

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	v
AVANT-PROPOS	vii
RÉSUMÉ.....	viii
LISTE DES FIGURES	xiv
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	xvi
CHAPITRE I	
INTRODUCTON GÉNÉRALE.....	1
1.1 La photosynthèse	1
1.1.1 Définition et bilan	1
1.1.2 Le chloroplaste : siège de la photosynthèse.....	2
1.1.3 Les pigments photosynthétiques et la lumière	5
1.1.4 La chaine photosynthétique : les principales structures impliquées dans la phase lumineuse.....	7
1.1.4.1 Photosystème II (PSII).....	7
1.1.4.2 Photosystème I (PSI)	17
1.1.5 Le transport photosynthétique d'électrons au niveau de la membrane thylakoïdale : le schéma en Z	23
1.1.6 Les différentes voies de dissipation d'énergie	23
1.1.6.1 La fluorescence.....	25
1.1.6.2 La chaleur	27
1.2 Effets de la toxicité des métaux : l'aluminium, un exemple d'étude	30
1.2.1 L'aluminium (Al).....	31
1.2.1.1 L'élément aluminium : propriétés physico-chimiques	31
1.2.1.2 L'Al : sous quelle forme est-il toxique?	32
1.2.1.3 Origines de contamination de l'environnement par l'Al	32
1.2.2 Phytotoxicité de l'Al.....	35
1.2.2.1 Effets de l'Al sur la croissance des plantes	36
1.2.2.2 Effets de l'Al sur la photosynthèse.....	37
1.3 Problématiques et objectifs du projet	42

CHAPITRE II	
DESTABILIZATION OF THE OXYGEN EVOLVING COMPLEX OF PHOTOSYSTEM II BY AL³⁺	
	46
2.1	Résumé de l'article 46
2.2	Premier article scientifique 48
	Abstract..... 48
	Introduction..... 49
	Materials and Methods 51
	Isolation of thylakoid membranes..... 51
	Oxygen evolution..... 52
	Chl fluorescence induction 52
	Flash-induced Chl fluorescence decay kinetics 52
	Thermoluminescence (TL) 53
	Results 53
	Oxygen evolved 53
	Chl fluorescence induction 54
	Flash-induced variable fluorescence decay 55
	Thermoluminescence 56
	Discussion..... 57
	Conclusions 60
	References..... 61
	Figures captions 69
CHAPITRE III	
MECHANISM OF INTERACTION OF AL³⁺ WITH THE PROTEINS COMPOSITION OF PHOTOSYSTEM II.....	
	78
3.1	Résumé de l'article 78
3.2	Deuxième article scientifique 80
	Abstract..... 81
	Introduction..... 81
	Materials and Methods 85
	Thylakoid membrane preparation..... 85
	Isolation of PSII submembrane fractions..... 86

Oxygen evolution activity measurements.....	86
SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.....	87
Chl fluorescence induction	87
Low temperature (77 K) chlorophyll fluorescence measurements.....	88
Native green gel electrophoresis.....	88
FTIR spectroscopic measurements	89
Analysis of PSII protein secondary structure	89
Results	90
Oxygen evolution.....	90
PSII polypeptide profile in SDS page electrophoresis.....	91
Chl fluorescence induction	92
Low temperature (77 K) Chl fluorescence emission spectra.....	93
Native green gel electrophoresis.....	94
FTIR spectra of Al ³⁺ -PSII complexes.....	94
Discussion and Conclusions	96
References.....	101
Figures captions.....	113

CHAPITRE IV	
CHARACTERIZATION OF THE STRUCTURAL CHANGES AND PHOTOCHEMICAL ACTIVITY OF PHOTOSYSTEM I UNDER AL³⁺ EFFECT.....	126
4.1 Résumé	126
4.2 Troisième article scientifique	128
Abstract.....	129
Introduction.....	130
Materials and Methods	132
Isolation of thylakoid membranes.....	132
Isolation of PSI submembrane fractions.....	133
Oxygen uptake activity measurements	133
Fluorescence measurements	134
Measurements of P700 redox state	134
Analysis of polypeptide composition of PSI complex by SDS-PAGE ..	135

FTIR spectroscopic measurements	135
Analysis of PSI protein secondary structure	135
Results	136
Oxygen uptake rates.....	136
Redox state of P700	137
Chl fluorescence emission spectra.....	139
Polypeptide composition of PSI complexes	139
FTIR spectra of Al ³⁺ -PSI complexes.....	140
Discussion.....	140
Conclusion	144
References.....	144
Figures captions	151
CHAPITRE V	
DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS	160
5.1 Sites d'action d'Al ³⁺ au niveau du PSII et son effet sur l'activité photosynthétique.....	161
5.2 Mécanismes d'action d'Al ³⁺ sur le PSII	167
5.3 Effets de l'Al ³⁺ sur l'activité photochimique et les propriétés structurales du PSI	175
5.4 Perspectives de recherche	180
BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE	183

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Représentation schématique des deux phases de la photosynthèse	2
1.2	Section transversale d'une feuille (A) montrant les chloroplastes localisés dans la cellule de la mésophylle (d'après : Hopkins, 1999). Modèle (B) et photo en microscopie électronique (C) de la structure d'un chloroplaste des plantes et ses composants de base (d'après : Horton <i>et al.</i> , 2002)	3
1.3	Modèle schématique de la disposition des différents complexes protéiques impliqués dans la chaîne de transfert d'électrons photosynthétique dans la membrane thylakoïdale d' <i>Arabidopsis thaliana</i> (d'après : Allen <i>et al.</i> , 2011)	4
1.4	Représentation schématique de la répartition des complexes protéiques dans les membranes thylakoïdales (d'après : Allen et Forsberg, 2001)	5
1.5	Structure des chlorophylles <i>a</i> et <i>b</i> et de β -carotène	6
1.6	Spectre d'absorbance des pigments photosynthétiques (chlorophylles <i>a</i> , <i>b</i> et des caroténoïdes) chez les plantes supérieures (d'après : Raven <i>et al.</i> , 2000)	7
1.7	Représentation schématique de la structure du PSII et de ses principaux cofacteurs. Source : Jon Nield. Schéma basé sur les travaux de Ferreira <i>et al.</i> (2004) et Liu <i>et al.</i> (2004).....	8
1.8	Structure cristalline de LHCI de l'épinard (d'après : Liu <i>et al.</i> , 2004)	10
1.9	Modèles topologiques des protéines D1 et D2 et mise en évidence des acides aminés conservés (d'après : Bricker et Ghanotakis, 1996).....	12
1.10	Structure du complexe de Mn_4O_5Ca et les ligands de son environnement (d'après : Umena <i>et al.</i> , 2011)	14
1.11	Dégagement de l'oxygène sous l'effet de flashes lumineux saturants (d'après : Joliot <i>et al.</i> , 1969).....	14
1.12	Représentation du cycle des états S selon le modèle de Kok <i>et al.</i> (1970)....	15
1.13	Structure cristalline des protéines extrinsèques de <i>Cyanobacterium T. elongatus</i> à 3.2 Å (d'après : Biesiadka <i>et al.</i> , 2004)	16

1.14	Représentation schématique de la structure du PSI et de ses principaux cofacteurs. Source : Jon Nield. Schéma basé sur les travaux d'Amunts <i>et al.</i> (2007).....	19
1.15	Modèle structural du complexe de PSI des plantes de pois montrant les dimères Lhca1,4 et Lhca2,3 du LHCI : vue de dessus du côté du stroma (d'après : Amunts <i>et al.</i> , 2010)	20
1.16	Transfert de l'énergie lumineuse absorbée par les antennes collectrices de lumière jusqu'au CR du photosystème (d'après : Raven <i>et al.</i> , 2000)	22
1.17	Schéma en Z des réactions de transfert d'électrons photosynthétique au niveau de la membrane thylakoïdale. Source : Wilbert Veit et Govindjee, (2000).....	23
1.18	Diagramme de Jablonski simplifié de l'absorption d'énergie et des principales voies de dissipation d'énergie en photosynthèse.....	25
1.19	Cycle des xanthophylles se déroulant chez les plantes.....	28
1.20	Migration de l'antenne LHCI phosphorylée du PSII vers PSI et son retour du PSI vers PSII (d'après : Allen et Forsberg, 2001).....	29

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

Al	Aluminium
A ₀ and A ₁	Accepteurs primaires et secondaires d'électrons du PSI, respectivement
CEO	Complexe d'évolution d'oxygène
Chl	Chlorophylle
CP43	Antenne interne de 43 kDa
CP47	Antenne interne de 47 kDa
CR	Centre réactionnel
Cyt b ₆ /f	Cytochrome b ₆ /f
DCBQ	2,5-dichlorobenzoquinone
DCMU	3-(3',4'-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée
DCPIPH ₂	2,6-dichlorophenol indophenols réduit
DQH ₂	Duroquinol
F _A , F _B and F _x	Complexes fer-soufres [4Fe-4S] sur le côté accepteur d'électrons du PSI
F ₀	Niveau minimal de fluorescence
F _m	Niveau maximal de fluorescence
F _v	Fluorescence variable
Fd	Ferrédoxine
FNR	Ferrédoxine-NADP ⁺ -réductase
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
MV	Méthyl viologène
LHCI	Antenne collectrice de lumière périphérique du PSI
LHCII	Antenne collectrice de lumière périphérique du PSII
P680	Donneur primaire d'électrons du PSII

P700	Donneur primaire d'électrons du PS I
PC	Plastocyanine
Phéo	Phéophytine
PQ	Plastoquinone
PQH ₂	Plastoquinol
PSI	Photosystème I
PSII	Photosystème II
PsbA	Protéine D1 du PSII
PsbD	Protéine D2 du PSII
PsbO	Protéine extrinsèque de 33 kDa
PsbP	Protéine extrinsèque de 23 kDa
PsbQ	Protéine extrinsèque de 17 kDa
Q _A	Quinone primaire acceptrice d'électrons du PSII
Q _B	Quinone secondaire acceptrice d'électrons du PSII
qE	Quenching de haute énergie
qI	Quenching dû à la photoinhibition
qT	Quenching dû à la transition d'états
TMPD	N,N,N',N'-tetramethylphenylenediamine
Tyr Z	Tyrosine Z, donneur d'électrons principal du P680

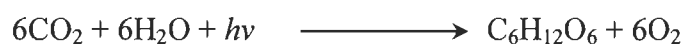
CHAPITRE I

INTRODUCTON GÉNÉRALE

1.1 La photosynthèse

1.1.1 Définition et bilan

La photosynthèse est un processus biologique capable de transformer l'énergie lumineuse en énergie chimique utilisable pour la synthèse de matière organique. Cette matière organique est indispensable pour le développement et la synthèse de biomasse dans les organismes photosynthétiques. Ce processus s'effectue par plusieurs organismes vivants, à savoir les plantes, les algues et les cyanobactéries. C'est au cours de la photosynthèse que se produisent le dégagement d'oxygène (O₂) et la synthèse des glucides suite à l'oxydation de l'eau (H₂O) et la réduction du dioxyde de carbone (CO₂) selon l'équation suivante (Whitmarsh et Govindjee, 1999) :



Cette réaction globale de la photosynthèse se déroule en deux phases complémentaires en fonction de leur dépendance à la lumière : une première phase appelée phase lumineuse et une deuxième appelée phase obscure (Figure 1.1). La phase lumineuse correspond à l'ensemble des réactions photochimiques au cours desquelles l'énergie lumineuse absorbée par la plante va générer un transfert d'électrons, via différents sites de la machinerie photosynthétique, ce qui aboutit à la production d'O₂ moléculaire et à la synthèse de l'énergie chimique sous forme de réserve d'adénosine triphosphate (ATP) et de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) nécessaires aux réactions de la phase sombre de la photosynthèse. Cette phase sombre, correspond à l'ensemble des réactions biochimiques, liées au cycle de Calvin-Benson, durant lesquelles l'ATP et le NADPH sont utilisés comme sources d'énergie pour la

fixation et la transformation du CO_2 en glucides par le cycle de Calvin-Benson appelé aussi réactions indépendantes de la lumière (Blankenship, 2002).

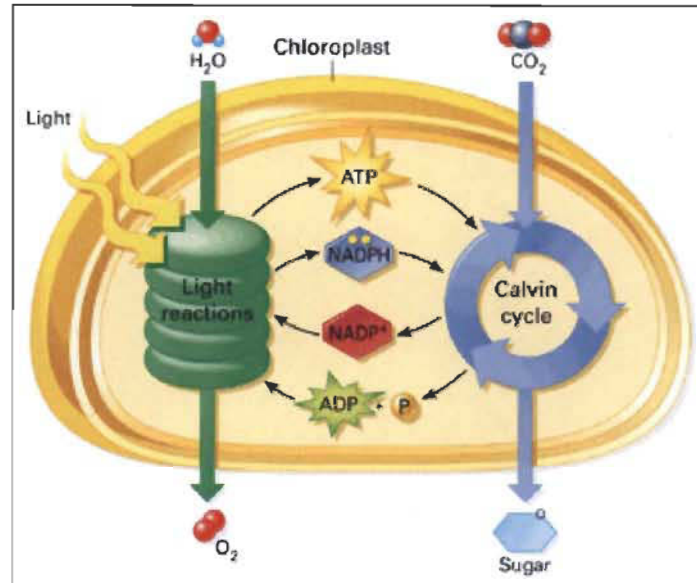


Figure 1.1 Représentation schématique des deux phases de la photosynthèse.

Source :

<http://www.phschool.com/iText/elife/site/text/chapter8/concept8.1.html>

1.1.2 Le chloroplaste : siège de la photosynthèse

L'ensemble des deux phases, lumineuse et sombre, se déroule dans un organite cellulaire spécialisé appelé chloroplaste se trouvant dans les cellules de mésophylle des feuilles (Figure 1.2A). Le chloroplaste est composé d'une double membrane lipidique qui sépare le stroma (la partie interne du chloroplaste) du cytoplasme cellulaire. C'est dans le stroma que se retrouvent les enzymes servant à la phase sombre de la photosynthèse. Le stroma contient également un réseau membranaire appelé thylakoïdes constitués d'un ensemble de vésicules aplaties qui peuvent s'empiler et former des grana (Mustardy et Garab, 2003). Les thylakoïdes non empilés forment les lamelles stromatiques reliant ainsi plusieurs grana. Chaque thylakoïde est formé par une membrane à double couche lipidique qui sépare l'espace interne du thylakoïde, appelé lumen, du stroma (Figure 1.2B et C).

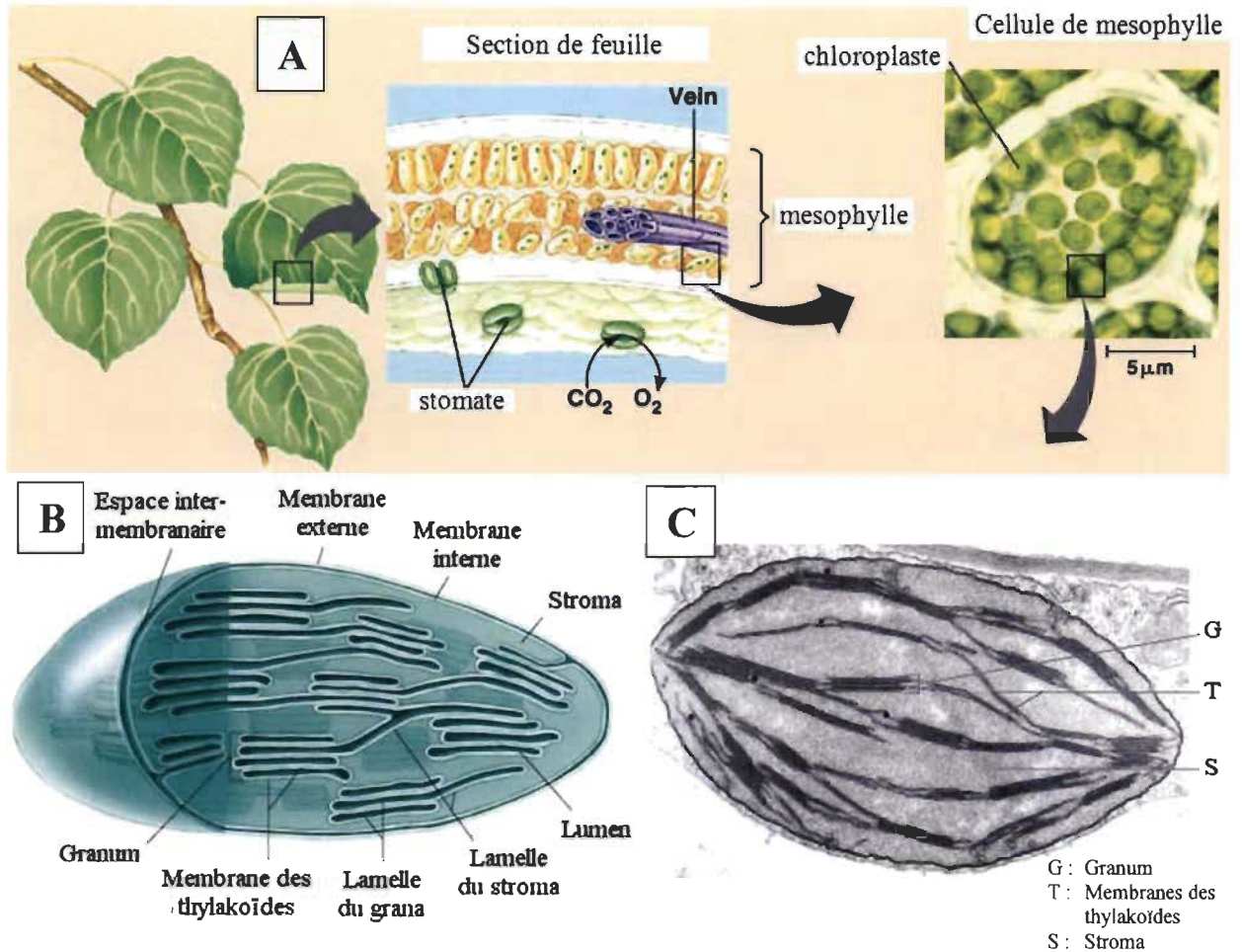


Figure 1.2 Section transversale d'une feuille (A) montrant les chloroplastes localisés dans la cellule de la mésophylle (d'après : Hopkins, 1999). Modèle (B) et photo en microscopie électronique (C) de la structure d'un chloroplaste des plantes et ses composants de base (d'après : Horton *et al.*, 2002).

Dans les membranes de thylakoïdes se trouvent différents complexes de pigments-protéines qui contribuent aux réactions de la phase lumineuse de la photosynthèse, appelées aussi réactions photochimiques, et au transport d'électrons photosynthétique (Figure 1.3) (Mustardy et Garab, 2003; Dekker et Boekema, 2005). On distingue :

- (i) Les antennes collectrices de lumière « Light Harvesting Complexes » (LHC) formées de pigments photosynthétiques liés à des protéines membranaires.
- (ii) Les centres réactionnels (CR) du photosystème II (PSII) et du photosystème I (PSI), dans lesquels se déroulent les réactions photochimiques.

- (iii) Les transporteurs d'électrons situés entre le PSII et le PSI, composés de plastoquinones (PQ), de cytochromes b_6/f (Cyt b_6/f) et de plastocyanines (PC).
- (iv) Le système enzymatique d'ATP synthétase (Malkin et Niyogi, 2000).

