B. and Adams, W. (1996). The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis". *Trends in Plant Science*.1: 21-26.
- Dollfus, C. (2001). Prise en charge du saturnisme. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture*. 14: 412-418.
- Dousseau, F., Therrien, M. and Pezolet, M. (1989). On the spectral subtraction of water from the FT-IR spectra of aqueous solutions of proteins. *Appl. Spectrosc.* 43: 538-542.
- Ducruet, J. M. (2003). Chlorophyll thermoluminescence of leaf discs: simple instruments and progress in signal interpretation open the way to new ecophysiological indicators. *J. Exp. Bot.* 54: 2419-2430.
- Ducruet, J. M., Roman, M., Ortega, J. M., Janda, T. (2005) "Role of the oxidized secondary acceptor Q<sub>B</sub> of photosystem II in the delayed afterglow chlorophyll", liminescence. *Photosynth. Res.* 84: 161-166.
- Engeseth, H.R. and McMillin, D.R. (1984). A new assignment of the disulfide linkage in stellacyanin. *FEBS. Lett.*171: 257-261.
- Evtushenko, Z.S., Belcheva, N.N., Lukyanova O.N. (1986). Cadmium accumulation in organs of the scallop *Mizuhopecten yessoensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 83: 377-382.
- Ferreira, K. N., Iverson, T.M., Maghlaoui, K., Barber, J., Iwata, S. (2004). Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center, *Science*. 303: 1831-1838.
- Figge, J., Rossing, T.H., Fencl, V. (1991). The role of serum proteins in acid-base equilibria. *J. Lab. Clin. Med.* 117: 453-467.
- Frank, H. A. and Cogdell, R. J. (1996). Carotenoids in photosynthesis. *Photochem. Photobiol.* 63 : 257-264.
- Frateur, I., Lecoœur, J., Zanna, S., Olsson, C.O., Landolt, A., et al. (2007). Adsorption of BSA on passivated chromium studied by a flow-cell EQCM and XPS. *Electrochim Acta* 52: 7600-7609.
- Froehlich, E., Jennings, J.C., Sedaghat-Herati, M.R. and Tajmir-Riahi, H.A. (2009). Dendrimers bind human serum albumin. *J. Phys. Chem. B.* 11: 6986-6993.



- Gauthier, A., Govindachary, S., Harnois, J., Carpentier, R. (2006). Interaction of N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine with photosystem II as revealed by thermoluminescence: reduction of the higher oxidation states of the Mn cluster and displacement of plastoquinone from the QB niche. *Biochim. Biophys. Acta.* 1757: 1547-1556.
- Garnier, R. (2005). Toxicité du plomb et de ses dérivés, EMC-Toxicologie-Pathologie (Elsevier Masson SAS) Pathologie Professionnelle et de l'Environnement. 67-88.
- Guidet, B. (2009). Albumin. Acute circulatory failure. In *Réanimation*. Edited by Richard C, Teboul JL, Vincent JL.: Elsevier. 343-356.
- Guskov, A., Kern, J., Gabdulkhakov, A., Broser, M., Zouni, A., Saenger, W. (2009). Cyanobacterial photosystem II at 2.9-angstrom resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride, *Nat Struct Mol Biol*, 16: 334-342.
- Hall, D. O. and Rao, K. K. (1999). *Photosynthesis*. sixth edition, Cambridge University Press. 32-54.
- Han, F.X., Banin, A., Kingery, W.L., Triplett, G.B., Zhou, L.X., Zheng, S.J. and Ding W.X. (2003). New approach to studies of heavy metal redistribution in soil. *Advances in Environmental Research* 8: 113-120.
- Harnois, J., Msilini, N. and Carpentier, R. (2011). Isolation of photosystem I submembrane fractions, in: R. Carpentier (Ed.), *Photosynthesis Research Protocols*. 2nd ed., Springer Science. New York. 11-15.
- Hillel, D. (1998). *Environmental Soil Physics*. San Diego: Academic Press. 771-780.
- Hodson, M. E. (2004). Heavy metals-geochemical bogey men? *Environ Pollut.* 129: 341-343.
- Honeycutt, R.C. and Krogmann, D.W. (1972). Inhibition of chloroplast reactions with phenylmercuric acetate. *Plant Physiol.* 49: 376-380.
- Hooper, J.K. (1984). *Chloroplasts*, Plenum Press.
- Horton, P., Ruban, A. V. and Walters, R. G. (1996). Regulation of light harvesting in green plants". *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.* 47: 655-684.
- Hudak, J. (1997). Photosynthetic apparatus. In M. Pessaraki, (ed): *Handbook of photosynthesis*. Marcel Dekker, New York, Basel- Hong Kong. 27-48.