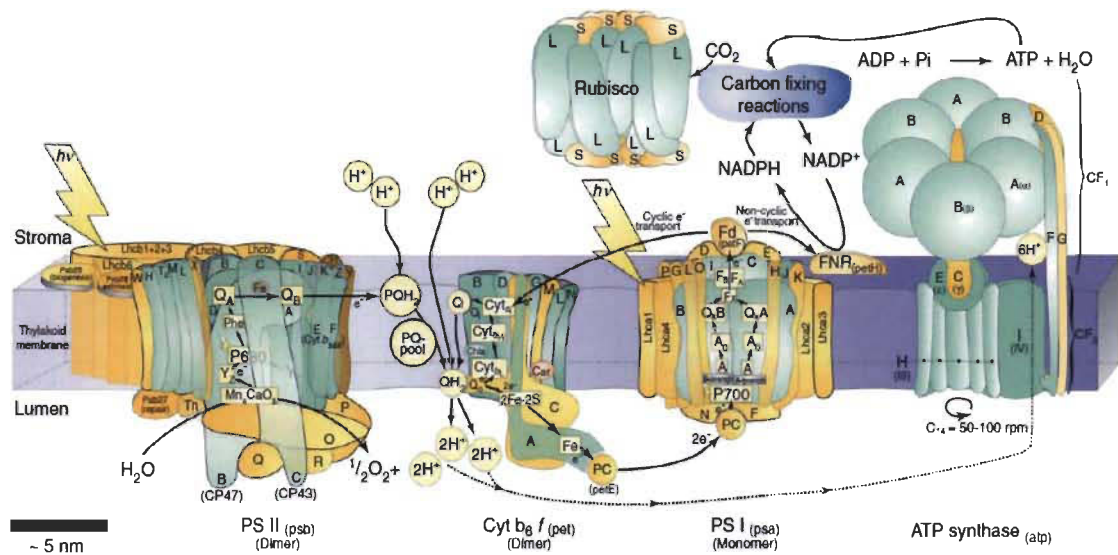


Figure 1.3 Modèle schématique de la disposition des différents complexes protéiques impliqués dans la chaîne de transfert d'électrons photosynthétique dans la membrane thylakoïdale d'*Arabidopsis thaliana* (d'après : Allen *et al.*, 2011).

Ces complexes de pigments-protéines ne sont pas distribués uniformément dans les membranes de thylakoïdes. En effet, les complexes du PSII (dimère) et leurs LHCI (oligomère) se situent en majorité dans le granum, alors que les PSI (monomère), les LHCI ainsi que l'ATP synthétase se situent dans les lamelles stromatiques et les régions marginales du granum (Anderson et Anderson, 1988). Il a été suggéré que la ségrégation entre le PSII et le PSI sert à éviter la capture de l'excitation par le PSI, qui est moins efficace pour la photosynthèse (Trissel et Wilhelm, 1993). Les Cyt b_6/f peuvent exister dans le granum ainsi que dans les lamelles stromatiques (Figure 1.4). Ces différentes structures sont organisées afin de permettre un fonctionnement efficace de l'appareil photosynthétique.

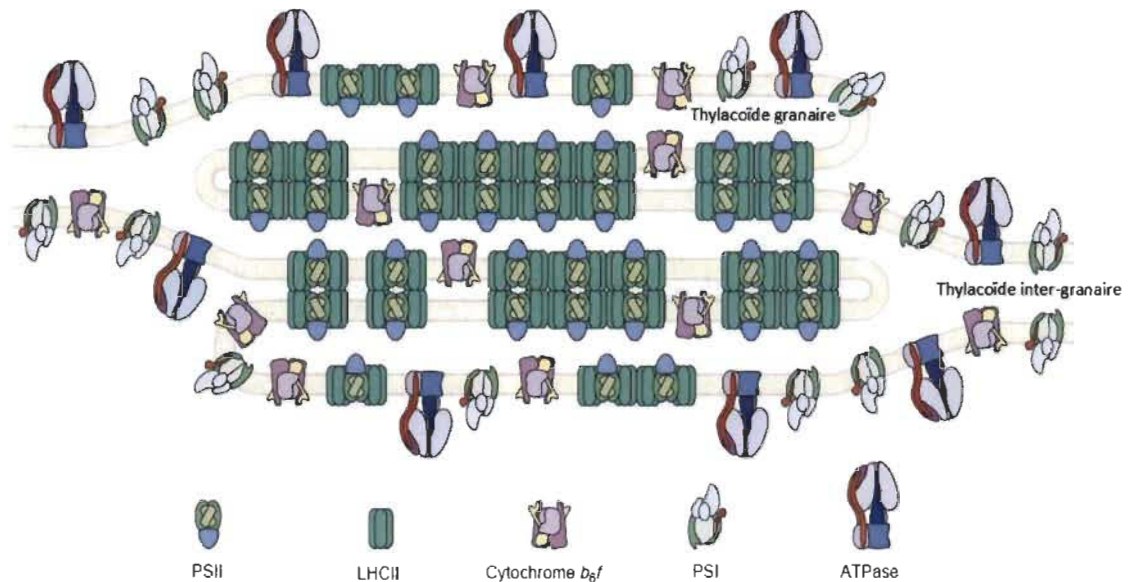


Figure 1.4 Représentation schématique de la répartition des complexes protéiques dans les membranes thylakoïdales (d'après : Allen et Forsberg, 2001).

Notons que dans le cadre du présent travail, c'est la phase lumineuse de la photosynthèse qui nous intéresse, ce qui nous mène à se focaliser particulièrement aux structures impliquées ainsi qu'aux différents évènements qui peuvent se produire durant cette phase.

1.1.3 Les pigments photosynthétiques et la lumière

L'énergie nécessaire pour les réactions photochimiques est fournie par la lumière, sous forme de photons, qui est absorbée par différents pigments photosynthétiques : les chlorophylles (Chl) *a* et *b* et les caroténoïdes (Figure 1.5) (Dekker et Boekema, 2005).

Les chlorophylles : Les deux types de Chl sont constitués d'un noyau tétrapyrrolique, avec un magnésium au centre, auquel est fixée une queue phytol à très longue chaîne de carbone (C20). L'absorption de la lumière par ces Chls est due à l'existence de doubles liaisons conjuguées.

Les caroténoïdes : Ce sont des molécules terpéniques à 40 carbones caractérisées par leurs longues chaînes carbonées à doubles liaisons conjuguées et constituées basiquement de 8 unités isoprène. Le β -carotène qui est un exemple de caroténoïde avec ses deux extrémités cyclisées.

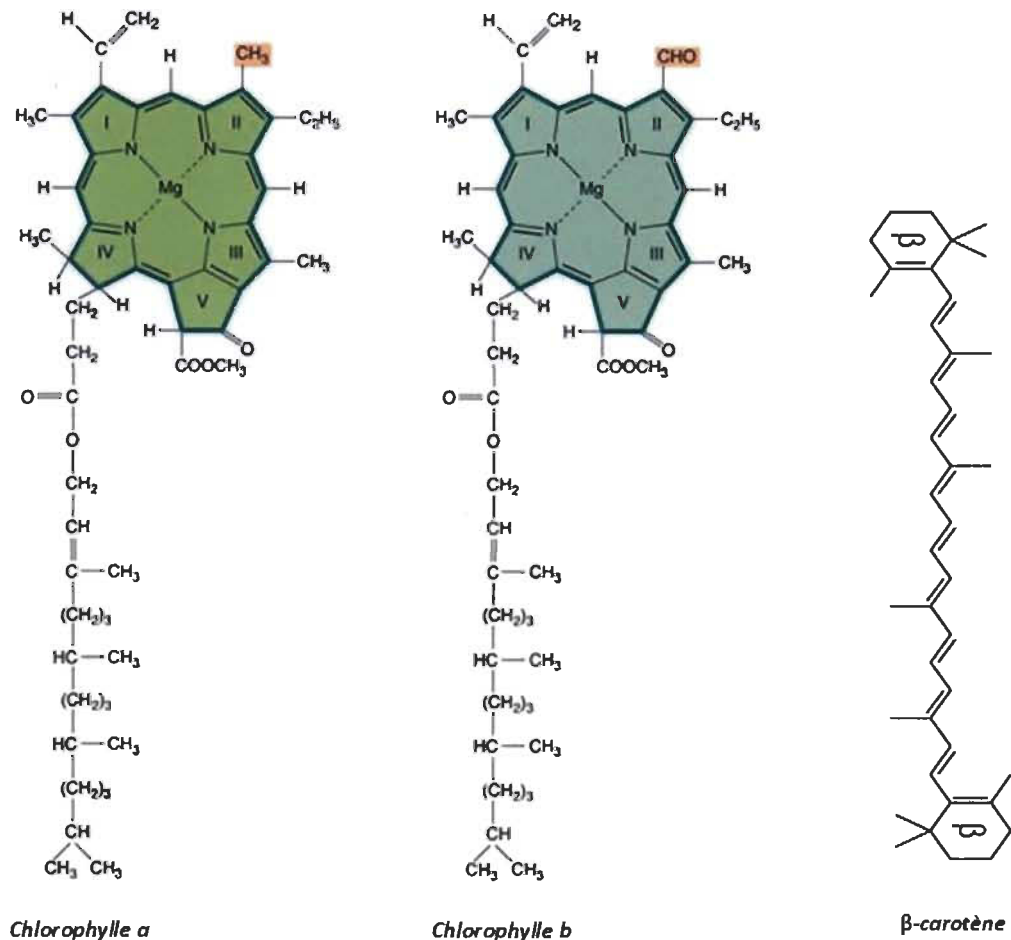


Figure 1.5 Structure des chlorophylles *a* et *b* et de β -carotène.

Les chlorophylles *a* et *b* diffèrent par les substituants des groupements pyrroles. I, II, III, IV : groupements pyrroles. V : cycle supplémentaire.

Ces trois types de pigments sont toujours présents, en association avec des protéines, dans les antennes collectrices de lumière (LHC) attachées aux PSI et PSII (Figure 1.3) (Heller *et al.*, 1998). Chaque type de ces pigments absorbe spécifiquement à certaines longueurs d'ondes du domaine du visible où il possède un maximum d'absorption pour une longueur d'onde donnée. Cette spécificité est due à la

configuration moléculaire de chaque pigment. Par conséquent, l'ensemble des spectres d'absorption de ces pigments couvre presque la totalité du spectre électromagnétique du domaine visible (400 - 700 nm) ce qui permet à l'appareil photosynthétique d'exploiter efficacement l'énergie lumineuse déjà absorbée (Figure 1.6).

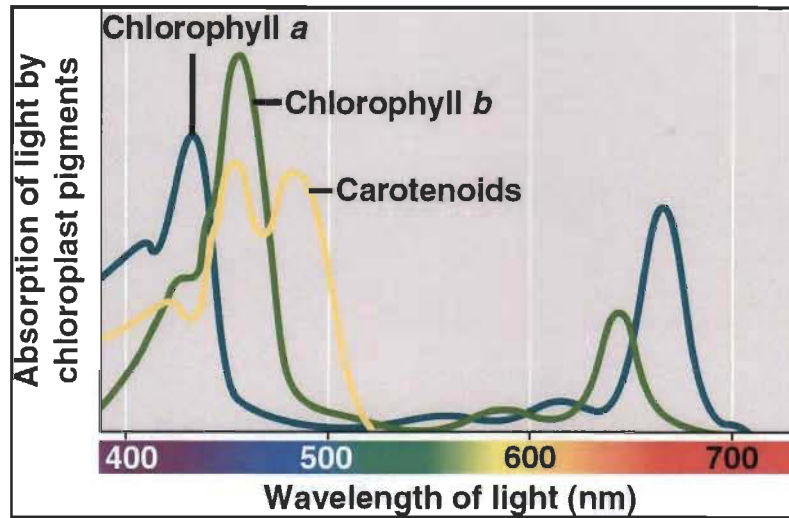


Figure 1.6 Spectre d'absorbance des pigments photosynthétiques (chlorophylles *a*, *b* et des caroténoïdes) chez les plantes supérieures (d'après : Raven *et al.*, 2000).

1.1.4 La chaîne photosynthétique : les principales structures impliquées dans la phase lumineuse

Chez les plantes supérieures, la membrane thylakoïdale renferme quatre types de complexes pigments-protéines responsables de l'absorption de la lumière et du transport d'électrons et de protons photosynthétiques au cours de la phase lumineuse (Dekker et Boekema, 2005). Ces complexes sont le PSII, le Cyt b_6/f , le PSI et l'ATP synthétase. Ils sont reliés par les composants mobiles qui sont le pool de PQ, la PC et la Fd.

1.1.4.1 Photosystème II (PSII)

Le PSII est un complexe membranaire multi-protéique, de poids moléculaire d'environ 650 kDa, qui utilise l'énergie lumineuse solaire pour oxyder l'eau et réduire les quinones (Najafpour et Govindjee, 2011).

Les structures cristallines de haute résolution obtenues sur le complexe de PSII ont permis d'identifier qu'il renferme au moins 25 sous-unités protéiques, des pigments et des cofacteurs nécessaires pour transférer les électrons, provenant de l'oxydation de l'eau, jusqu'à la PQ afin de la réduire en plastoquinol (PQH_2) (Rutherford, 1989; Ferreira *et al.*, 2004; Dekker et Boekema, 2005; Loll *et al.*, 2005; Barber, 2006; Nelson et Yocum, 2006; Enami *et al.*, 2008; Renger et Renger, 2008; Shen *et al.*, 2008; Sproviero *et al.*, 2008; Zouni *et al.*, 2008; Umena *et al.*, 2011). Le PSII est composé de trois grands domaines protéiques: les antennes collectrices de lumière, le CR et le complexe d'évolution d'oxygène (CEO) (Figure 1.7). Ces complexes forment des sous-unités fonctionnelles étroitement liées et essentielles pour un fonctionnement optimal du PSII (Szabo *et al.*, 2005).

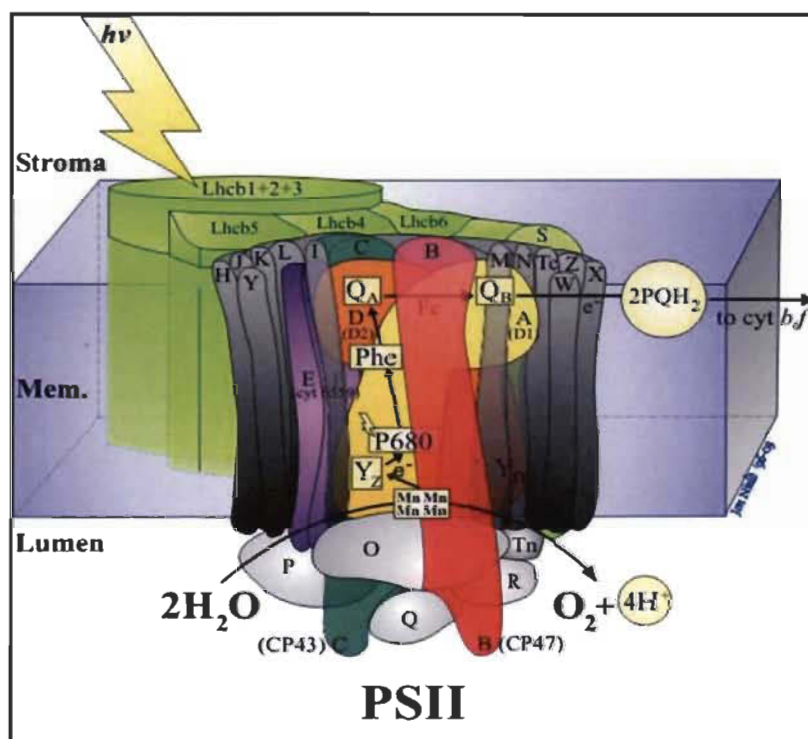


Figure 1.7 Représentation schématique de la structure du PSII et de ses principaux cofacteurs. Source : Jon Nield. Schéma basé sur les travaux de Ferreira *et al.* (2004) et Liu *et al.* (2004).
<http://www.photosynthesis.sbcs.qmul.ac.uk/nield/downloads.html>.

Les antennes collectrices de lumière

Les antennes collectrices de lumière absorbent l'énergie lumineuse et la transfèrent aux CR du PSII, où s'effectuent les réactions photochimiques. On distingue trois types d'antennes chez les plantes supérieures : une antenne périphérique (LHCII) formée de trimères associant des protéines Lhcb1, Lhcb2 et Lhcb3; une antenne interne, associée au CR, constituée des protéines CP43 (PsbC) et CP47 (PsbB) et une antenne, située entre LHCII et le CR, constituée de complexes pigments-protéines CP29 (Lhcb4), CP26 (Lhcb5) et CP24 (Lhcb6) (Figure 1.7) (Kamiya et Shen, 2003; Zouni *et al.*, 2008).

- Les antennes périphériques LHCII (Light Harvesting Complexes)

Les antennes périphériques sont constituées de complexes pigments-protéines désignés par LHCII (Light Harvesting Complexes) dont les pigments sont associés à des protéines ayant un poids moléculaire compris entre 24 et 29 kDa (Green et Dumford, 1996). Chacun de ces complexes est formé de protéines codées par le génome nucléaire appelé *Lhcb* regroupé en trois familles : *Lhcb1*, *Lhcb2* et *Lhcb3*. Ces protéines lient la Chl *a* et la Chl *b* ainsi que des molécules de caroténoïdes, comme la lutéine, la néoxanthine, la violaxanthine et la zéaxanthine (Figure 1.8) (Bassi *et al.*, 1997; Dekker et Boekema, 2005). La LHCII est considérée comme l'antenne majeure du PSII puisqu'elle contient entre 50 et 65 % de la quantité totale de la Chl (*a* et *b*) et le tiers du contenu total en protéines des membranes thylakoïdales (Thornber *et al.*, 1991). Du point de vue structural, ces protéines sont riches en hélices α (Liu *et al.*, 2004).

- Les antennes intermédiaires

Elles renferment les complexes pigments-protéines CP29, CP26 et CP24 codés par les gènes *Lhcb4*, *Lhcb5* et *Lhcb6*, respectivement. Ces antennes ne contiennent que 5 à 20 % de la Chl totale liée au PSII avec une quantité plus faible de Chl *b* en comparaison avec la LHCII (Barber et Kuhlbrandt, 1999). Ces complexes se situent entre la LHCII et le CR du PSII dont CP29 et CP26 sont attachés au CR alors que le CP24 est associé aux LHCII. Cette position leur permet de transférer l'énergie d'excitation du LHCII au CR via les antennes internes CP43 et CP47 (Figure 1.7) (Bassi *et al.*, 1997).

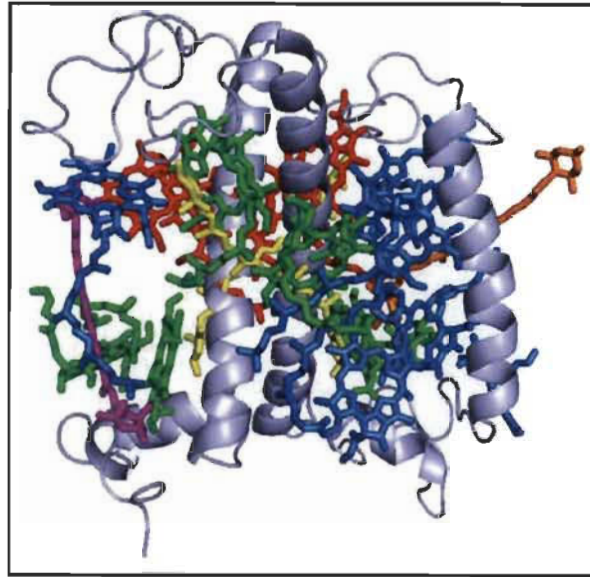


Figure 1.8 Structure cristalline de LHCII de l'épinard (d'après : Liu *et al.*, 2004).

La protéine est en bleu clair; Chl *a* en vert; Chl *b* en bleu; Chls 610-611-612 en rouge; lutéines en jaune; néoxanthine en orange et la violaxanthine en magenta.

- Les antennes internes

Elles sont constituées de deux protéines dites CP43 et CP47, codées par les gènes chloroplastiques *PsbC* et *PsbB*, respectivement. Ces protéines, riches en hélices α , sont liées à environ 40 à 50 molécules de Chl *a* et à une dizaine de molécules de β -carotène tandis que la Chl *b* est absente de ces antennes (Zheleva *et al.*, 1998; Barber et Kuhlbrandt, 1999; Liu *et al.*, 2004; Dekker et Boekema, 2005; Lucinski et Jackowski, 2006). CP43 et CP47 sont étroitement associées au CR du PSII (Figure 1.7). Cette liaison leur permet de transférer l'énergie lumineuse, à partir des antennes intermédiaires, vers la paire spéciale de Chl *a* (P680) (Barber *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2004; Barber, 2006; Ballottari *et al.*, 2012). La protéine CP47 est liée au polypeptide extrinsèque de 33 kDa (appelée PsbO) du CEO qui est impliquée dans la stabilisation du complexe de manganèse (Mn_4O_5Ca) (Green et Dumford, 1996).

Le centre réactionnel du photosystème II

Le centre réactionnel (CR) du PSII est un complexe protéique transmembranaire constitué de protéines intrinsèques insérées dans la membrane thylakoïdale et riches en hélices α (Hankamer *et al.*, 1997). Il est composé essentiellement d'un hétérodimère protéique constitué essentiellement de deux protéines majeures D1 et D2, codées par les deux gènes chloroplastiques *PsbA* et *PsbD*, respectivement. Les protéines D1 et D2 sont de poids moléculaire de 32 et 34 kDa, respectivement (Figure 1.7). Ces protéines exhibent une grande similitude entre elles comme la présence de cinq hélices α transmembranaires, mais ne sont pas identiques (Figure 1.9) (Bricker et Ghanotakis, 1996). Le rôle de D1 et D2 est d'assurer la stabilité des cofacteurs, nécessaires pour le transfert d'électrons au niveau du PSII, qu'elles contiennent, à savoir le complexe de Mn_4O_5Ca , la tyrosine Z (Tyr Z), la P680, la phéophytine (Phéo) et les deux plastoquinones Q_A et Q_B . De même, D1 et D2 sont liées aux sous-unités CP43 et CP47.

La protéine D1 renferme aussi le site d'oxydation de l'eau, qui est assuré par le CEO. Le CR contient également un homodimère de Chl *a* situé à l'interface des protéines D1 et D2 : c'est la paire spéciale de Chl *a* notée P680 qui joue un rôle primordial dans le processus de la séparation de charges. C'est à ce niveau que se passe la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique en termes d'électrons en initiant le transport d'électrons entre le PSII et le PSI (Dekker et Van Grondelle, 2000). Le P680 est le cœur du CR du PSII et possède une absorption maximale de la lumière à une longueur d'onde de 680 nm (Govindjee et Coleman, 1990).

Le complexe d'évolution d'oxygène (CEO)

Chez les plantes supérieures, le mécanisme d'oxydation de l'eau est assuré par un système enzymatique appelé complexe d'évolution d'oxygène (CEO) situé du côté du lumen du PSII près de D1. Le CEO est composé d'un complexe de manganèse (Mn_4O_5Ca) et de trois polypeptides extrinsèques PsbO, PsbP et PsbQ (De Las Rivas *et al.*, 2004; Roose *et al.*, 2007; Suorsa et Aro, 2007). La présence de ces polypeptides

est essentielle pour la stabilité et le fonctionnement adéquat du CEO et par conséquent du PSII.

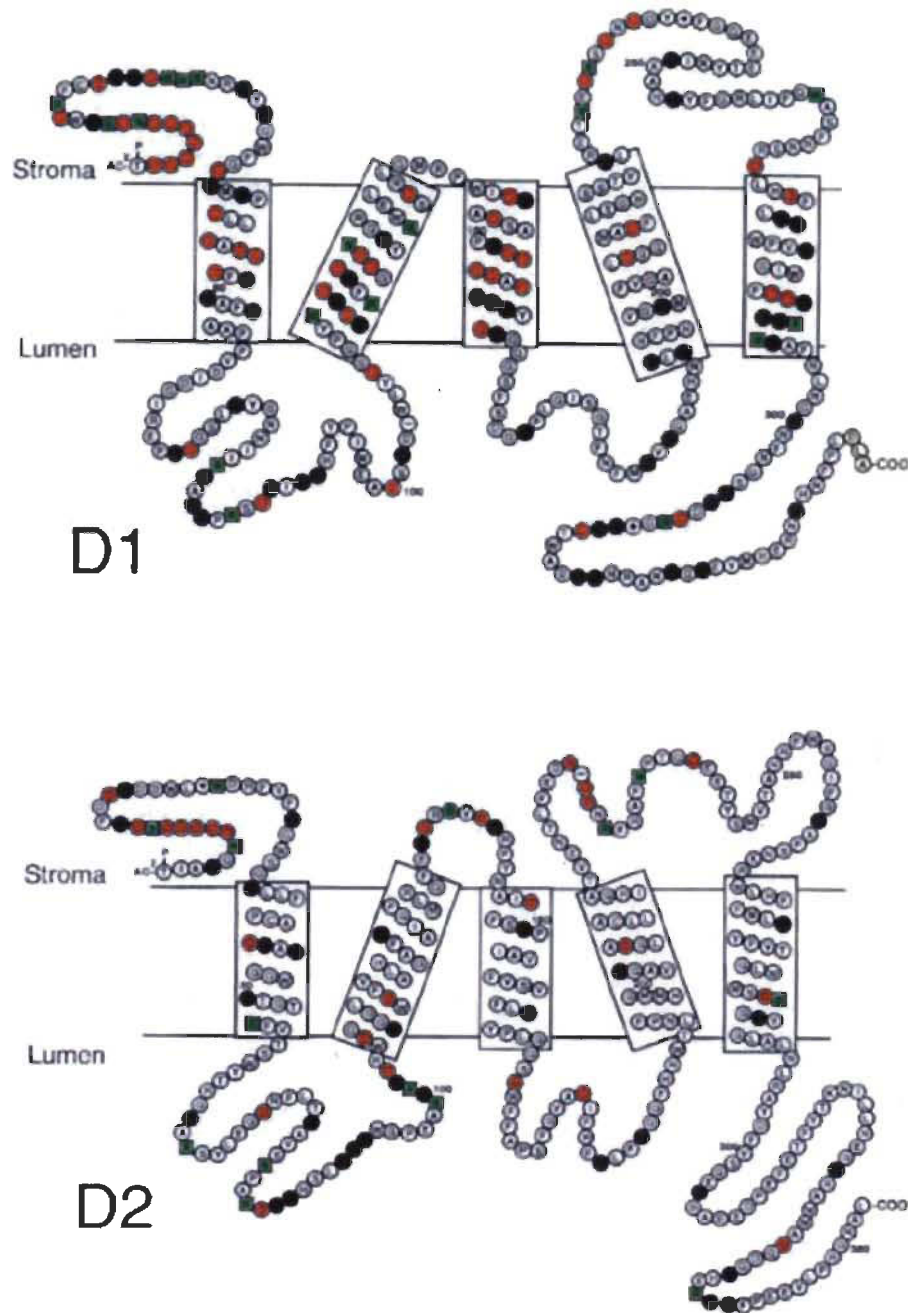


Figure 1.9 Modèles topologiques des protéines D1 et D2 et mise en évidence des acides aminés conservés (d'après : Bricker et Ghanotakis, 1996).

Les acides aminés conservés sont indiqués selon leur code à une lettre, les cercles rouges correspondent aux acides aminés non conservés, les cercles noirs aux résidus hydrophobes conservés et les carrés verts aux résidus hydrophiles conservés.

- Le complexe de Mn_4O_5Ca : site catalytique de l'oxydation de l'eau

Le complexe de Mn_4O_5Ca est considéré comme le site catalytique de l'oxydation de l'eau du CEO constitué par quatre atomes de manganèse (Mn), un atome de calcium (Ca^{2+}) et cinq atomes d'oxygène (O) (Kawakami *et al.*, 2011; Umena *et al.*, 2011). Il est également lié à deux atomes de chlore (Cl) qui sont aussi des cofacteurs indispensables pour la réaction d'oxydation de l'eau (Debus, 1992; Enami *et al.*, 2008; Renger et Renger, 2008; Shen *et al.*, 2008; Najafpour et Allakhverdiev, 2012; Najafpour *et al.*, 2012). La Figure 1.10 montre le modèle structural obtenu par cristallographie aux rayons X (Umena *et al.*, 2011). La structure cristalline du PSII récemment publiée à une résolution de 1.9 Å montre pour la première fois la présence de quatre molécules d'eau (W1 à W4) directement liées au complexe de Mn_4O_5Ca dont deux (W1 et W2) sont coordonnées au quatrième atome de manganèse (Mn4) et les deux autres (W3 et W4) sont coordonnées au Ca^{2+} , ce qui pourrait servir de substrats pour l'oxydation de l'eau et la formation du dioxygène (O_2) (Umena *et al.*, 2011). Ce complexe est logé dans une cavité de la protéine D1 limitée du côté de lumen par des protéines hydrophiles appelées protéines extrinsèques. Cet environnement protéique contrôle essentiellement le mouvement de protons et l'accès de l'eau. Il est même supposé que ces protéines extrinsèques jouent un rôle de barrière vis-à-vis du complexe de Mn_4O_5Ca , en particulier la protéine PsbO.

- Le complexe de Mn_4O_5Ca et les états S

La catalyse de l'oxydation de deux molécules d'eau générant une molécule d' O_2 , est une réaction à quatre électrons : $2H_2O \rightarrow 4H^+ + O_2 + 4e^-$. Afin de réaliser cette réaction, le complexe de Mn_4O_5Ca doit stocker quatre équivalents de charges positives en passant par un cycle à cinq états d'oxydation distincts suite à l'absorption successive de quatre photons avant d'oxyder le H_2O en O_2 .

C'est Joliot *et al.*, en 1969, qui ont mis en évidence que la photoproduction d' O_2 était périodique et que, à chaque quatre flashes lumineux, un pic de production d' O_2 était détecté. Il a été remarqué que les deux premiers flashes induisent une faible quantité

d'O₂, alors que le maximum du dégagement d'O₂ a été observé après le troisième flash (Figure 1.11).

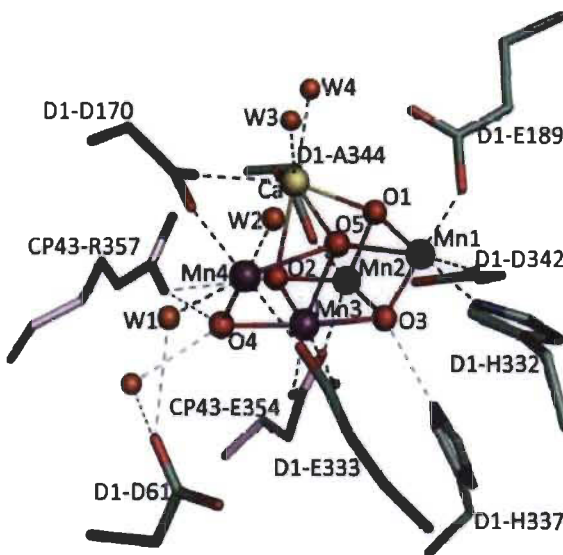


Figure 1.10 Structure du complexe de Mn₄O₅Ca et les ligands de son environnement (d'après : Umena *et al.*, 2011).

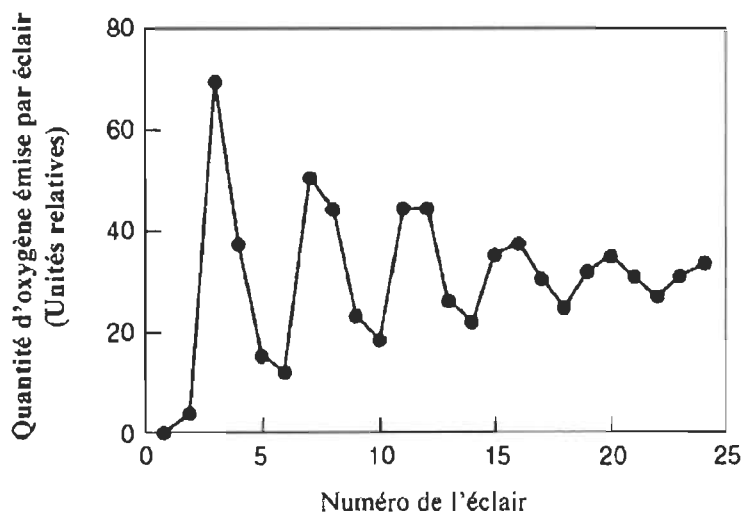


Figure 1.11 Dégagement de l'oxygène sous l'effet de flashes lumineux saturants (d'après : Joliot *et al.*, 1969).

En 1970, en interprétant les expériences de Joliot *et al.* (1969), Kok *et al.* ont montré que le complexe de Mn_4O_5Ca passe par cinq états d'oxydation consécutifs appelés S_n ($n = 0$ à 4). Chaque état S_n représente un état d'oxydation différent du complexe d'oxydation de l'eau. L'enzyme est ainsi capable de stocker quatre équivalents de charges positives, avant d'oxyder deux molécules de H_2O et dégager de l' O_2 . L'état S_1 est celui qui est le plus stable à l'obscurité. Le passage d'un état d'oxydation à l'autre est induit par l'absorption d'un photon et s'accompagne de la perte d'un électron. Lorsque le quatrième photon est absorbé, le complexe de Mn_4O_5Ca atteint l'état S_4 , instable, et devient capable d'oxyder deux molécules de H_2O en O_2 en revenant à l'état S_0 (Figure 1.12) (Debus, 1992; Miyass *et al.*, 2007).

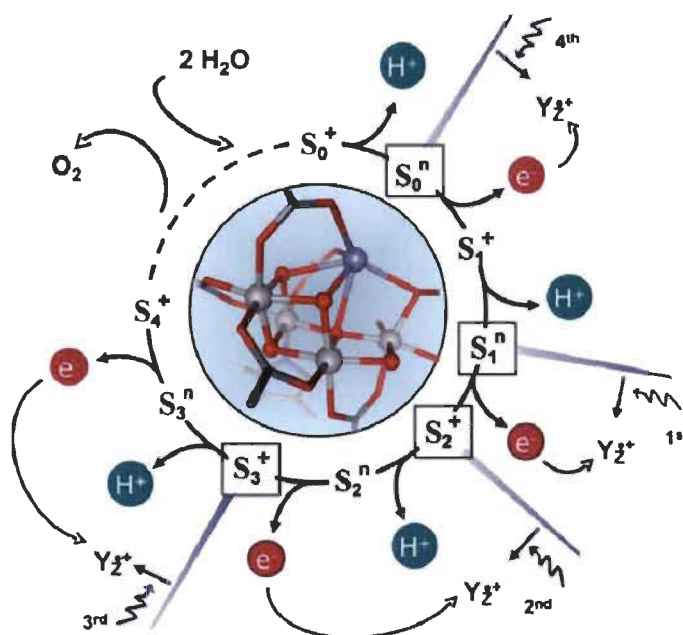


Figure 1.12 Représentation du cycle des états S selon le modèle de Kok *et al.* (1970).

- Les protéines extrinsèques

La protéine PsbO (33 kDa)

Cette protéine est présente chez tous les organismes photosynthétiques avec un poids moléculaire de 33 kDa (Popelková *et al.*, 2011). Elle est codée par le gène *PsbO* d'où son nom (Miyao et Murata, 1984; Enami *et al.*, 2008) (Figure 1.13). Elle est

considérée la protéine la plus importante du CEO dont elle permet essentiellement de stabiliser le complexe de Mn_4O_5Ca , tout en maintenant la liaison des ions Cl^- et Ca^{2+} au système de dégagement d' O_2 d'où le nom de « Manganese Stabilizing Protein » (Miyao et Murata, 1984; Heredia et De Las Rivas, 2003; De Las Rivas *et al.*, 2004; Popelková *et al.*, 2006). En effet, il a été rapporté que la dissociation de la protéine PsbO du PSII peut provoquer une déstabilisation au niveau du complexe de Mn_4O_5Ca allant jusqu'à la perte de deux à quatre atomes de Mn (Murata *et al.*, 1984; Bricker *et al.*, 1992). Elle permet également la stabilité des protéines CP47, CP43, D1 et 17 kDa au sein du complexe de PSII et limite l'accès des molécules d'eau au niveau du complexe de Mn_4O_5Ca (Gregor *et al.*, 2005; Yi *et al.*, 2005). De même, PsbO joue un rôle essentiel dans la stabilisation et la rétention des atomes de Mn et Cl^- (Bricker *et al.*, 2012). Récemment, il a été proposé que la protéine PsbO puisse avoir des canaux d'acheminement de l'eau du lumen vers le site catalytique et des canaux de dégagement de H^+ et d' O_2 (Murray et Barber, 2007).

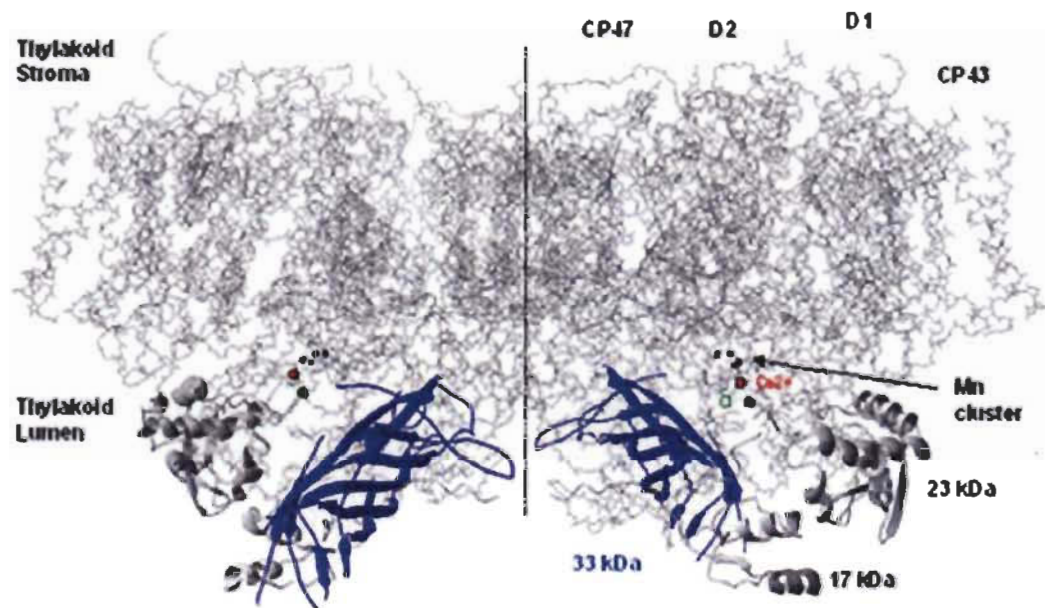


Figure 1.13 Structure cristalline des protéines extrinsèques de *Cyanobacterium T. elongatus* à 3.2 Å (d'après : Biesiadka *et al.*, 2004).

Les protéines PsbP et PsbQ

Les plantes supérieures ainsi que les algues vertes possèdent les protéines extrinsèques PsbP et PsbQ (Figure 1.13), alors que les cyanobactéries utilisent deux autres protéines extrinsèques homologues appelées PsbU et Psb V (Thornton *et al.*, 2004).

La protéine PsbP de poids moléculaire 23 kDa permet la stabilisation de la structure du CEO par la fixation des atomes de Ca^{2+} et Cl^- comme cofacteurs nécessaires pour l'activité du dégagement d' O_2 tout en protégeant le complexe de $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ des agents réducteurs exogènes (Seidler, 1996; Roose *et al.*, 2007). De même, la protéine PsbQ, de poids moléculaire 17 kDa, permet de stabiliser le CEO en absence des cofacteurs Ca^{2+} et Cl^- (Summerfield *et al.*, 2005). En effet, il a été démontré que PsbQ fixe l'ion Ca^{2+} puisque son altération spécifique par la chaleur va induire une dissociation de l'ion Ca^{2+} du complexe de $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ et donc une inhibition de la photolyse de l'eau (Barra *et al.*, 2005). Les protéines PsbP et PsbQ permettent également la liaison de plusieurs complexes de PSII, ce qui permet la formation de structures macromoléculaires des PSII et les empilements des grana des thylakoïdes (Suorsa et Aro, 2007). Il est important de noter que PsbP est une protéine formée essentiellement de feuilletts β alors que PsbQ renferme principalement les structures hélices α . Cependant, la protéine PsbO renferme toutes les structures avec une proportion élevée en feuilletts β (De Las Rivas *et al.*, 2004; Bricker et Burnap, 2005; De Las Rivas et Roman, 2005).