- Jammart, S., (2006). Histoire du saturnisme de l'Antiquité à nos jours, Th. d'exercice : Médecine Générale : Nancy.
- Jansen, R.J.J. and Van Bekkum, H. (1995). XPS of nitrogen-containing functional groups on activated carbon. *Carbon*. 33: 1021-1027.
- Jansson, S. (1999). A guide to the Lhc genes and their relatives in Arabidopsis. *Trends. Plant Sci.* 4: 236-240.
- Jain, N. C. (1993). The plasma proteins, dysproteinemias and immune deficiency disorders. In: *Essentials of veterinary hematology*, Lea et Febbiger, Philadelphia. 349-380.
- Johnson, W.C. (1999). Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structure. *Proteins. Struct. Funct. Genet.* 35: 307-312.
- Joly, D., Bigras, C., Harnois, J., Govindachary, S. and Carpentier, R. (2005). Kinetic analyses of the OJIP chlorophyll fluorescence rise in thylakoid membranes. *Photosynth. Res.* 84: 107-112.
- Joly, D. and Carpentier, R. (2007). The oxidation/reduction kinetics of the plastoquinone pool controls the appearance of the I-peak in the O-J-I-P chlorophyll fluorescence rise: Effects of various electron acceptors. *J Photochem Photobiol B* 88: 43-50.
- Joly, D., Carpentier, R. (2009). Sigmoidal reduction kinetics of the photo system II acceptor side in intact photosynthetic during fluorescence induction. *Photochem. Photobiol. Sci.* 8: 167-173.
- Jordan, K., Chodock, R., Hand, A. R. and Laird, D. W. (2001). The origin of annular junctions: a mechanism of gap junction internalization. *J. Cell. Sci.* 114: 763-773.
- Jourdan, B., Piantone, P., Lerouge, C. and Guyonnet, D. (2005). Atténuation des métaux à l'aval de sites de stockage de déchets - Synthèse bibliographique. BRGM. 110-120.
- Kabata-Pendias, A. and Pendias, H. (2001). Trace elements in soils and plants. 3<sup>rd</sup> CRC Press, Boca Raton, London, New-York, Washington D.C.
- Kalis, E.J., Temminghoff, E.J., Visser, A. and Van Riemsdijk, W.H. (2007). Metal uptake by *Lolium perenne* in contaminated soils using a four-step approach. *Environ Toxicol Chem.* 26: 335-345.
- Katoh, S., Takamiya, A. (1964). Nature of copper-protein binding in spinach plastocyanin. *J. Biochem.* 55: 378-387.

- Kauppinen, J. K., Moffatt, D. J., Mantsch, H. H. and Cameron, D. G. (1981). Fourier self-deconvolution: a method for resolving intrinsically overlapped bands. *Appl. Spectrosc.* 35: 271-276.
- Kelly, S.M., Jess, T.J. and Price, N.C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta.* 1751: 119-139.
- Kinne, O. (1968). International symposium "Biological and hydrological problems of water pollution in the North Sea and adjacent waters". *Helgol. Wiss. Meeresunters.* 17: 518-522.
- Kinsella, J. E. and Whitehead, D.M. (1989). Proteins in whey: chemical, physical, and functional properties. *Adv. Food Nutr. Res.* 33: 343-438.
- Kragh-Hansen U (1990) Structure and ligand binding properties of human serum albumin. *Dan Med Bull* 37: 57-84.
- Kratochwil, N.A., Huber, W., Muller, F., Kansy, M. and Gerber, P.R. (2002). Predicting plasma protein binding of drugs: a new approach. *Biochem. Pharmacol.* 64: 1355-1374.
- Krimm, S. and Bandekar, J. (1986). Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Adv Protein Chem* 38: 181-364.
- Kurk, J. H., Hollander-Czytko, W., Omettmeir and Trebest, A. (2005). Tocopherol as singlet oxygen scavenger in photosystem II. *Journal of Plant Physiology* 162: 749-757.
- Kutik, J. (1998). The development of chloroplast structure during leaf ontogeny, *Photosynthetica.* 35: 481-505.
- Laajalehto, K., Kartio, I. and Suoninen, E. (1997). XPS and SR-XPS techniques applied to sulphide mineral surfaces. *International. J. Min. Proc.* 51: 163-170.
- Lapedes, D. N. (1974). McGraw-Hill Dictionary of scientific and technical terms, New York.
- Lazar, D. (1999). Chlorophyll a fluorescence induction, *Biochimica et Biophysica Acta.* 1412: 1-28.
- Lazar, D. (2006). The polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. *Funct. Plant. Biol.* 33: 9-30.