1.1.4.2 Photosystème I (PSI)

Le PSI est le deuxième photosystème intervenant dans les réactions lumineuses photosynthétiques chez les plantes dont il utilise la lumière pour le transport d'électrons depuis la PC vers la Fd. Le PSI est un complexe composé de 18 sous-unités protéiques, et d'environ 200 cofacteurs, majoritairement des molécules de Chl (173 chlorophylles), 15 β -carotènes, deux phylloquinones et trois centres fer-soufre (4Fe-4S) (Amunts *et al.*,

2010). Ce complexe est divisé en deux grandes unités fonctionnelles, l'antenne collectrice de lumière (LHCI) et le CR.

Le centre réactionnel du photosystème I

Le CR du PSI est composé de 15 sous-unités protéiques (PsaA à PsaL et PsaN à PsaP) dont le rôle des sous-unités protéiques PsaA à PsaN est connu, alors que les fonctions des deux autres sous-unités protéiques, PsaO et PsaP, ne sont pas encore identifiées et restent inconnues (Jordan *et al.*, 2001; Knoetzel *et al.*, 2002; Ben-Shem *et al.*, 2003; Khrouchtchova *et al.*, 2005; Amunts *et al.*, 2007).

Le CR du PSI est composé essentiellement de deux protéines hydrophobes appelées PsaA et PsaB contenant la majorité des cofacteurs de la chaîne de transport d'électrons : une paire spéciale de Chl *a* appelée P700 (un dimère de Chl *a* possédant un maximum d'absorption à 700 nm), A₀ (une molécule de Chl *a*), A₁ (une phylloquinone) et F_x (un centre de fer-soufre Fe₄-S₄). Ces deux protéines majeures, PsaA et PsaB, constituent un hétérodimère PsaA/B auquel une centaine de Chls et une vingtaine de β-carotène sont associées (Jordan *et al.*, 2001; Ben-Shem *et al.*, 2003; Amunts *et al.*, 2010). Trois autres protéines extrinsèques appelées PsaC, PsaD et PsaE sont liées aux protéines PsaA et PsaB du côté de stroma et sont impliquées dans le processus de transfert d'électrons du PSI à la Fd. En effet, la protéine PsaC renferme les centres fer-soufre F_A et F_B, la protéine PsaD constitue le point de rattachement de la Fd du côté du stroma et la protéine PsaE fixe la FNR du côté du stroma. Les autres sous-unités du CR participent aux autres fonctions du PSI, notamment les interactions avec la PC et la Fd (Figure 1.14) (Jensen *et al.*, 2007).

Du point de vue structural, il a été montré que les polypeptides transmembranaires intrinsèques du PSI sont riches en structures hélices α dont 11 hélices α transmembranaires sont incorporées dans les deux protéines majeures PsaA et PsaB (Fromme *et al.*, 2001; Jordan *et al.*, 2001). En outre, de grandes régions de boucles relient les hélices α et les structures de feuillet β. Cependant, les hélices α sont absentes dans les sous-unités PsaC, PsaD et PsaE (Fromme *et al.*, 2001).

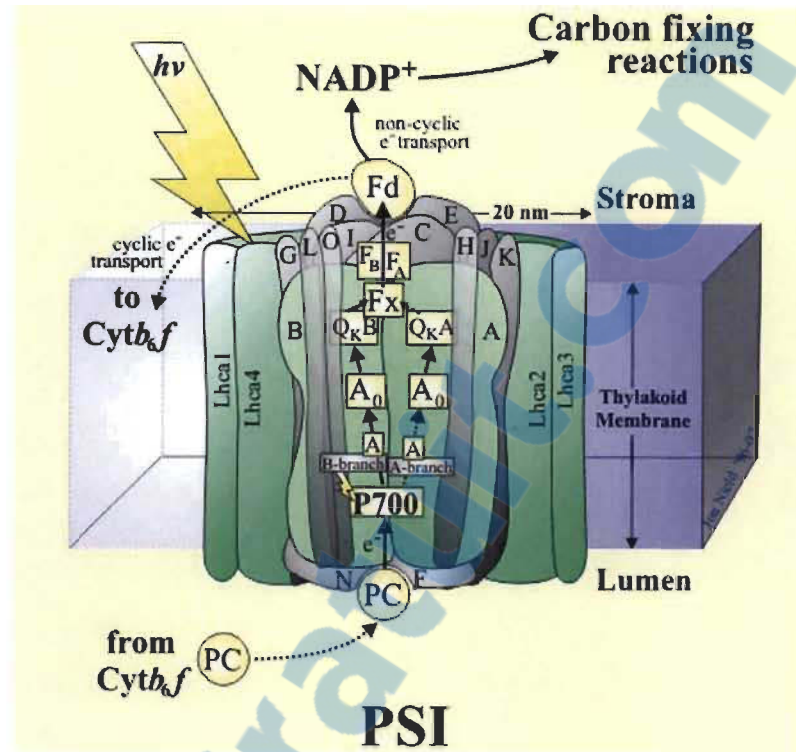


Figure 1.14 Représentation schématique de la structure du PSI et de ses principaux cofacteurs. Source : Jon Nield. Schéma basé sur les travaux d'Amunts *et al.* (2007).
<http://www.photosynthesis.sbcs.qmul.ac.uk/nield/downloads.html>.

Les antennes collectrices de lumière du photosystème I (LHCI)

Le rôle du complexe antennaire du PSI (LHCI) est de transférer l'énergie lumineuse captée par ses molécules de Chl vers le CR du PSI. LHCI est composé de quatre sous-unités protéiques, Lhca1 à Lhca4, entourant le CR du PSI et qui sont liées à des molécules de Chl *a* et *b*, et de caroténoïdes (Figure 1.15) (Castelletti *et al.*, 2003; Amunts *et al.*, 2010; Wientjes et Croce, 2011). Les LHCI sont composés de protéines transmembranaires riches en structures hélices α (Fromme *et al.*, 2001; Jordan *et al.*, 2001). Des études récentes ont montré que les Lhca1-4 sont réparties sous deux hétérodimères fonctionnels, Lhca1,4 et Lhca2,3 dont les propriétés biochimiques et spectroscopiques sont très semblables. Ces deux hétérodimères contiennent des formes particulières de Chl appelées « Chls rouges » (Wientjes et Croce, 2011). À la différence du LHCII, les LHCI, avec ses hétérodimères Lhca1,4 et Lhca2,3, contiennent très peu de Chl *b* et également un type de Chl particulier, appelé « Chl rouge » qui absorbe

préférentiellement la lumière au-delà de 700 nm et l'émet dans le rouge, avec un maximum autour de 730 nm à basse température. La nature de ces Chls spéciales reste encore non résolue, mais leur forme spectrale se retrouve dans la plupart des organismes photosynthétiques (Gobets *et al.*, 2001; Karapetyan *et al.*, 2006).

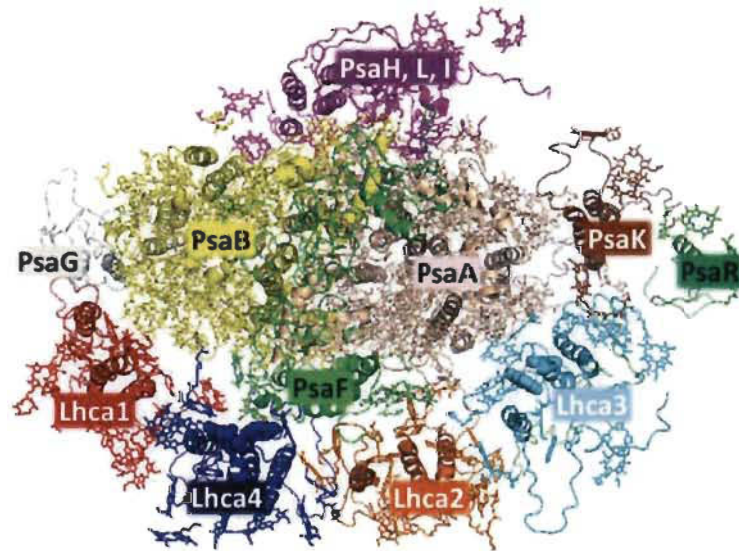


Figure 1.15 Modèle structural du complexe de PSI des plantes de pois montrant les dimères Lhca1,4 et Lhca2,3 du LHCI : vue de dessus du côté du stroma (d'après : Amunts *et al.*, 2010).

1.1.5 Le transport photosynthétique d'électrons au niveau de la membrane thylakoïdale : le schéma en Z

Lorsqu'un pigment photosynthétique, au niveau des antennes collectrices de lumière, absorbe un photon lumineux, il passe rapidement d'un état fondamental à un état excité, possédant un plus haut niveau d'énergie. L'énergie de cette molécule de Chl excitée est transférée à une molécule voisine. Ce processus de transfert d'énergie continue d'une molécule à une autre jusqu'à atteindre le CR du photosystème (Figure 1.16).

Dans le cas du PSII, lorsque la paire spéciale de Chl *a* (P680) reçoit cette énergie lumineuse en provenance des antennes, elle devient excitée sous la forme P680*. C'est à ce niveau que se passe un évènement particulier qui est la transformation de l'énergie

lumineuse en énergie chimique sous forme d'électrons. Le P680* transfère un électron à une molécule voisine, la Phéo : c'est l'étape initiale du transport d'électrons entre le PSII et le PSI appelée séparation de charge (Bricker et Ghanotakis, 1996). Par la suite, le P680* passe à la forme oxydée P680⁺. Cette perte d'électron du P680* sera comblée par l'apport d'un électron provenant de la Tyr Z afin de re-réduire le P680⁺. Cette dernière passe à l'état oxydé Tyr Z⁺ qui à son tour est réduite par un électron du complexe de Mn₄O₅Ca. Ce dernier, le complexe de Mn₄O₅Ca, fonctionne comme donneur d'électrons du P680 via la Tyr Z et passe par cinq niveaux redox pendant son cycle catalytique. Le passage des états S₀ à S₄, correspondant à la perte de quatre électrons, est induit par les réactions photochimiques (oxydation du complexe de Mn₄O₅Ca par la Tyr Z⁺). Le niveau S₄ une fois atteint, le complexe d'oxydation de l'eau revient au niveau S₀ en prélevant quatre électrons sur deux molécules de H₂O, libérant une molécule d'O₂ et quatre H⁺ dans le lumen (Figure 1.17).

Suite à la séparation de charges, l'électron préalablement accepté par la Phéo est transféré à la quinone Q_A qui est fixée à son site de liaison sur la sous-unité D2 du PSII. Une fois la Q_A réduite, l'électron est transféré à la quinone Q_B qui possède un site de liaison à la sous-unité D1 du PSII. Par la suite, un deuxième électron, provenant d'une deuxième séparation de charges du P680, fera le même trajet pour former l'intermédiaire Q_B²⁻ qui est alors complètement réduite. La Q_B a la propriété d'être plus stable, elle peut donc accepter deux électrons avant sa protonation par deux protons H⁺ provenant du stroma formant ainsi le PQH₂. Le PQH₂ peut diffuser dans la membrane du thylakoïde, laissant la place libre sur la protéine D1 pour une nouvelle Q_B. Ainsi, les PQH₂ s'accumulent dans la membrane et forment le pool de PQH₂. Les molécules de PQH₂ diffusent vers le complexe du Cyt b₆/f où elles vont transférer leurs électrons. Le transfert d'électrons par le pool de PQH₂ contribue donc à la formation du gradient de protons transmembranaire: pour chaque électron transféré, un proton H⁺ est transporté à travers la membrane. Les électrons passent ensuite du Cyt b₆/f au PSI via la PC. Tous ces cofacteurs de transport d'électrons depuis la Phéo forment ce qu'on appelle le côté accepteur du PSII (Figure 1.17).

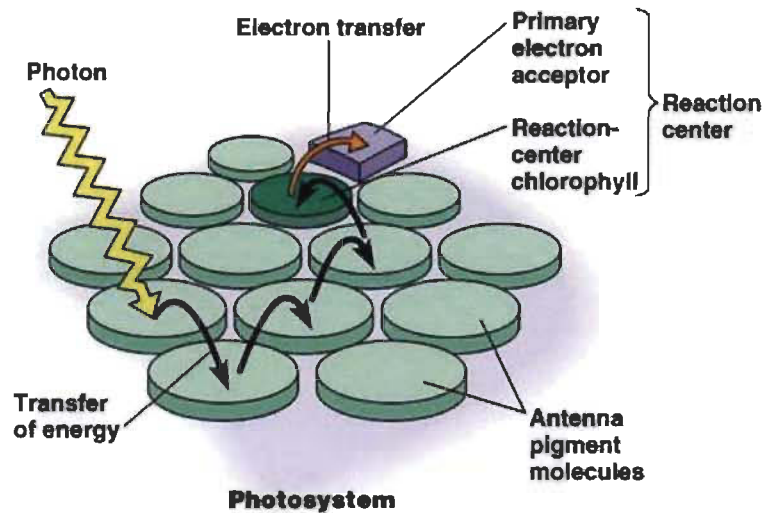


Figure 1.16 Transfert de l'énergie lumineuse absorbée par les antennes collectrices de lumière jusqu'au CR du photosystème (d'après : Raven *et al.*, 2000).

Dans le cas du PSI, une fois reçue l'énergie lumineuse déjà absorbée par LHCI, le P700 passe à l'état excité P700*. À ce niveau, la séparation de charges se fait entre le P700* (le donneur primaire d'électrons) et une molécule de Chl *a*, notée A₀ considérée comme l'accepteur primaire d'électrons. En libérant un électron, le P700* passe à l'état oxydé (P700⁺). Le P700⁺ formé va ensuite récupérer un électron provenant de la PC, un transporteur mobile et donneur d'électrons du P700, qui se rattache à la protéine PsaF du PSI du côté du lumen (Jordan *et al.*, 2001; Ke, 2001; Jensen *et al.*, 2007). Les électrons reçus par la phylloquinone, A₁, sont ensuite transférés à la Fd en passant par les centres fer-soufre représentés par F_x, F_A et F_B (Figure 1.17) (Malkin et Niyogi, 2000). La réduction de l'accepteur terminal d'électrons le NADP⁺ en NADPH, est catalysée par la FNR (Figure 1.17).

Notons que pour les deux photosystèmes I et II, les étapes du transfert d'électrons mènent à des niveaux énergétiques toujours plus bas, réduisant graduellement la probabilité d'une recombinaison de charges.

D'un autre côté, l'ATP synthétase utilise l'énergie du gradient de protons généré par le PSII et le Cyt b₆/f pour libérer l'ATP synthétisé sur ses sites catalytiques. Ainsi,

l'énergie chimique générée par la photosynthèse est emmagasinée sous forme de molécules d'ATP et de NADPH fournissant l'énergie nécessaire à l'assimilation de CO_2 et la synthèse des glucides pendant les réactions du cycle de Calvin-Benson (Heber *et al.*, 1986; Foyer *et al.*, 1992; Raines, 2003).

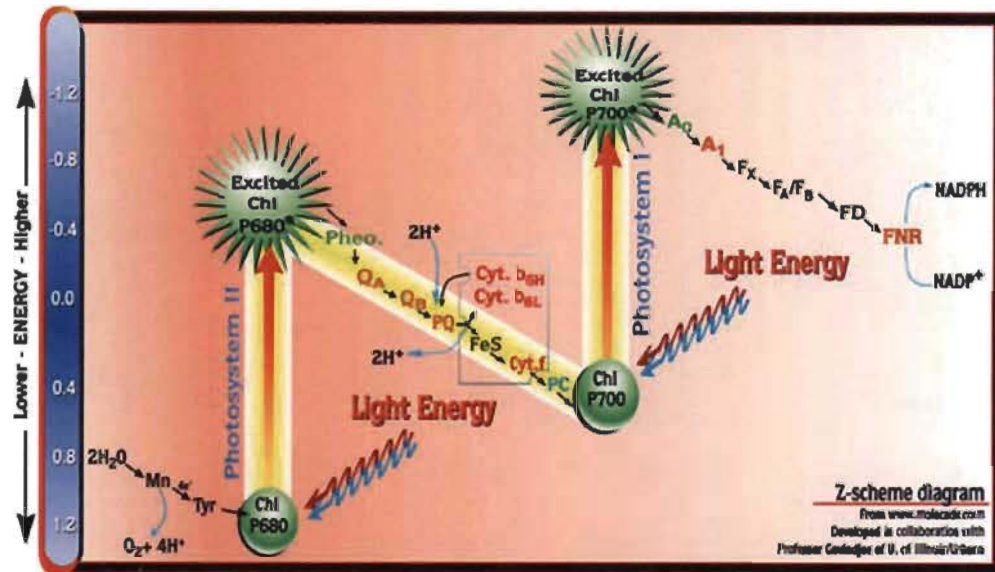


Figure 1.17 Schéma en Z des réactions de transfert d'électrons photosynthétique au niveau de la membrane thylakoïdale. Source : Wilbert Veit et Govindjee, (2000).

<http://www.life.illinois.edu/govindjee/ZSchemeG.html>

1.1.6 Les différentes voies de dissipation d'énergie

Les systèmes d'antennes des photosystèmes possèdent la faculté d'absorber l'énergie lumineuse du spectre visible (400 à 700 nm). L'absorption de l'énergie lumineuse par les antennes collectrices de lumière des PSI et PSII induit le passage des molécules de l'état énergétique fondamental (S_0), ayant un faible niveau d'énergie, à un état excité qui a un niveau d'énergie plus élevé. Dans le cas de la Chl possédant deux bandes principales d'absorption de photons, on peut distinguer deux niveaux d'énergie d'état singulet excité ($^1\text{Chl}^*$). Le premier se forme par absorption de la lumière rouge (état singulet S_1) et le deuxième par celle de la lumière bleue (état singulet S_2) (Buchanan *et al.*, 2000). Par ailleurs, chaque niveau d'excitation comprend plusieurs sous-niveaux vibrationnels. Les molécules déjà excitées ont toujours une tendance à

retourner à leur état stable ou fondamental (S_0). Pour ce faire, il existe plusieurs voies possibles de dissipation de l'énergie, en compétition les unes avec les autres où le processus dominant sera le plus rapide (Figure 1.18).

Cette énergie peut être utilisée dans les processus photochimiques, où s'effectue la transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique d'où le nom de « quenching photochimique » (QP). Dans ce cas, l'énergie d'excitation, générée par les photons absorbés, est transférée aléatoirement au niveau des antennes collectrices de lumière, d'un pigment à l'autre jusqu'à atteindre la paire spéciale de la Chl *a* du CR du photosystème : le P680 et P700 dans le cas du PSII et PSI, respectivement (Figure 1.17). C'est dans ce type de dimère de Chl *a* que s'effectue le processus de séparation de charges initiant le transport d'électrons photosynthétique au cours de la phase photochimique (voir sous-section 1.1.5).

Lorsque cette énergie ne peut pas être dissipée par le CR sous forme de photochimie, elle va être dissipée par des voies connexes permettant ainsi de conserver les molécules de Chl à un état stable. Elle peut être réémise sous forme de fluorescence, comme elle peut être aussi dissipée sous forme de chaleur. Dans ce dernier cas, la fluorescence et la photochimie seront réduites au profit de la dissipation thermique, on parle alors de « quenching non photochimique » (NPQ) (Kramer *et al.*, 2004). Notant que ces voies de dissipation de l'énergie sont interreliées, ainsi si l'une de ces voies diminue cela entraîne un changement participatif des autres voies. En effet, ces processus se produisent en concurrence, tel que n'importe quelle augmentation de l'efficacité de l'une aura comme conséquence une diminution du rendement des deux autres (Strasser et Butler, 1977).

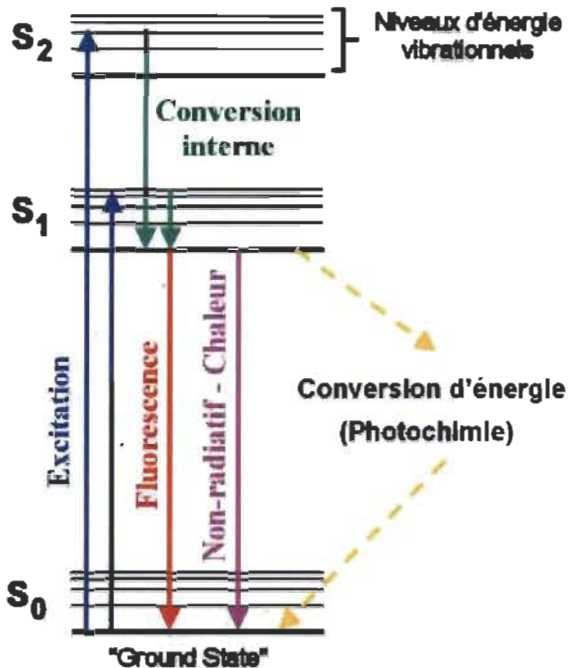


Figure 1.18 Diagramme de Jablonski simplifié de l'absorption d'énergie et des principales voies de dissipation d'énergie en photosynthèse.

1.1.6.1 La fluorescence

La fluorescence est une émission naturelle qui traduit la capacité de certains pigments à réémettre de la lumière à certaines longueurs d'onde particulières par le processus inverse de l'absorption. La fluorescence est très utilisée dans le domaine de la biologie comme outil d'analyse non invasif, notamment depuis la découverte de molécules fluorescentes. Dans le cas des plantes, cette technique est d'autant plus intéressante que les feuilles contiennent naturellement des molécules fluorescentes que l'on appelle les fluorophores. Nous nous intéressons dans cette étude à la fluorescence chlorophyllienne (630 - 800 nm). Bien qu'elle ne représente que 3 % de l'énergie totale, elle fournit d'importantes informations sur le fonctionnement de l'appareil photosynthétique et notamment celle de la phase lumineuse de la photosynthèse à travers l'étude des réactions photochimiques et du transport d'électrons.

L'émission de fluorescence chlorophyllienne provient essentiellement de la Chl *a* appartenant à l'antenne collectrice de lumière du PSII. La majeure partie de la

fluorescence (approximativement 90 %) à la température ambiante est originaire des antennes du PSII (Krause et Weis, 1991; Govindjee, 2004). Cependant, l'émission de la fluorescence par le PSI est faible comparativement et ne représente au plus que 10 % de l'émission totale. De plus, l'émission de fluorescence venant du PSII est variable avec le changement dans la photochimie tandis que celle qui vient du PSI ne l'est pas. En 1931, une augmentation de la fluorescence lors du transfert de la feuille de l'obscurité à la lumière est décrite (effet Kautsky): à la lumière, les accepteurs d'électrons du PSII (quinones) sont rapidement réduits, induisant une fermeture des CR et conduisant à une diminution du rendement de la photochimie et donc à une augmentation rapide de la fluorescence qui atteint un maximum pendant une période de l'ordre de la seconde avant de relaxer lentement (Kautsky et Hirsch, 1931). Un CR est dit ouvert quand les accepteurs situés en aval dans la chaîne de transport d'électrons sont disponibles, en particulier les quinones Q_A . Quand ces accepteurs sont tous réduits, ils ne sont plus disponibles pour prendre en charge les électrons détachés au niveau du CR, qui est alors dit fermé.

En effet, lorsqu'une molécule de Chl capte un photon, elle passe d'un état stable à un état instable (niveau de haute énergie d'excitation). Pour retourner à un niveau d'énergie plus faible (état plus stable), cette molécule de Chl excitée peut soit transférer son énergie d'excitation à une molécule de Chl voisine qui devient excitée à son tour et ainsi de suite jusqu'au CR, soit dissiper cette énergie sous forme de chaleur ou émettre un photon sous forme de fluorescence (contribuant à la fluorescence de base, F_0). La dissipation de l'énergie par la fluorescence sera donc amplifiée puisqu'elle n'est pas utilisée pour la photochimie, cela correspond à la fluorescence variable (F_v). La fluorescence variable (F_v) dépend de l'état d'oxydoréduction des accepteurs primaires du PSII, elle est donc dépendante de la capacité photochimique du PSII. Par conséquent, lorsque l'appareil photosynthétique est exposé à une lumière d'intensité saturante, les Q_A sont dans un état réduit et induira la dissipation d'énergie par la fluorescence à un niveau maximal F_m .

C'est à partir de ces paramètres que les chercheurs ont abouti à calculer le rendement photochimique maximal de fluorescence (F_v/F_m). Ce paramètre est variable et c'est à partir de ces variations que l'on peut extraire une information sur la capacité du système photosynthétique à convertir l'énergie. Ce rendement ainsi que d'autres paramètres de fluorescence pourraient être utilisés en pratique afin de détecter suffisamment à l'avance le début de stress avant même que la détérioration de la Chl et l'apparition des premiers signes visibles ne s'opèrent chez les végétaux (Zarco-Tejada *et al.*, 2002).

Deux autres émissions lumineuses peuvent avoir lieu dans la molécule de Chl :

La phosphorescence qui est une émission à une longueur d'onde légèrement supérieure à celle de la fluorescence. Elle se produit après un transfert inter-système d'énergie vibrationnelle vers un état triplet dont le temps de vie est beaucoup plus grand.

La luminescence est observée à l'obscurité, il s'agit d'une émission similaire à la fluorescence, mais l'excitation des états singulets est produite à partir de la recombinaison des charges entre le côté donneur et le côté accepteur d'électrons du PSII.

1.1.6.2 La chaleur

Dans la plupart des cas, la fluorescence et la photochimie seront réduites au profit de la dissipation thermique, on parle alors de « quenching non photochimique » de la fluorescence (NPQ). Le NPQ peut être classé sous trois types : le « quenching de haute énergie (qE) », le « quenching dû à la transition d'états (qT) », et le « quenching dû à la photoinhibition (qI) ».

Le quenching de haute énergie (qE)

C'est la composante majoritaire du NPQ qui dépend du gradient de protons ΔpH . Il permet la dissipation de l'excès d'énergie lumineuse reçue par la plante sous forme de chaleur à travers le cycle des xanthophylles. Les xanthophylles impliquées dans ce processus sont associées à l'antenne LHCI du PSII. Ce mécanisme est engendré par un

faible pH dans le lumen, suite à une activité accrue du PSII, entraînant ainsi une protonation des LHCII et une activation d'une déépoxydase, capable de convertir la violaxanthine des LHCII en zéaxanthine (appelé cycle des xanthophylles), provoquant un changement de conformation des antennes. Ces modifications de structure ont pour conséquence une augmentation de la dissipation de l'énergie par voie thermique (Figure 1.19) (Gilmore, 1997).

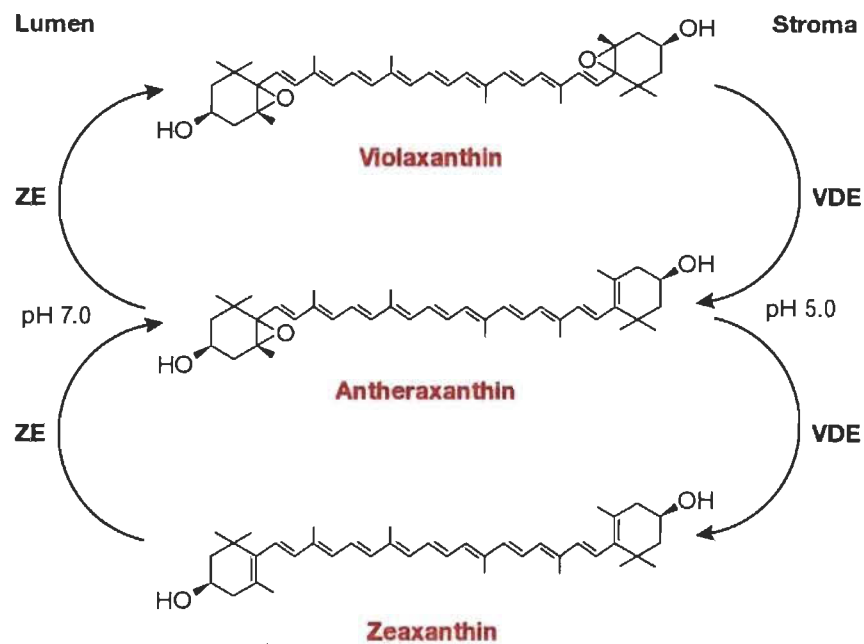


Figure 1.19 Cycle des xanthophylles se déroulant chez les plantes.

Le quenching dû à la transition d'états (qT)

Une partie des LHCII est mobile et elle peut se détacher du PSII et migrer dans la membrane de thylakoïde vers le PSI conduisant à une transition d'un état 1 (LHCII au PSII) à un état 2 (LHCII au PSI). Cette migration est appelée transition d'état (qT) (Allen, 1992; Wollman, 2001) et elle permet une redistribution de l'énergie lumineuse entre les deux photosystèmes et une diminution de l'absorption d'énergie lumineuse par le PSII. La mobilité des LHCII dépend de leur état de phosphorylation, contrôlée par une kinase. L'activité de celle-ci dépend du niveau d'oxydo-réduction de la chaîne de transfert d'électrons. En effet, la forte réduction du pool de PQ active les protéines

kinases entraînant la phosphorylation des LHCII qui perd alors son affinité pour le PSII et s'en détache pour migrer vers le PSI (état 2). Le retour des LHCII vers le PSII (état 1) est initié par l'activation des phosphatases suite à l'oxydation du pool de PQ (Figure 1.20) (Tikkanen *et al.*, 2006).

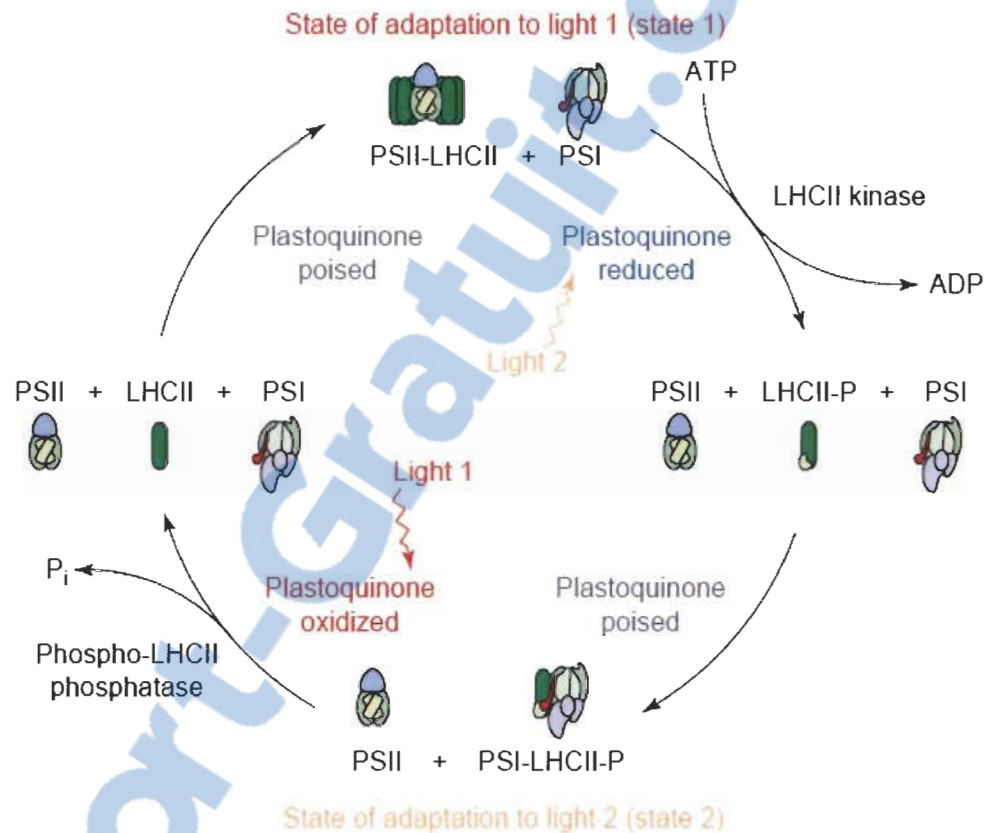


Figure 1.20 Migration de l'antenne LHCII phosphorylée du PSII vers PSI et son retour du PSI vers PSII (d'après : Allen et Forsberg, 2001).

État 1 : LHCII non phosphorylée, associée au PSII. État 2 : LHCII phosphorylée associée au PSI.

Le quenching dû à la photoinhibition (qI)

C'est une voie dissipative thermique associée aux dommages importants de l'appareil photosynthétique induit par la dégradation des protéines du PSII et en particulier la protéine D1 qui constitue, en association avec la protéine D2, le cœur du CR du PSII (Müller *et al.*, 2001). Au-delà d'une quantité critique de lumière absorbée par le PSII, la dégradation de la protéine D1 est plus rapide que son remplacement,

ce qui induit une accumulation de PSII inactifs. C'est principalement la disparition de cette protéine D1 sous forte lumière qui est la cause principale de la photoinhibition. C'est dans le cas d'une exposition prolongée d'une intensité lumineuse trop forte que la photoinhibition devient irréversible engendrant la fermeture et/ou la destruction des CR de PSII ainsi que la dégradation des Chls qui seront à l'origine de la baisse de fluorescence, d'où le nom « quenching dû à la photoinhibition » (Alves *et al.*, 2002).

1.2 Effets de la toxicité des métaux : l'aluminium, un exemple d'étude

La présence des polluants dans l'environnement tel que les métaux constitue une grande menace pour les écosystèmes dont certains peuvent être très toxiques pour les organismes vivants (Walker *et al.*, 1996). Les métaux sont présents naturellement dans les roches, les sols et l'eau. Ils sont également libérés principalement dans l'environnement par l'activité humaine et par l'érosion. Certains de ces métaux sont considérés essentiels tels que le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le fer (Fe), le magnésium (Mg) et le manganèse (Mn) qui sont requis, en concentrations traces, pour différents processus métaboliques à savoir l'activité de plusieurs enzymes comme cofacteurs. Toutefois, à de fortes concentrations, ils deviennent toxiques. Cependant, d'autres métaux comme l'aluminium (Al), le cadmium (Cd), le mercure (Hg) et le plomb (Pb) ne sont pas essentiels au métabolisme cellulaire et sont toxiques (Rai *et al.*, 1991; Raven *et al.*, 1999). Ils se retrouvent dans l'environnement sous différents états d'oxydation qui sont directement liés à leur degré de toxicité (Pinto *et al.*, 2003).

Il a été rapporté qu'à des concentrations toxiques, les métaux peuvent affecter la photosynthèse, qui est un processus important dans la croissance et le développement des plantes (Walker *et al.*, 1996). Les métaux exercent plusieurs effets inhibiteurs sur la photosynthèse à plusieurs niveaux structuraux et métaboliques (Bertrand et Poirier, 2005). Un tel dysfonctionnement des processus photosynthétiques, induit par la toxicité des métaux, peut avoir un impact néfaste pour la biosphère puisque la photosynthèse représente le principal producteur de matière organique nécessaire pour la survie des autres organismes des niveaux trophiques supérieurs des écosystèmes.

De ce fait, la pollution des écosystèmes par les métaux a pris un grand intérêt sur les plans environnemental et scientifique. Parmi ces métaux, l'Al a suscité une attention particulière, en raison de sa diffusion et de sa toxicité dans l'environnement.

À l'échelle du monde végétal, au niveau physiologique, biochimique et cellulaire, les effets de l'Al ont été l'objet de recherche, principalement à cause des problèmes d'acidification des sols. Dans ce type de sols acides, l'Al peut être soluble et il possède alors une forte activité biocide principalement sous la forme Al^{3+} . Il peut s'accumuler dans les plantes qui sont parmi les premiers organismes susceptibles d'être affectés par les polluants en affectant particulièrement la photosynthèse (Moustakas *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2012). Il peut donc être consommé par l'homme et les animaux et provoquer des problèmes de santé chez ces derniers.

1.2.1 L'aluminium (Al)

1.2.1.1 L'élément aluminium : propriétés physico-chimiques

L'Al est un métal blanc gris appartenant à la famille du bore du groupe 13 du tableau périodique. L'Al élémentaire est un métal léger de densité $2,70 \text{ g.cm}^{-3}$, de numéro atomique 13 et de masse atomique 27 g.mol^{-1} . Il a une configuration électronique ns^2np^1 de sa couche périphérique montrant qu'il possède trois électrons et leur perte donne naissance au cation Al^{3+} . Le degré d'oxydation (+III) est le seul que possède l'Al en solution (Atkins et Jones, 1998). Cette valence Al^{3+} est la seule valence la plus souvent rencontrée dans l'environnement et plus précisément dans les systèmes aqueux. Al^{3+} est considéré comme un petit ion dont le rayon ionique effectif pour une coordination 6 est de $0,5 \text{ \AA}$ (Martin, 1991). Au contact d'un acide fort, des ions Al^{3+} peuvent se détacher pour être libérés en solution (Reichl, 2002). À cause de son petit rayon ionique et son potentiel d'oxydation élevé (+1.706 V), l'Al attire fortement les anions (Martin, 1991).

1.2.1.2 L'Al : sous quelle forme est-il toxique?

Pour des pH acides, la spéciation dominante de l'Al correspond à son seul état d'oxydation Al^{3+} , généralement sous forme de complexe hydraté $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$. Les travaux menés par Campbell et Couillard (2004) ont révélé que l'ion métallique libre est reconnu comme étant la forme la plus biodisponible et l'effet toxique d'un métal en solution est lié à la concentration du métal sous cette forme. La biodisponibilité de l'ion libre dépend de plusieurs facteurs comme le pH, les concentrations en ions pouvant compétitionner pour les sites de liaisons du métal et la présence de ligands pouvant complexer le métal (Worms *et al.*, 2006; Ryan *et al.*, 2009; Lavoie *et al.*, 2012). Ainsi, la même concentration de métal peut induire des effets très différents dans des milieux dont la composition chimique est différente. Dans les solutions aqueuses, la solubilité de l'Al est fortement dépendante du pH. Ainsi, la forme et la concentration de l'Al, dans ce type de solutions, dépendent du pH. La concentration en Al soluble total augmente fortement en dessous de pH 5.5. Dans ce cas, où les valeurs de pH sont faibles ($\text{pH} < 5.5$), la principale forme soluble est l'ion mononucléaire $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ noté aussi Al^{3+} . La toxicité de l'Al en solution est mesurée par l'activité chimique de l'ion Al^{3+} qui est très mobile. Cependant, la solubilité de l'Al est faible à pH compris entre 6.5 - 7.5. Il se produit des augmentations substantielles de la solubilité quand le pH augmente ou diminue (Kinraide, 1991).

1.2.1.3 Origines de contamination de l'environnement par l'Al

Origine naturelle

L'Al est le troisième élément constitutif de l'écorce terrestre. Il représente près de 8 % de la composition de la lithosphère après l'oxygène (42 %) et le silicium (28 %). Métal très réactif, il ne se rencontre pas à l'état libre dans la nature, l'Al se combine à d'autres éléments pour former des composés : le plus souvent sous forme d'oxydes tels que dans le minerai de bauxite, mais aussi sous forme d'aluminosilicates comme dans l'argile et les micas. Le Canada est recouvert sur environ 75 % de sa superficie par des tills glaciaires (c.-à-d. des minéraux primaires). Le feldspath, les micas, les amphiboles

et les pyroxènes constituent des exemples de minéraux contenant de l'Al et provenant des tills glaciaires (Landry et Mercier, 1992).

Les sources naturelles de rejets d'Al dans les milieux comprennent l'altération et l'érosion des roches, des dépôts glaciaires et des sols et de leurs dérivés minéraux ainsi que le dépôt atmosphérique des particules de poussière. Le dépôt atmosphérique d'Al sur les terres ou sur l'eau est minime, comparativement aux rejets internes provoqués par l'altération et l'érosion des roches, des sols et des sédiments (Driscoll *et al.*, 1994). L'altération chimique des minéraux du sol et l'érosion des roches contenant de l'Al rejettent cette substance dans les sols et les cours d'eau, en partie sous forme d' Al^{3+} et d'autres substances anioniques et cationiques, selon le pH et la disponibilité d'ions de complexation (Driscoll et Schecher, 1990).