- Lessler, M. A., (1988). Lead and lead poisoning from Antiquity to Modern Times. *Ohio J. Sci.* 88: 78-84.
- Liu, Z., Yan, K., Wang, K., Kuang, T., Zhang, L., Gui, L., An, X. and Chang, W. (2004). Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution", *Nature*. 428: 287-292.
- Lovley, D. R., Lloyd, J. R. (2000). Microbes with a mettle for bioremediation. *Nat. Biotechnol.* 18: 600-601.
- Ma, Y., Prasad, M.N.V., Rajkumar, M. and Freitas, H. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils *Biotechnology Advances*. 29: 248-258.
- Malkin, S. and Cahen, D. (1979). Photoacoustic spectroscopy and radiant energy conversion: Theory of the effect with special emphasis on photosynthesis. *Photochem. Photobiol.* 29: 803-813.
- Manceau, A., Boisset, M. C., Sarret, J.L., Hazemann, J. L., Mench, M., Cambier, P. and Prost, R. (1996). Direct determination in contaminated soils by EXAFS spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 30: 1540-1552.
- Mathis, P. and Paillotin, G. (1981). Primary processes of photosynthesis. in *The biochemistry of plants*, Hatch, M. D., Boardman, N. K., éditeurs, Academic Press, New York, pp 97-161.
- Michel, H., Deisenhofer, J. (1988). Relevance of the photosynthetic reaction center from purple bacteria to the structure of Photosystem II, *Biochemistry*. 27: 1-7.
- Morel, J.L. (1997). Bioavailability of Trace Elements to Terrestrial Plants. Tarradellas J., Bitton D. (Eds). *Soil Ecotoxicology*. CRC. Lewis Publishers, Boca Raton. 6: 141-175.
- Mustárdy, L. and Garab, G. (2003). Granum revisited. A three-dimensional model-where things fall into place. *Trends Plant Sci.* 8: 117-122.
- Navas-Acien, A., Guallar, E., Silbergeld, E. K. and Rothenberg S. J. (2006). Lead Exposure and Cardiovascular Disease: A Systematic Review. *Environ Health Perspect.* 115.
- Nelson, N. and Yocum, C. F. (2006). Structure and function of photosystem I and II. *Annu Rev Plant Biol.* 57: 521-565.

- Niyogi, K. K. (1999). Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 50: 333-359.
- Niyogi, K. K., Bjorkman, O., Grossman, A R. (1997). The roles of specific xanthophylls in photoprotection. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 94: 14162-14167.
- Nuyts, G. D., Daelemans, R. A., Jorens, P., Elseviers, M. M., Van de Vyver, F. L. and De Broe, M. E. (1991). Does Lead Play a Role in the Development of Chronic Renal Disease? *Nephrology Dialysis Transplantation*. 6: 307-315.
- Ono, T. A., Noguchi, T. and Nakajima, Y. (1995). Characteristic changes of function and structure of photosystem II during strong light photoinhibition under aerobic conditions. *Biochim. Biophys. Acta*. 1229: 239-248.
- Otagiri, M. and Chuang, V. T. (2009). Pharmaceutically important pre- and posttranslational modifications on human serum albumin. *Biol Pharm Bull*. 32: 527-534.
- Panga, J., Jian, W., Wangc, L., Wua, C., Liua, Y., Hea, J. and Tangd, X. (2012). X-ray photoelectron spectroscopy analysis on surface modification of Konjac glucomannan membrane by nitrogen plasma treatment. *Carbohydr. Polym*. 88: 369-372.
- Painter, L., Harding, M. M. and Beeby, P. J. (1998). Synthesis and interaction with human serum albumin of the first 3,18-disubstituted derivative of bilirubin. *J. Chem. Soc. Perkin Trans*. 18: 3041-3044.
- Pais, I. and Benton Jones, J. (2000). *The handbook of Trace Elements*. Boca Raton, FL, St. Lucie Press. 223.
- Peters, F.A., Van Spanning, L.J. and Kraayenhof, R. (1983). Studies on well coupled Photosystem I-enriched subchloroplast vesicles. Optimization of ferredoxin-mediated cyclic photophosphorylation and electric potential generation. *Biochim. Biophys. Acta*. 724 (1983) 159-165.
- Peters, F. A. L. J., Van Spanning, R. and Kraayenhof, R. (1983). Studies on well coupled Photosystem I-enriched subchloroplast vesicles. Optimization of ferredoxin-mediated cyclic photophosphorylation and electric potential generation. *Biochim. Biophys. Acta* 724: 159-165.
- Peters, T. J. (1985). Serum albumin. *Adv Protein Chem*. 37:161-245.