D'autre part, les précipitations acides sont aussi responsables de la dissolution, de la mobilisation et du lessivage de l'Al du milieu terrestre vers le milieu aquatique. L'abaissement du pH augmente la solubilité de l'Al, principalement en Al^{3+} , ce qui favorise son entrée dans les cours d'eau. Cet apport d'Al a des effets néfastes mesurables sur la faune et la flore aquatiques (Lindsay, 1979; Driscoll et Schecher, 1990; Witters *et al.*, 1996). De même, l'Al est présent à l'état naturel dans toutes les eaux de surface au Canada et ailleurs. Dans l'eau de surface, la concentration maximale d'Al dissous ($0,24 \text{ mg.l}^{-1}$) a été mesurée dans la rivière de la Paix, en Alberta (Germain *et al.*, 1999).

Il n'existe aucune estimation fiable des quantités d'Al rejetées dans l'environnement à l'échelle mondiale par l'intermédiaire des processus naturels. Le dosage de l'Al total et dissous rejeté au Canada et ailleurs dans le monde est une opération difficile qui ne peut donner que des estimations grossières. En utilisant la valeur du flux global de $2,05 \text{ g.m}^{-2}$ par année proposée par Garrels *et al.* (1975), l'estimation d'une valeur totale des rejets d'Al (y compris les matières particulaires) est d'environ 20,45 millions de tonnes par année pour le Canada (Kirkwood et Nesbitt, 1991).

Origine anthropique

Les pratiques humaines (agricoles, industrielles et activités urbaines) conduisent aussi à l'enrichissement des sols et des eaux en Al :

- Rejets d'origine industrielle

La production d'Al et de ses composés ainsi que les industries liées aux multiples utilisations sont les principales sources anthropiques de pollution. L'industrie minière, l'agriculture, la combustion du charbon, les fonderies et les échappements des automobiles contribuent également à la contamination de l'environnement par l'Al.

Le rejet des déchets industriels, particulièrement ceux des alumineries, contribue à la pollution des sols et des eaux par l'Al. Au Québec, il existe plusieurs usines de production d'Al qui opèrent plusieurs installations au Saguenay-Lac-Saint-Jean. Malgré le traitement de leurs eaux usées, ces usines relarguent des concentrations assez importantes d'Al dans le milieu environnant. Ces concentrations en Al varient entre 1 et 7 mg.l⁻¹ pour l'Al total dans les effluents d'usines (Roy *et al.*, 2000). De même, au Canada les rejets de l'Al découlant de l'utilisation industrielle des sels d'Al ont totalisé environ 8 800 tonnes en 1996, la majeure partie de ces rejets (8 124 tonnes) aboutissant dans les eaux de surface (Germain *et al.*, 1999). Certains de ces rejets ont été éliminés par épandage sur des terres agricoles (317 tonnes). De même, les concentrations moyennes d'Al mesurées dans les eaux usées rejetées dans les cours d'eau par les usines de pâtes et papiers varient de 0,46 à 4,8 mg.l⁻¹. Les concentrations moyennes totales d'Al mesurées pour les autres types d'industries varient de 0,01 à 2,3 mg.l⁻¹.

- Les pratiques agricoles

L'utilisation de boues d'alun pour l'amendement des sols est la voie principale par laquelle l'Al pénètre dans le milieu terrestre. L'Al est contenu essentiellement dans des produits utilisés pour la fabrication des engrais minéraux à savoir le nitrate d'Al et le sulfate d'Al (Germain *et al.*, 1999).

- Traitement de l'eau potable

L'Al présent dans l'eau potable provient essentiellement de l'utilisation de sels comme l'alun ou le chlorure de polyaluminium en guise de coagulants dans les stations de traitement de l'eau potable pour éliminer les composés organiques, les micro-organismes et les particules (Santé Canada, 1998). La fréquence de détection de l'Al dans les sites provinciaux et territoriaux variait de 35 % pour les Territoires du Nord-Ouest en 1990-1992 (18 sites sur 52) à 100 % pour l'Ontario en 1996-1997 (124 sites sur 124) (Facey et Smith, 1993).

1.2.2 Phytotoxicité de l'Al

Dans les sols acides (pH < 5.5), l'Al est la principale cause de toxicité pour les plantes (Delhaize et Ryan, 1995; Kochian, 1995; Matsumoto, 2000). L'Al est principalement solubilisé dans la solution du sol en espèces toxiques sous forme de cation trivalent Al^{3+} (Matsumoto, 2000). Une fois libérée dans la solution du sol, cette espèce chimique (Al^{3+}) devient, au-dessus d'un seuil de concentration, la principale forme toxique d'Al pour les plantes cultivées (Delhaize et Ryan, 1995; Kochian, 1995; Matsumoto, 2000). Al^{3+} est la seule forme assimilée par les végétaux où il n'a aucune fonction biologique connue et ainsi, il n'est pas considéré comme élément essentiel (Kochian *et al.*, 2004; Poschenrieder *et al.*, 2008). De ce fait, cette toxicité de l'Al est considérée comme l'une des principales contraintes environnementales qui limite la croissance des plantes et la production de biomasse de plusieurs cultures des sols acides (Moustakas *et al.*, 1997; Matsumoto, 2000; Lidon et Barreiro, 2002; Rengel et Zhang, 2003; Kochian *et al.*, 2004; Kochian *et al.*, 2005). Les travaux de Delhaize *et al.* (1993) sur le blé (*Triticum aestivum* L.), ont montré que l' Al^{3+} provoque un certain nombre d'effets indésirables sur les processus physiologiques et biochimiques. Les principaux symptômes que présente une plante cultivée en présence d' Al^{3+} sont l'inhibition de la croissance, la diminution de sa biomasse, l'inhibition de l'élongation des racines associée à un arrêt de la division cellulaire et des déformations caractéristiques. L'exposition à long terme à l'Al entraîne une carence de certains nutriments essentiels tels que le phosphore, le calcium, le magnésium, le potassium et le fer, ce qui peut être

facilement détecté dans les plantes comme des symptômes de carence. De même, l'apparition du retard dans le développement des jeunes pousses, de la chlorose et des nécroses foliaires accompagné par une diminution de l'activité photosynthétique a été illustrée (Foy, 1984; Delhaize et Ryan, 1995; Kochian, 1995; Wang *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007; Poschenrieder *et al.*, 2008).

1.2.2.1 Effets de l'Al sur la croissance des plantes

L'étude des effets du stress de l'Al sur la croissance et le développement des végétaux a fait l'objet d'un intérêt constant depuis des années. Les effets toxiques de l'Al sur la croissance de la plante se manifestent par une réduction de la croissance des racines et des parties aériennes (Foy, 1988; Moustakas *et al.*, 1997; Matsumoto, 2000; Lidon et Barreiro, 2002; Peixoto *et al.*, 2002; Rengel et Zhang, 2003). L'inhibition de la croissance racinaire est depuis longtemps considérée comme un bon indice de la toxicité d' Al^{3+} (Foy, 1988). De ce fait, plusieurs travaux ont montré que l' Al^{3+} réduit la biomasse racinaire à un degré plus élevé que la biomasse aérienne (Thornton *et al.*, 1987; Raynal *et al.*, 1990). Cependant, les études réalisées par Jiang *et al.* (2008), sur le comportement des plantes de *Citrus grandis* soumises à l'effet de la toxicité de l' Al^{3+} , ont montré que la masse de matière sèche des parties aériennes est affectée plus que celle des racines. Les travaux de Silva *et al.* (2012) ont montré que l' Al^{3+} affecte la croissance des feuilles des deux génotypes de riz en induisant la réduction de la taille et la biomasse des feuilles. De même, le nombre des feuilles diminue en fonction de l'augmentation des concentrations en Al^{3+} . Il est toutefois important de noter que l' Al^{3+} n'affecte pas la croissance de toutes les plantes avec la même sévérité (Moustakas *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2007).

Ces effets peuvent être liés, entre autres, à la diminution de l'absorption de l'eau et des éléments nutritifs par les racines, à la perturbation de l'homéostasie des éléments minéraux essentiels pour la croissance des plantes, à la perturbation de l'équilibre de certaines hormones, notamment la cytokinine, hormone responsable de la division cellulaire chez les plantes, à une action délétère de l' Al^{3+} sur la composition des parois

cellulaires des racines, ainsi qu'à des perturbations de la machinerie photosynthétique, notamment la structure des chloroplastes et la biosynthèse de la Chl (Kochian, 1995; Kochian *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2013).

1.2.2.2 Effets de l'Al sur la photosynthèse

La toxicité de l'Al affecte la photosynthèse qui est un processus important dans la croissance et le développement des plantes. Une fois absorbé par les racines, Al^{3+} est transporté vers les feuilles où il va être accumulé dans la cellule végétale et peut être ainsi localisé spécifiquement dans les chloroplastes causant des altérations de la machinerie photosynthétique (Li *et al.*, 2012).

En effet, certains travaux ont montré que la présence d' Al^{3+} dans les chloroplastes affecte l'activité photosynthétique à différents niveaux. La diminution de la capacité photosynthétique par Al^{3+} peut être due à l'inhibition du taux de photosynthèse nette (Reich *et al.*, 1994; Yamamoto *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2012). Elle peut être due également à une désorganisation structurale des chloroplastes incluant des dommages aux membranes thylakoïdales (Moustakas et Ouzounidou, 1994; Pereira *et al.*, 2000; Akaya et Takenaka, 2001; Peixoto *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2006; Rafia et Sehrish, 2008). De même, l' Al^{3+} pourrait aussi induire une diminution de la teneur en Chl (Xiao, 2002; Shi, 2004; Chen *et al.*, 2005). La fermeture des stomates causée par l' Al^{3+} pourrait être une autre cause de la limitation de la photosynthèse comme conséquence de la restriction de l'assimilation du CO_2 dans les feuilles (Pereira *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2012).

Effets de l'Al sur les pigments photosynthétiques et l'absorption de la lumière

La toxicité de l'Al peut affecter la concentration en pigments chlorophylliens. Plusieurs études, faites sur de nombreuses espèces végétales, ont montré que l' Al^{3+} induit une diminution de la concentration en Chl (Peixoto *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2008). Pereira *et al.* (2006) ont montré que l' Al^{3+} entraîne une diminution de la synthèse de Chl en inhibant l'activité de δ -l'acide aminolévulinique

(δ -ALA) déshydratase (EC4.2.1.24) responsable de la formation de monopyrrole porphobilonogène, qui est une partie de la molécule de Chl. De plus, l'inhibition de la biosynthèse de la Chl diminue la taille des LHCII et LHCI et conséquemment peut réduire leur capacité d'absorption de la lumière. D'après Jiang *et al.* (2008) l'activité photosynthétique est affectée suite à la diminution du contenu en pigments photosynthétiques dans les feuilles de *citrus* soumises à l'effet de l' Al^{3+} . De même, les travaux d'Ohki (1986) ont montré que l'augmentation de la concentration en Al^{3+} provoque une diminution proportionnelle de la photosynthèse et de la concentration de Chl chez les plantes de blé et de sorgho.

La toxicité de l'Al peut affecter également la composition en pigments chlorophylliens. Le ratio du contenu entre la Chl *a* et la Chl *b* change sous l'effet de l' Al^{3+} . Le changement de ce ratio peut être attribué à un changement de la taille des antennes périphériques du PSII (contenant en majorité de la Chl *b*) par rapport aux CR (contenant uniquement de la Chl *a*). En effet, une diminution de ce rapport Chl *a/b* a été observée chez les plantes du riz et de soja soumises à l'effet de l' Al^{3+} (Roy *et al.*, 1988; Ying et Liu, 2005). De même, les pigments autres que les Chls sont également affectés par l'effet de l' Al^{3+} . Les études faites par Peixoto *et al.* (2002) ont montré que la concentration en caroténoïdes diminue en fonction de la présence d' Al^{3+} chez les cultivars du sorgho. Al^{3+} peut même induire une perte des caroténoïdes chez les plantes de longane (Xiao *et al.*, 2005), de soja (Milivojevic *et al.*, 2000) et de *Lens culinaris* (Azmat et Hasan, 2008) soumises à un tel stress d'Al. Cependant, une augmentation du contenu en caroténoïdes, comme pigments photoprotecteurs, est induite dans le cas de ce type de stress appliqué sur les plantes d'orge (Abdalla, 2008).

L'absorption de l'énergie lumineuse par les Chls est également affectée par l' Al^{3+} . En effet, d'autres travaux ont mis en évidence l'altération de l'absorption de l'énergie lumineuse (Chen *et al.*, 2005a; 2005b).

Effets de l'Al sur l'activité photochimique de l'appareil photosynthétique

Il est admis que les métaux peuvent induire une altération de l'activité photochimique des photosystèmes I et II causant ainsi une diminution du taux de transport d'électrons photosynthétique. Le PSII est généralement considéré comme la cible la plus sensible à l'action toxique des métaux qui représentent la majorité des stress environnementaux (Boucher et Carpentier, 1999; Juneau *et al.*, 2001; Carpentier, 2002; Dewez *et al.*, 2005). En effet, plusieurs travaux ont montré que la majorité des métaux, sous forme de cations métalliques bivalents, à savoir Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} et Zn^{2+} interagissent avec les différentes composantes du PSII en altérant leurs structures et en inhibant son activité photochimique. Les sites d'action de ces cations métalliques peuvent être sur le côté donneur du PSII associé au CEO et/ou à des quinones sur le côté accepteur du PSII (Boucher et Carpentier, 1999; Juneau *et al.*, 2001; Carpentier, 2002; Plekhanov et Chemeris Yu, 2003; Sigfridsson *et al.*, 2004; Dewez *et al.*, 2005; Falier *et al.*, 2005; Boisvert *et al.*, 2007). En effet, la plupart de ces cations métalliques affectent le côté donneur du PSII et plus précisément au niveau du CEO en inhibant l'activité du dégagement d' O_2 (Boucher et Carpentier, 1999; Juneau *et al.*, 2001; Carpentier, 2002; Plekhanov et Chemeris Yu, 2003; Sigfridsson *et al.*, 2004; Dewez *et al.*, 2005; Falier *et al.*, 2005; Boisvert *et al.*, 2007). Cette inhibition peut être due à différents mécanismes d'action. Parmi ces mécanismes, mentionnons la substitution de cofacteurs essentiels (Ca^{2+} , Cl^-) du complexe de $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ impliqués dans la photolyse de l'eau affectant ainsi le dégagement d' O_2 , comme c'est le cas du Cd qui se substitue au Ca^{2+} (Falier *et al.*, 2005). D'autres métaux comme Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} peuvent également engendrer le détachement des polypeptides extrinsèques associés au CEO causant l'inhibition de l'activité du dégagement d' O_2 et par la suite l'altération de l'activité du PSII (Boucher et Carpentier, 1999; Boisvert *et al.*, 2007). Le côté accepteur du PSII peut aussi être une cible sensible aux effets inhibiteurs des métaux. Par exemple, le Cd peut se lier au site Q_B causant l'inhibition du transfert d'électrons vers le PSI (Sigfridsson *et al.*, 2004).

Cependant, les principales cibles des cations métalliques trivalents comme Al^{3+} sur les composantes et l'activité des photosystèmes I et II ne sont pas bien élucidées

chez les plantes supérieures jusqu'à présent. De même, il a été rapporté que l'inhibition de la photosynthèse sous l'effet du stress d'Al est associée à l'altération de l'activité photochimique du PSII (Peixoto *et al.*, 2002; Mihailovic *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2012). Cette altération est due à l'inactivation ou la fermeture des CR du PSII par Al^{3+} et à l'inhibition du taux de transport d'électrons photosynthétique (Moustakas *et al.*, 1995; Moustakas *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2005; Mihailovic *et al.*, 2008; Perreault *et al.*, 2010). L'inactivation des CR du PSII par Al^{3+} peut entraîner une diminution de la capacité de séparation de charge au niveau du PSII (Perreault *et al.*, 2010).

D'autres études ont démontré que le rendement photochimique maximal du PSII (F_v/F_m) diminue sous l'effet de l' Al^{3+} (Jiang *et al.*, 2008; Reyes-Diaz *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012). De plus, l' Al^{3+} peut aussi induire une diminution du dégagement d' O_2 et de la fluorescence variable chez l'algue verte *Caulerpa taxifolia* (Thake *et al.*, 2003). Li *et al.* (2012) ont suggéré que l'inhibition de l'activité du PSII dans les feuilles de tabac soumises à la toxicité de l'Al peut être due à l'interaction de l' Al^{3+} avec le fer non hémique situé entre les deux quinones Q_A et Q_B . Al^{3+} peut aussi interagir avec les protéines du complexe du PSII provoquant un changement conformationnel majeur au niveau de leurs structures secondaires (Nahar *et al.*, 1997). Les travaux de Rai *et al.* (1996,1998) ont rapporté que l' Al^{3+} peut également induire une inactivation des PSII et PSI chez les cyanobactéries et les algues vertes.

D'autre part, plusieurs études ont montré que le complexe de PSI est également l'un des sites cibles de plusieurs cations métalliques divalents tels que le Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Mg^{2+} et Pb^{2+} . Il a été rapporté que ces cations affectent l'activité photochimique, inhibent le transport d'électrons entre la PC et P700 du côté donneur de PSI, diminuent la quantité de P700 actif, altèrent les antennes LHCI et peuvent provoquer aussi un changement de conformation des structures secondaires des polypeptides du PSI (Honeycutt et Krogmann, 1972; Wong et Govindjee, 1976; Sárvári *et al.*, 1999; Hermans *et al.*, 2004; Wodala *et al.*, 2012; Belatik *et al.*, 2013; Deng *et al.*, 2013). En général, le PSI est considéré le complexe photosynthétique le moins sensible à l'effet des métaux puisque l'inhibition de son activité se fait seulement à des concentrations

supérieures à celles affectant le PSII (Tripathy *et al.*, 1981; Tripathy *et al.*, 1983; Boucher et Carpentier, 1999; Zhou *et al.*, 2006). Cependant, à l'échelle de plantes supérieures l'effet de l' Al^{3+} sur l'activité photochimique du PSI ainsi que ses sites d'action au niveau de ce complexe restent méconnus jusqu'à présent.

Effets de l'Al sur la dissipation d'énergie associée aux photosystèmes II et I

L'inhibition de l'activité photochimique des PSII et PSI entraîne un changement au niveau des mécanismes de dissipation d'énergie des photosystèmes. Ainsi, l'augmentation de la dissipation d'énergie sous forme non photochimique (NPQ) a été observée chez les feuilles de *Plantago almogravensis* exposées à l'effet toxique de l' Al^{3+} . Cette augmentation de la dissipation thermique peut être un moyen de protection des structures photosynthétiques contre les effets néfastes de l' Al^{3+} dans le cas du stress d'Al (Martins *et al.*, 2013). Des effets similaires de l'augmentation de NPQ ont été observés chez plusieurs autres espèces végétales soumises à l'effet de la toxicité de l' Al^{3+} (Moustakas *et al.*, 1996; Jin *et al.*, 2011). De même, l'augmentation de la dissipation thermique a été observée chez des membranes de thylakoïdes exposées à d'autres types de cations métalliques bivalents comme le Cu^{2+} , Hg^{2+} et Pb^{2+} (Boucher et Carpentier, 1999).

Cette augmentation de la production de chaleur est aussi reflétée par les mécanismes de quenching de fluorescence. En effet, l'exposition des algues *Euglena gracilis* à la toxicité de l' Al^{3+} a induit une diminution de la dissipation d'énergie sous forme photochimique (QP) et une augmentation de la dissipation d'énergie sous forme non photochimique (NPQ). Ainsi, il a été suggéré que ce changement de la dissipation de l'énergie au niveau du PSII d'*Euglena gracilis* est dû à l'inactivation de quelques CR de PSII par Al^{3+} causant l'augmentation de la voie de dissipation thermique (Perreault *et al.*, 2010). Des effets similaires de la diminution de QP et de l'augmentation de NPQ ont été observés chez *Festuca arundinacea* soumise à l'effet de la toxicité de l' Al^{3+} (Jin *et al.*, 2011).

1.3 Problématiques et objectifs du projet

Depuis la fin du XIX^e siècle, le secteur industriel ainsi que la société humaine se sont développés sans préoccupation des rejets d'éléments toxiques dans tous les compartiments de l'écosystème : eau, sol et atmosphère. L'impact de ces rejets sur l'environnement ne cesse de croître depuis des années causant la pollution des milieux et plus particulièrement la pollution des sols qui est devenue un problème d'ordre mondial prenant ainsi énormément d'ampleur. De ce fait, les dangers potentiels des pollutions pour l'équilibre écologique et la santé publique sont considérés avec une inquiétude croissante par les pouvoirs publics depuis quelques années. À titre d'exemple, au Canada, la Loi canadienne sur la protection de l'environnement (LCPE 1999) ainsi que d'autres lois pertinentes visant la prévention de la pollution et la protection de l'environnement et de la santé humaine marquent véritablement la prise de conscience nationale vis-à-vis des problèmes posés par les contaminations de l'environnement (Environnement Canada, 1999). De même, au Québec, avec l'adoption du projet de loi 72 (Protection des sols et réhabilitation des terrains contaminés), en mai 2002, la problématique « sols pollués » devient une préoccupation essentielle. Ce projet de loi a pour objet l'établissement de nouvelles règles visant la protection des terrains ainsi que leur réhabilitation en cas de contamination (Ministre du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques du Québec, 2002). Parmi les principaux polluants du sol, les métaux posent effectivement des problèmes particulièrement préoccupants.

Face à ce constat, il est apparu nécessaire de se doter de moyens permettant de caractériser et de suivre l'impact de ces polluants métalliques. Des méthodes analytiques capables de détecter et de quantifier les contaminants majeurs de nature métallique ont été développées et utilisées dans des programmes de diagnostic et de surveillance des sols. Cependant, ces méthodes ne permettent pas d'évaluer les effets des contaminants métalliques sur les organismes vivants. Dans ce contexte, il est évident que l'observation et l'étude des organismes vivants dans les milieux contaminés constituent l'approche la plus pertinente pour évaluer l'impact biologique des polluants potentiellement présents (Fletcher, 1991). L'utilisation d'indicateurs biologiques est en fait une démarche

couramment adoptée dans les procédures de surveillance de la qualité des eaux (Afnor, 2003, 2007), mais pour les sols, aucune méthode rapide, simple, de faible coût et utilisable en routine n'est encore validée.

À cet effet, les végétaux, premiers éléments de la chaîne alimentaire, pourraient représenter d'excellents modèles pour analyser les symptômes de toxicité lors d'expositions à des polluants. En particulier, l'action d'un stress sur le métabolisme du végétal peut être décelée de manière précoce par son effet sur la photosynthèse. Ces perturbations physiologiques peuvent donc constituer des biomarqueurs d'exposition qui pourraient être intégrés aux procédures d'évaluation de la qualité d'un sol (Prasad, et Strzalka, 2002). La photosynthèse est le principal processus, à la base de la chaîne trophique, qui peut être affectée par différents facteurs environnementaux et notamment par la présence d'éléments métalliques (Carpentier, 2002; Prasad, et Strzalka, 2002). Parmi ces métaux, l'Al constitue un problème toxicologique émergent au cours de ces dernières décennies. Son utilisation dans de nombreux domaines à savoir la médecine, les systèmes de traitement des eaux, l'industrie alimentaire, le cosmétique, l'agriculture, etc., a entraîné un risque accru de contamination des écosystèmes. Les effets de l'Al sur l'environnement ont attiré l'attention des chercheurs, principalement à cause des problèmes d'acidification des sols. Dans un sol acide, l'Al peut être soluble, majoritairement sous la forme ionique Al^{3+} , et il possède alors une forte activité biocide. Plus particulièrement, la pollution par l' Al^{3+} engendre des effets toxiques pour les organismes photosynthétiques qui peuvent avoir une répercussion sur l'ensemble de l'écosystème.

Malgré l'existence de plusieurs travaux de recherche qui se sont intéressés à l'étude des effets toxiques de l' Al^{3+} sur l'activité photosynthétique des plantes, les résultats restent peu satisfaisants, et les sites et les mécanismes d'action de l' Al^{3+} restent plutôt méconnus et nécessitent plus d'investigations. Il est important de noter qu'au niveau des plantes supérieures, aucun travail de recherche n'a tenté de se lancer dans les approches biophysiques et biochimiques afin d'identifier les sites et les mécanismes d'action de ce cation trivalent, qui est, d'ailleurs, l'un des cations métalliques les moins

élucidés dans ce domaine. Ainsi, la compréhension de ces mécanismes et la mise en évidence des effets toxiques de cette forme métallique sur la photosynthèse des plantes supérieures demeurent un point fondamental important pour le développement des connaissances et la gestion des problématiques environnementales permettant ainsi une utilisation plus sécuritaire de l'Al dans les différents domaines.

De ce point de vue, les travaux envisagés dans le cadre de cette thèse ont par conséquent comme objectif principal de fournir de nouveaux éléments d'information permettant de comprendre les mécanismes de toxicité de l' Al^{3+} sur les propriétés fonctionnelles et structurales de l'appareil photosynthétique de l'épinard. Pour y parvenir, trois étapes sont envisagées :

- (I) Déterminer les sites d'action de l' Al^{3+} au niveau du PSII et son effet sur l'activité photochimique et le transport d'électrons photosynthétique. À cet effet, des échantillons des membranes thylakoïdales seront traités par une gamme de concentration d' Al^{3+} . Par la suite, les résultats des différentes analyses spectroscopiques à savoir le dégagement d' O_2 , l'induction de fluorescence, le déclin de fluorescence et la thermoluminescence seront traités et comparés avec des résultats d'autres ions métalliques déjà obtenus précédemment afin de suggérer les sites potentiels de l' Al^{3+} .
- (II) Comprendre les mécanismes d'action de l' Al^{3+} au niveau du PSII en se basant sur l'interaction entre ce cation trivalent et les différentes sous-unités protéiques composant le PSII afin d'interpréter l'inhibition de l'activité photochimique et d'évaluer les changements des propriétés structurales du PSII. Pour ce faire, des échantillons de fractions membranaires enrichies en PSII seront exposés à l'effet de différentes concentrations d' Al^{3+} . Les résultats obtenus par différentes techniques spectroscopiques et biochimiques seront analysés et comparés avec d'autres résultats obtenus précédemment et plus particulièrement ceux des ions métalliques.

(III) Investiguer les sites et les modes d'action de l' Al^{3+} sur l'activité photochimique et les propriétés structurales du PSI ainsi que le transport d'électrons photosynthétique. À cet effet, des échantillons des membranes thylakoïdales et des fractions membranaires enrichies en PSI seront soumis à l'effet de différentes concentrations en Al^{3+} . La consommation d' O_2 , la photooxydation du P700, la fluorescence des pigments à basse température (77 K), l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE et la FTIR seront les approches spectroscopiques et biochimiques utilisées. Les résultats obtenus seront par la suite analysés et comparés avec d'autres résultats des ions métalliques toxiques afin de nous permettre de déduire les sites d' Al^{3+} ainsi que les altérations fonctionnelles et structurales du PSI induites par l' Al^{3+} .

CHAPITRE II

DESTABILIZATION OF THE OXYGEN EVOLVING COMPLEX OF PHOTOSYSTEM II BY Al^{3+}

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en 2013 dans la revue « Photochemistry and Photobiology » : Imed Hasni, Saber Hamdani et Robert Carpentier, « Destabilization of the oxygen evolving complex of Photosystem II by Al^{3+} », vol. 89: 1135-1142. Dans ce même numéro, notre article a été sélectionné parmi les meilleures publications puisqu'il a été considéré comme un travail d'intérêt particulier pour les lecteurs de ce journal. De ce fait, il a fait l'objet d'un schéma illustrant la page couverture du journal (voir page 77). À noter que cet article a reçu plus de 100 « téléchargements ».

2.1 Résumé de l'article

L'effet inhibiteur d' Al^{3+} sur le transport d'électrons photosynthétique, dans les membranes de thylakoïdes d'épinards isolées, a été étudié. A cet effet, différentes techniques telles que le dégagement d' O_2 , l'induction de la fluorescence chlorophyllienne, le déclin de fluorescence et la thermoluminescence ont été utilisées afin de caractériser le transport d'électrons au niveau du PSII en présence de ce cation métallique toxique. Les résultats ont montré que les concentrations en Al^{3+} , inférieures à 3 mM, induisent une déstabilisation du complexe de Mn_4O_5Ca associé au CEO. Avec les mêmes concentrations d' Al^{3+} , une augmentation de l'amplitude relative de la première phase (OJ) de la courbe d'induction de fluorescence et un retard de la cinétique du déclin de fluorescence ont également été observés. Suite à l'interaction d' Al^{3+} avec le CEO, une modification structurale des polypeptides transmembranaires du complexe de PSII a été proposée, causant ainsi un retard de transfert d'électrons entre les quinones Q_A et Q_B . Au-delà de 3 mM, Al^{3+} affecte fortement l'induction de fluorescence et réduit de façon significative F_v/F_m et l'amplitude maximale du déclin de fluorescence. Ce quenching de

la fluorescence chlorophyllienne a été attribué à la formation des espèces $P680^+$ suite à l'inhibition du transfert d'électrons entre la Tyr Z (tyrosine 161 de la sous-unité D1) et $P680$.

2.2 Premier article scientifique

Destabilization of the Oxygen Evolving Complex of Photosystem II by Al^{3+}

Imed **Hasni**, Saber **Hamdani** and Robert **Carpentier***

Groupe de Recherche en Biologie Végétale (GRBV), Département de chimie, biochimie et physique, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, QC, Canada

* Author for correspondence (E-mail: Robert.Carpentier@uqtr.ca. Phone: 819-376-5011 ext. 3300. Fax: +1-819-376-5057)

Abbreviations: Chl, chlorophyll; DCBQ, 2,6-dichlorobenzoquinone; DCMU, 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea; F_0 , basal level of chlorophyll fluorescence; FI, chlorophyll fluorescence induction; F_m , maximal level of chlorophyll fluorescence; F_v/F_m , maximum quantum yield of PSII; OEC, oxygen evolving complex; O-J, J-I, I-P, three phases of Chl a fluorescence induction curve; P680, primary electron donor of photosystem II; Pheo, pheophytin; PQ, plastoquinone; PQH_2 , plastoquinol; PSI, photosystem I; PSII, photosystem II; Q_A and Q_B , primary and secondary quinone acceptors of photosystem II; TL, thermoluminescence; Tyr D, tyrosine 160 of D2 subunit; Tyr Z, tyrosine 161 of D1 subunit.

ABSTRACT

The inhibitory effect of Al^{3+} on photosynthetic electron transport was investigated in isolated thylakoid membranes of spinach. A combination of oxygen evolution, chlorophyll fluorescence induction (FI) and decay and thermoluminescence measurements have been used to characterize photosystem II (PSII) electron transport in

the presence of this toxic metal cation. Our results show that below 3 mM, Al^{3+} already caused a destabilization of the $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ cluster of the oxygen evolving complex (OEC). At these concentrations, an increase in the relative amplitude of the first phase (OJ) of FI curve and retardation of the fluorescence decay kinetics following excitation with a single turnover flash were also observed. A transmembrane structural modification of PSII polypeptides due to the interaction of Al^{3+} at the OEC is proposed to retard electron transfer between the quinones Q_A and Q_B . Above 3 mM, Al^{3+} strongly retarded fluorescence induction and significantly reduced F_v/F_m together with the maximal amplitude of chlorophyll fluorescence induced by a single turnover flash. This chlorophyll fluorescence quenching was attributed to the formation of P680^+ due to inhibition of electron transfer between tyrosine 161 of D1 subunit and P680 .

INTRODUCTION

Metals are important environmental pollutants that are toxic to biological systems. Among the most widespread metals, aluminum is the most abundant and the third most common element in the earth's crust (1). In neutral or mildly acidic soils, aluminum occurs primarily as insoluble forms and biologically inactive (2). However, in acid soils, soluble forms of aluminum, mainly Al^{3+} species, are released into the soil solution and become phytotoxic above the threshold concentration (1,3-5). In addition, Al^{3+} is both a biologically nonessential and toxic element for plant growth (6). Therefore, aluminum toxicity is one of the major environmental stresses limiting plant growth (2,7-11) and biomass production of several crops in acid soils (3,10,12,13) which comprises at least 40% of the world's arable lands (1,14).

In several plant species, Al^{3+} is absorbed and translocated from roots to leaves where it is accumulated especially in the chloroplast depending on the genotype and time of exposure (15,16). Delhaize et al. (17) reported that Al^{3+} causes a number of adverse effects on physiological and biochemical processes. In leaves, one of such processes affected by Al^{3+} excess in acid sol solution is photosynthesis (15,18-22). The presence of Al^{3+} affects photosynthesis at various levels. It inhibits the net

photosynthetic rate (11,23), reduces CO₂ assimilation (9,11,19-21,24-27), decreases chlorophyll concentration (9,26,28-30) and damages the photosynthetic apparatus (10,20,31) including structural damage of chloroplasts thylakoid membranes (19).

The light reactions of photosynthesis required for oxygen evolution and for the production of NADPH and ATP are located in the thylakoid membranes. These reactions take place in two major protein complexes called photosystem I and II (PSI and PSII). PSII catalyzes the oxidation of water and the reduction in plastoquinone (PQ) (32,33). Under illumination, the antenna complexes capture the photons and transfer this excitation to the reaction center chlorophyll (P680) in PSII leading to the excited state P680*. Subsequently, P680* reduces pheophytine (Pheo) to form the couple P680⁺Pheo. P680⁺ is rereduced by tyrosine 161 of D1 subunit (Tyr Z) which then obtains an electron from the Mn₄O₅Ca cluster of the oxygen evolving complex (OEC) that represents the heart of the water-oxidizing machinery of photosynthesis (34,35). Furthermore, the OEC is considered as a nano-sized manganese-calcium oxide localized in a protein environment (36,37). The Mn₄O₅Ca cluster has five oxidation states (S₀, S₁, S₂, S₃ and S₄). The advancement between each two successive states (S_n to S_{n+1}) requires one excitation quanta. When the state S₄ is reached, the decomposition of two water molecules occurs, thus releasing a molecule of O₂. On the other hand, Pheo transfers one electron to Q_A, the primary quinone of PSII, following charge separation. Q_A can reduce the secondary quinone, Q_B, by transferring two successive electrons. Therefore, the reduced form of Q_B can accept two protons leading to the formation of plastoquinol.

Photosystem II plays an important role in plant photosynthesis and is often affected by environmental stresses (38-41). Moreover, PSII is generally considered the most sensitive target for toxic metals that cause the majority of environmental stress. Several studies have reported the interaction of toxic bivalent cations such as Cd²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺, Ni²⁺, Pb²⁺ and Zn²⁺ with different sites of PSII (42-47). These sites may be either on the donor side of PSII associated with the OEC or/and at the quinones on the acceptor side. Therefore, as a result of this interaction, the inhibition of photosynthetic electron transport has been noted (42-47).

Similarly, the trivalent cation Al^{3+} has also been reported to reduce photosynthetic electron transport in PSII (24,48) and causes the closure of PSII reaction centers (18,26). Li et al. (15) and Piexoto et al. (20) associated the photosynthesis decrease under exposure to aluminum stress with impaired PSII photochemistry. Recent studies have demonstrated that the maximum quantum efficiency of PSII as shown by the ratio of variable fluorescence to maximum fluorescence (F_v/F_m) decreased under aluminum stress (9,15,27,49). Thake et al. (50) observed that Al^{3+} also induced a decrease in oxygen evolution and variable fluorescence in the green alga *Caulerpa taxifolia*. However, the knowledge obtained from previous studies of the inhibitory sites of aluminum in the photosynthetic electron transport of higher plants remains very limited and more investigations are needed to unveil the exact sites of actions of this trivalent metal in PSII.

To provide more clarification on the inhibitory action of Al^{3+} in PSII, we have analyzed the interaction of this toxic metal cation in isolated thylakoid membranes using several spectroscopic techniques. Our results showed that Al^{3+} disorganized the Mn_4O_5Ca cluster of the OEC and inhibited electron transfer on both the donor and acceptor sides of the photosystem.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of thylakoid membranes

Thylakoid membranes were isolated from fresh market spinach leaves (*Spinacia oleracea* L.) according to Joly et al. (51). The resultant pellet was finally resuspended in a medium containing 20 mM HEPES-NaOH (pH 7.6), 400 mM sucrose, 10 mM NaCl, 20 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, and 20 mM KCl and stored at $-80^\circ C$ in the dark until use. Chl concentration was calculated following the procedure outlined in Porra et al. (52).

Oxygen evolution

The rate of oxygen evolution in the isolated thylakoid membranes was measured at 24°C under continuous saturating white light using Oxylab system (Hansatech Instruments, Norfolk, England). The assay medium contained 20 mM Mes-NaOH (pH 6.2), 1 mM NaCl, 0.5 mM MgCl₂, 0.35 mM 2,6-dichlorobenzoquinone (DCBQ) as PSII electron acceptor, thylakoid membranes at 25 µg Chl.ml⁻¹ and the specified Al³⁺ concentrations added as Al₂(SO₄)₃.

Chl fluorescence induction

Chl fluorescence induction (FI) measurements were performed at room temperature using Plant Efficiency Analyser (Hansatech, King's Lynn, Norfolk, UK). The assay medium contained 20 mM Hepes-NaOH (pH 7.6), 400 mM sucrose, 10 mM NaCl, 20 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 20 mM KCl, thylakoid membranes at 25 µg Chl.ml⁻¹ and the specified concentrations of Al³⁺. Dark-adapted samples were excited with saturating red actinic light (peaking at 655 nm and intensity of 3000 µmol.m⁻².s⁻¹) provided by light emitting diodes. As the fluorescence signal during the first 40 µs is ascribed to artifacts due to delay in response time of the instrument, these data were not included in the analysis of FI traces. The signal at 40 µs is taken as F₀, the initial fluorescence intensity. Variable fluorescence, F_v (the difference between F₀ and the maximal fluorescence, F_m in dark-adapted samples), was used to calculate the F_v/F_m ratio.

Flash-induced Chl fluorescence decay kinetics

To detect the oxidation kinetics of Q_A, Chl fluorescence rise and its relaxation in the dark were measured with FL3500 Fluorometer (Photon Systems Instruments, Brno, Czech Republic). Samples were incubated for 1 min in complete darkness before initiating the fluorescence measurements. Then, excitation with a 30 µs red actinic flash was provided from a LED peaking at 625 nm and prompt fluorescence was measured for 1 min. The first measurement was taken 20 µs after the flash was given. The traces were

averaged to estimate the half-times and relative amplitudes of the fluorescence decay components using the following three exponential functions:

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

where $F(t)$ is the fluorescence value at time t , k_n is the rate constant, A_n is the relative amplitude of the fluorescence relaxation phases and F' is the stable minimal fluorescence at the end of the decay (53).

Thermoluminescence (TL)

Thermoluminescence measurements were carried out with a laboratory built instrument. The description of the design and functional aspects are presented elsewhere (54,55). All measurements were performed in the dark. Dark-adapted samples were incubated for 120 s at 20°C. Following this step, temperature was brought down to 2°C within 5-10 s and kept for 60 s. This incubation temperature was selected to avoid freezing-induced damages to the OEC that usually gives rise to artifacts in thylakoid membranes without cryoprotectant (54). An actinic single turnover saturating white flash of about 1 μ s width from XE-ST Pump Flash unit (Walz, Effeltrich, Germany) was applied to initiate charge separation in PSII. During the last step of the measurements, linear warming of 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. The data were analyzed using ThermoLit software developed in our laboratory for working with Windows OS (55). This software is an upgraded version of the original one.