- Peters, T. J. (1996). All about albumin. San Diego: Academic.
- Porra, R. J., Thompson, W. A., Kriedemann, P. E. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous-equations for assaying chlorophyll-a and chlorophyll-b extracted with 4 different solvents – Verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic-absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta.* 975: 384-394.
- Pospisil P, Tyystjarvi E (1999) Molecular mechanism of high temperature-induced inhibition of acceptor side of photosystem II. *Photosynth Res* 62: 55-66.
- Pospisil, P., Dau, H. (2000) "Chlorophyll fluorescence transients of Photosystem II membrane particles as a tool for studying photosynthetic oxygen evolution", *Photosynth. Res.* 65: 41-52.
- Pospisil, P., Dau, H. (2002) "Valinomycin sensitivity proves that light-induced thylakoid voltages result in millisecond phase of chlorophyll fluorescence transients", *Biochim. Biophys. Acta* 1554: 94-100.
- Putrenko, II., Vasiliev, S. and Bruce, D. (1999). Modulation of flash-induced photosystem II fluorescence by events occurring at the water oxidizing complex. *Biochem.* 38: 10632-10641.
- Rabin, R. (1989). Warnings unheeded: a history of child lead poisoning. *Am J Public Health.* 79: 1668-1674.
- Rajagopal, S., Bukov, N.G., Tajmir-Riahi, H.A. and Carpentier, R. (2003a). Control of energy dissipation and photochemical activity in photosystem I by NADP-dependent reversible conformational changes, *Biochemistry* 42:11839-11845.
- Rajagopal, S., Egorova, E.A., Bukhov, N. and Carpentier, R. (2003b). Quenching of excited states of chlorophyll molecules in submembrane fractions of Photosystem I by exogenous quinines, *Biochim. Biophys. Acta.* 1606: 147-152.
- Rengel, Z. (1999). Heavy Metals as Essential Nutrients. In: Prasad, M.N.V. & Hagemayer, J. (Eds.). *Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems.* Springer-Verlag, Berlin. 231-251.
- Robinson, C. (1996). Targeting of proteins into and across the thylakoid membrane. In: *Oxygenic photosynthesis: the light reactions.* Advances in photosynthesis, Ort DR et Yocum CF, eds, Kluwer academic publishers, Dordrecht, The Netherlands. 4: 103-112.

- Rutherford, A.W. (1989). Photosystem-II, the water-splitting enzyme, *Trends Biochem Sci.* 14: 227-232.
- Rutherford A.W. and Boussac A. (2004). Water photolysis in biology *Science, Biochemistry.* 303: 1782-1784.
- Sainio, E., Jolanki, R., Hakala, E., and Kanerva, L. (2000). Metals and arsenic in eye shadows. *Contact Dermatitis* 42: 5-10.
- Schlichting, C. D. (1986). The evolution of phenotypic plasticity in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics.* 17:667-693.
- Schreiber, U. and Bilger, W. (1993) Progress in Chlorophyll Fluorescence Research: Major Developments During the Past Years in Retrospect, in: *Progress in Botany*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. 151-173.
- Smith, C.D., Carney, J.M., Starke-Reed, P.E., Oliver, C.N., Stadtman, E.R., Floyd, R.A., Markesbery, W.R., 1991. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 10540-10543.
- Sreerama, N. and Woody R.W. (2000). Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.* 287: 252-260.
- Sposito, D. (1989). *The chemistry of soils.* New York : Oxford University Press. 277-280.
- Strasser, R. J. and Govindjee. (1992). On the O-J-I-P fluorescence transients in leaves and D1 mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. In: Murata N, editors. *Research in Photosynthesis.* Kluwer Academic Publishers Dordrecht. The Netherlands. 23-32.
- Strasser RJ, Srivastava A, Govindjee (1995) Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochem Photobiol* 61: 32-42.
- Strawn, D. G. and Sparks, D. L. (1999). Sorption kinetics of trace element in soils and soil materials. Fate and transport of heavy metals in the vadose zone. Selin, H. M. et Iskandar, I. K. Lewis publishers. Michigan.
- Stroebel, D., Choquet, Y., Popot, J. L. and Picot, D. (2003). An atypical haem in the cytochrome b(6)f complex. *Nature.* 426: 413-418.

- Sugio, S., Kashima, A., Mochizuki, S., Noda, M. and Kobayashi, K. (1999). Crystal structure of human serum albumin at 2.5Å. *Protein Eng.* 12: 439-446.
- Tamilarasan, R. and McMillin, D.R. (1986). Absorption spectra of d10 metal ion derivatives of plastocyanin. *Inorg.Chem.*25: 2037-2040.
- Tidwell, C.D., Castner, D.G., Golledge, S.L., Ratner, B.D., Meyer, K., Hagenhoff, B. and Benninghoven, A. (2001). Static time-of-flight secondary ion mass spectrometry and X-ray photoelectron spectroscopy characterization of adsorbed albumin and fibronectin films. *Surf. Interface Anal.* 31: 724-733
- Van den Hoek, C., Mann, D. G., Jahns, H. M. (1996). *Algae - An introduction to phycology.* Cambridge University Press, New York.
- Van den Hoek, C., Mann, D. G., Jahns, H. M. (1996). *Algae - An introduction to phycology.* Cambridge University Press, New York
- Waldron, H. A. (1966). The anemia of Lead Poisoning: A Review, *Br. J. Ind. Med.* 23: 83-100.
- Willstätter, R. and Stoll, A. (1910). *Untersuchungen über Chlorophyll.* Justus Springer, Berlin (English translation by Schertz FM and Merz AR, Science Printing Press, Lancaster, Pennsylvania. 378: 18-72.
- Winiarski, T et Lassabatère, L. (1999). Influence d'un géotextile non tissé sur la rétention du zinc dans un sol calcaire. *Bulletin des Laboratoires des Ponts et Chaussées.* 223: 85-92.
- Woody, R.W. (1995). Circular dichroism. *Methods. Enzymol.* 246, 34-71.
- Yakushevskaya, A. E., Keegstra, W., Boekema, E. J., Dekker, J. P., Andersson, J., Ruban, A. V., Horton, P. (2003). The structure of Photosystem II in *Arabidopsis*: localization of the CP26 and CP29 antenna complexes", *Biochemistry.* 42: 608-613.
- Zhu, X. G., Govindjee, Baker, N., deSturler, E., Ort, D., Long, S. (2005) "Chlorophyll a fluorescence induction kinetics in leaves predicted from a model describing each discrete step of excitation energy and electron transfer associated with Photosystem II". *Planta.* 223: 114-133.
- Zouni, A., Witt, H.T., Kern, J., Fromme, P., Krauss, N., Saenger, W., Orth, P. (2001). Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 angstrom resolution. *Nature.* 409: 739-743.



Zubavichus, Y., Zharnikov, M., Shaporenko, A., Fuchs, O., Weinhardt, L., Heske, C., Umbach, E., Denlinger, J.D. and Grunze, M. (2004a). Soft X-ray induced decomposition of phenylalanine and tyrosine: a comparative study. *J. Phys. Chem. A*. 108: 4557-4565.

Zubavichus, Y., Fuchs, O., Weinhardt, L., Heske, C., Umbach, E., Denlinger, J.D. and Grunze, M. (2004b). Soft X-ray-induced decomposition of amino acids: an XPS, mass spectrometry, and NEXAFS study. *Rad. Res.* 161: 346-358.

Rapport-Gratuit.com