RESULTS

Oxygen evolved

The effect of Al^{3+} on the oxygen evolving activity of thylakoid membranes isolated from spinach with DCBQ as artificial electron acceptor is shown in Fig. 1. The

inhibition increased progressively with the gradual increase in aluminum cation concentration. A significant inhibition occurred at 2-3 mM with about 80% reduction in the oxygen evolved. Above the latter concentration, the evolution of oxygen decreased slightly until it reached 100% inhibition at 10 mM of Al^{3+} (Fig. 1). This inhibition by Al^{3+} was studied in detail using various techniques to establish the sites of action as described below.

Chl fluorescence induction

The effects of Al^{3+} on Chl fluorescence properties of thylakoid membranes were studied. F_0 , the initial Chl fluorescence obtained in dark-adapted samples, and F_m , the maximal Chl fluorescence measured under saturating illumination are shown in Fig. 2A. F_0 was increased in parallel with increasing Al^{3+} concentrations. This increase in F_0 was mainly observed above 3 mM of Al^{3+} . However, F_m decreased with the same range of Al^{3+} concentrations (Fig. 2A). Low Al^{3+} concentrations (below 3 mM) did not exert a significant effect on the maximal PSII photochemical quantum yield, F_v/F_m . Nevertheless, at higher aluminum cation concentrations, the decline of F_m together with the increase in F_0 resulted in a significant decrease in F_v/F_m down to 0.30 at 15 mM (Fig. 2B).

To get more information on the Chl fluorescence properties of Al^{3+} treated thylakoid membranes, we analyzed the OJIP induction traces. These traces illustrate the progressive reduction in the quinones located at the acceptor side of PSII with three main phases corresponding to OJ, JI and IP (47,56-59). Typical induction traces were observed for the control samples of thylakoid membranes which contain only two well-defined phases as the I step is not apparent in the FI of thylakoid membranes (Fig. 3A and B, trace 0) (51,60,61). The first phase (OJ) corresponds to the reduction in the primary quinone electron acceptor of PSII, Q_A , whereas the IP phase reflects the reduction in the PQ pool together with reduction in the secondary quinone acceptor Q_B (61-63). Treatment with low Al^{3+} concentrations (below 3 mM) increased the relative fluorescence intensity at OJ phase and declined that of IP phase (Fig. 3A) suggesting

that the rate of Q_A^- reoxidation by Q_B was reduced (53,64,65). The increased OJ is even clearer in Fig. 3B, where the FI traces are normalized at both minimal and maximal values (V_i curves).

Figure 3A shows that in parallel with increasing Al^{3+} concentrations above 3 mM, the FI was damped progressively suggesting that the OEC becomes unable to supply electrons for PSII to reduce adequately the quinone acceptors of PSII thus decreasing the maximal fluorescence yield.

Flash-induced variable fluorescence decay

To confirm the reduced rate of Q_A^- reoxidation under Al^{3+} concentrations shown in Fig. 3, the decay of the variable fluorescence induced by a single turnover flash was also studied using isolated thylakoid membranes. Typical fluorescence decay kinetics on a logarithmic scale are shown in Fig. 4. The fluorescence rise induced by the flash is due to the reduction in Q_A and the dark decay is owing to its reoxidation. The dark decay of fluorescence in control samples fitted well with three exponential phases. The fast phase reflects the reoxidation of Q_A^- by Q_B (66-68). The middle phase reflects Q_A^- reoxidation which is limited by diffusion of PQ molecules to an empty Q_B pocket. The slowest phase is attributed to charge recombination of Q_A^- with the S_2 and/or S_3 states of the Mn_4O_5Ca cluster or with cytochrome b559 in inactive PSII centers (67,68). The amplitude and half-time of each phase are shown in Table 1. The addition of 0.5-4 mM Al^{3+} in thylakoid membranes resulted in a slowdown of the decay of all phases as shown by their increasing half-times (Table 1). In addition, a lowering of the total amplitude of the flash-induced fluorescence, F_m and therefore F_v was observed with increasing Al^{3+} concentrations (Fig. 4). Essentially, there was a decrease in the relative amplitude of the fast phase of the decay with a coincident increase in the relative amplitude of the slow phase at Al^{3+} concentrations of 3-4 mM. With higher Al^{3+} concentrations, the total amplitude of fluorescence was greatly declined and the decay contained only a slow phase (Fig. 4).

Thermoluminescence

Thermoluminescence is a very powerful biophysical method used to characterize more precisely the functioning of both PSII donor and acceptor side components (54,69-71). It originates from the reversal of the photo-induced electron flow in PSII. The recombination between the positively charged moieties trapped on the donor side, especially those of S states of the Mn_4O_5Ca cluster, and the negative charges of the quinones Q_A^- and Q_B^- at the acceptor sides of PSII generates the TL glow curves.

Thermoluminescence was used to characterize the effect of Al^{3+} on the charge recombination processes in thylakoid membranes. Figure 5 shows the TL glow curves produced by a linear increase in temperature from 2 to 62°C at the rate of 0.5°C/s following a 1 μ s single turnover white flash to initiate charge separation. The amplitude of the TL signal reached a maximum at about 37°C in control thylakoids (Fig. 5A, solid line). This important TL emission corresponds to the B band (peaks around 30 – 40°C) and reflects the charge recombination between Q_B^- and S_2 state of the oxidized Mn_4O_5Ca cluster (71).

The B band intensity was drastically declined with increasing concentrations of Al^{3+} . Moreover, this was accompanied by an up shift of the peak position of B band to higher temperatures that attained 43°C in the presence of 2 mM Al^{3+} (Fig. 5A). At concentrations higher than 3 mM Al^{3+} , the B band was suppressed.

The changes in the amplitude and temperature maximum of TL emission of the B band could be related to changes in either S_2 state of the Mn_4O_5Ca cluster or Q_B^- reduction in the presence of Al^{3+} . To identify the effects of Al^{3+} addition on the electron transport chain, the inhibitor 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU) was added to block the electron flow from Q_A^- to Q_B^- . Consecutively to the addition of DCMU, the B band was abolished and a new major luminescent band appeared at a maximum temperature of ~ 15°C (Fig. 5B, solid line). This band is the Q band that arises due to charge recombination between the reduced electron acceptor Q_A^- and S_2 states. Q band amplitude was strongly decreased when Al^{3+} concentration increased.

However, compared to the B band, the peak position of this band did not show a clear shift after addition of Al^{3+} .

A minor band, C band, also appeared at $\sim 52^\circ\text{C}$ in the glow curves of the control samples (Fig. 5B, solid line). This emission band originates from the recombination between Q_A^- and oxidized tyrosine 160 of D2 subunit (Tyr D). A higher concentration of Al^{3+} enhanced the amplitude of this band compared to the control sample.

The results presented in Fig. 6 show that the percentages of TL peak intensity of both B and Q bands were similarly declined with increasing Al^{3+} concentration. At 2 mM Al^{3+} , the amplitude of TL peak decreased to 70% and 82% for B and Q bands, respectively, compared to that of the control. However, the C band shows an enhancement in the peak intensity when increasing Al^{3+} concentration.

DISCUSSION

In this study, we used isolated thylakoid membranes to investigate the inhibitory effect of the millimolar range of Al^{3+} concentrations on PSII activity and to gain more information about its site(s) of action. Addition of 2-3 mM Al^{3+} was sufficient to decrease the oxygen evolution activity by about 80%. Moreover, the oxygen yield was completely lost at higher concentration (above 3 mM) (Fig. 1).

The loss of oxygen yield coincided with the inhibition of electron transfer at the donor side of PSII. This inhibition was shown by a strong damping of the Chl FI in the same range of Al^{3+} concentrations (Fig. 3) and was also reflected by a decrease in F_v/F_m ratio (Fig. 2B). Similar results, including a reduced electron transport rate and a declined F_v/F_m , were previously reported in several higher plants affected by Al^{3+} (9,15,20,26,49). The decline in F_v/F_m under aluminum stress was due to a reduction in F_m and an increase in F_0 (Fig. 2, see also ref. 9). The increase in F_0 may be due to the formation of inactive PSII reaction centers or to a reduced energy transfer from the antennae complexes to the reaction centers of PSII owing to the dissociation of light-harvesting chlorophyll *a/b* protein complexes from the reaction center complex of PSII (65,72-76).

The FI traces obtained in the presence of Al^{3+} show that the OEC was unable to supply electrons for PSII to reduce the PQ pool adequately. Inhibition of the OEC was previously reported to suppress the IP phase of the fluorescence induction as observed here (77). This inhibition is due to a disorganization of the $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ cluster as demonstrated by the simultaneous inhibition of the B and Q TL bands. Indeed, the simultaneous decline of both TL bands (Fig. 6) is owing to the loss of the S_2 state of the OEC as the common recombination partner for the quinone acceptors (Fig. 5). Hence, the concentration profile of Al^{3+} for the inhibition of the TL bands (Fig. 6) precisely followed that obtained from oxygen evolution measurements.

A careful analysis of FI traces has shown a relative increase in the OJ rise at Al^{3+} concentrations below 3 mM (Fig. 3A). This was even clearer in the V_i curves of Fig. 3B and is indicative of retarded reoxidation of the primary PSII quinone acceptor Q_{A}^- . The increase life-time for Q_{A}^- reoxidation was confirmed using the single turnover flash-induced fluorescence decay kinetics measurements (Fig. 4). All three components of the fluorescence decay were strongly retarded with increasing concentrations of Al^{3+} in the range from 0.5 to 4 mM (Table 1) that corresponded to the onset of inhibition of oxygen evolution (Fig. 1). This retardation of Q_{A}^- to Q_{B} electron transfer may indicate a binding site at or near Q_{B} . Indeed, Mohanty et al. (78) suggested that Cu^{2+} could induce a structural alteration of the Q_{B} binding protein. Also, Sigfridsson et al. (45) proposed that Cd^{2+} would directly bind in or close to the Q_{B} binding site. Furthermore, Li et al. (15) associated the inhibition of PSII in tobacco leaves affected by aluminum stress to a reaction of Al^{3+} with the nonheme iron located between Q_{A} and Q_{B} coinciding with the decrease in the amount of iron in the chloroplast. A possible electrostatic effect of Al^{3+} could also have some influence at this site. However, it was shown that an alteration of the OEC such as depletion of 17 and 24 kDa extrinsic polypeptides and/or Ca^{2+} modifies the Q_{A} midpoint potential and increases the life-time for Q_{A}^- reoxidation (67,79). This long range modification was proposed to be implemented by conformational changes of transmembrane polypeptides such as D1 and other polypeptides that are associated with both the OEC and the Q_{B} niche (53 and references therein). Therefore, though the possibility of a direct inhibitory site at Q_{B} cannot be fully eliminated, the retarded Q_{A}^-

reoxidation observed here is likely associated with the destabilization of the $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ cluster as also recently proposed to occur during iron depletion (64) or for nickel and polyamine inhibition of PSII (47,53,65). The transmembrane conformational change probably modifies the midpoint potential of both Q_A and Q_B . Indeed, the shift of the temperature maximum of the B band of TL toward higher temperatures observed here with elevation of Al^{3+} concentration (Fig. 5A) can be explained by a change in the midpoint potential of Q_B as previously reported (80). This modification that occurred in the PSII population that is still active in TL may represent a first event in the deleterious action of the trivalent cation in its way to fully disorganize the OEC.

In concordance with our results, Msilini et al. (64) reported that the increase in half-times of the fluorescence decay in iron depleted leaves originate from a mixture of inactive and fully active reaction centers owing to inhibition of the Q_A^- to Q_B electron transfer. This can be assumed to correspond with a major proportion of PSII units becoming of non- Q_B reducing type. In relation to that, Table 1 shows the relative amplitude of the fast component of the fluorescence decay kinetics due to Q_A^- to Q_B electron transfer decreased with 3-4 mM Al^{3+} . This decline coincided with an increase in the relative amplitude of the slow phase (though its half-time was increased) that is associated with charge recombination between Q_A^- and the S_2 state of the $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ cluster (67). This increased proportion of reduced Q_A that is reoxidized through the slow process of charge recombination likely reflects the formation of non- Q_B reducing centers and indicates a small population of PSII with the S_2 state of the OEC still available for recombination at this concentration (3-4 mM).

Together with the strong damping and retardation of FI traces observed above 3 mM Al^{3+} characterized by a decline of the initial slope of the fluorescence induction, the total amplitude of the single turnover flash-induced fluorescence rise was also strongly decreased and its rise was slowed down (Fig. 4). Such fluorescence quenching likely originates from the recombination between Q_A^- and P680^+ in a fraction of the PSII centers. It was reported that the inhibition or retardation of electron transfer between the primary electron donor Tyr Z and P680^+ leads to an accumulation of P680^+ following

illumination with a single turnover flash (81). The recent crystal structure analysis of the OEC indicates that Tyr Z is not far from the $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ cluster and one of the four water molecules bound to the $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ cluster is directly hydrogen bounded to Tyr Z (82). Hence, the disorganization of the OEC by Al^{3+} , at concentrations above 3 mM, may also alter the molecular surrounding of Tyr Z leading to the inhibition of electron transfer from Tyr Z to P680^+ .

In addition, the increasing intensity of the C band of TL due to recombination between Q_{A}^- and Tyr D^+ , observed with increasing Al^{3+} concentrations, coincided with the decline of B and Q TL bands (Figs. 5 and 6). Formation of the C band suggests that the S_2 state was becoming affected and subsequently no longer available to recombine with Q_{A}^- in a fraction of PSII complexes. However, a population of Q_{A}^- was still present under these conditions and available to recombine with Tyr D^+ . This clearly indicates that the initial charge separation following excitation with the single turnover flash and leading to $\text{P680}^+\text{Q}_{\text{A}}^-$ state was still performing to provide the recombination partner for Tyr D^+ . Thus, the PSII reaction center was not affected by Al^{3+} at least up to 4 mM.

CONCLUSIONS

In the present work, we have demonstrated that Al^{3+} exerts its inhibitory action at the donor side of PSII leading to the inhibition of oxygen evolution. Similar inhibition was previously reported for several divalent cations such as Ni^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} or Cd^{2+} (42,45,47,83) and some organic cations such as polyamines (53,65). This inhibition is associated with the destabilization of the OEC including the disorganization of the $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ cluster. This is proposed to also result in impairment of Q_{B} reduction by Q_{A}^- and of P680^+ reduction by Tyr Z, leading to a loss of electron transport through both acceptor and donor sides of PSII.

Acknowledgements - This work was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

REFERENCES

1. Kochian, L. V. (1995) Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 237-260.
2. Kochian, L. V., M. A. Pineros and O. A. Hoekenga (2005) The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant Soil* **274**, 175-195.
3. Matsumoto, H. (2000) Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. *Int. Rev. Cytol.* **200**, 1-46.
4. Ma, J. F., P. R. Ryan and E. Delhaize (2001) Aluminum tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci.* **6**, 273-278.
5. Balsberg Pålsson, A. M. (1990) Influence of aluminum on biomass, nutrients, soluble carbohydrates and phenols in beech (*Fagus sylvatica*). *Physiol. Plant.* **78**, 79-84.
6. Alia, P. and P. P. Saradhi (1991) Proline accumulation under heavy metal stress. *J. Plant Physiol.* **138**, 554-558.
7. Delhaize, E. and P. R. Ryan (1995) Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiol.* **107**, 315-321.
8. Pereira, L. B., L. A. Tabaldi, J. F. Gonçalves, G. O. Jucoski, M. M. Pauletto, S. N. Weis, F. T. Nicoloso, D. Borher, J. B. T. Rocha and M. R. C. Schetinger (2006) Effect of aluminum on δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) and the development of cucumber (*Cucumis sativus*). *Environ. Exp. Bot.* **57**, 106-115.
9. Jiang, H. X., L. S. Chen, J. G. Zheng, S. Han, N. Tang and B. R. Smith (2008) Aluminum induced effects on photosystem II photochemistry in citrus leaves assessed by the chlorophyll a fluorescence transient. *Tree Physiol.* **28**, 1863-1871.
10. Rafia, A. and H. Sehrish (2008) Photochemistry of light harvesting pigments and some biochemical changes under aluminum stress. *Pak. J. Bot.* **4**, 779-784.
11. Silva, S., G. Pinto, M. C. Dias, C. M. Correia, J. Moutinho-Pereira, O. Pinto-Carnide and C. Santos (2012) Aluminum long-term stress differently affects photosynthesis in rye genotypes. *Plant Physiol. Biochem.* **54**, 105-112.

12. Moustakas, M., E. P. Eleftheriou and G. Ouzounidou (1997) Short-term effects of aluminum at alkaline pH on the structure and function of the photosynthetic apparatus. *Photosynthetica* **34**, 169-177.
13. Lidon, F. C. and M. G. Barreiro (2002) An overview into aluminum toxicity in maize. *Bulg. J. Plant Physiol.* **28**, 96-112.
14. Delhaize, E., P. R. Ryan, D. M. Hebb, Y. Yamamoto, T. Sasaki and H. Matsumoto (2004) Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the ALMT1 gene. *PNAS, USA.* **101**, 15249-15254.
15. Li, Z., F. Xing and D. Xing (2012) Characterization of target site of aluminum phytotoxicity in photosynthetic electron transport by fluorescence techniques in tobacco leaves. *Plant Cell Physiol.* **53**, 1295-1309.
16. Huynh, V. B., A. Repellin, Y. Zuily-Fodil and A. T. Pham-Thi (2012) Aluminum stress response in rice: effects on membrane lipid composition and expression of lipid biosynthesis genes. *Physiol. Plant.* **146**, 272-284.
17. Delhaize, E., S. Craig, C. D. Beaton, R. J. Bennet, V. C. Jagadish and P. J. Randall (1993) Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.): Uptake and distribution of aluminum in root apices. *Plant Physiol.* **103**, 685-693.
18. Moustakas, M., G. Ouzounidou and R. Lannoye (1995) Aluminum effects on photosynthesis and elemental uptake in an aluminum tolerant and non-tolerant wheat cultivars. *J. Plant Nutr.* **18**, 669-683.
19. Pereira, W. E., D. L. Siqueira, C. A. Martínez and M. Puiatti (2000) Gas exchange and chlorophyll fluorescence in four citrus root stocks under aluminum stress. *J. Plant Physiol.* **157**, 513-520.
20. Peixoto, H. P., F. M. Da Matta and J. C. Da Matta (2002) Responses of the photosynthetic apparatus to aluminum stress in two sorghum cultivars. *J. Plant Nutr.* **25**, 821-832.
21. Zhang, X. B., P. Liu, Y. S. Yang and G. D. Xu (2007) Effect of Al in soil on photosynthesis and related morphological and physiological characteristics of two soybean genotypes. *Bot. Stud.* **48**, 435-444.
22. Ali, B., S. A. Hasan, S. Hayat, Q. Hayat, S. Yadav, Q. Fariduddin and A. Ahmad (2008) A role for brassinosteroids in the amelioration of aluminum stress through antioxidant system in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek). *Environ. Exp. Bot.* **62**, 153-159.

23. Yamamoto, Y., Y. Kobayashi, S. R. Devi, S. Rikiishi and H. Matsumoto (2002) Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiol.* **128**, 63-72.
24. Moustakas, M., G. Ouzounidou, E. P. Eleftheriou and R. Lannoye (1996) Indirect effects of aluminum stress on the function of the photosynthetic apparatus. *Plant Physiol. Biochem.* **34**, 553-560.
25. Lidon, F. C., M. G. Barreiro, J. C. Ramalho and J. A. Lauriano (1999) Effects of aluminum toxicity on nutrient accumulation in maize shoots: implications on photosynthesis. *J. Plant Nutr.* **22**, 397-416.
26. Chen, L. S., Y. P. Qi and X. H. Liu (2005) Effects of aluminum on light energy utilization and photoprotective systems in citrus leaves. *Ann. Bot.* **96**, 35-41.
27. Jin, S. H., X. Q. Li and X. L. Jia (2011) Genotypic differences in the responses of gas exchange, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzymes to aluminum stress in *Festuca arundinacea*. *Russ. J. Plant Physiol.* **58**, 560-566.
28. Xiao, X. X. (2002) The physiological and biochemical response of Longan (*Dimocarpus Longana Lour.*) to aluminum stress and rectification of aluminum toxicity. *Fujian J. Agr. Sci.* **17**, 182-185.
29. Shi, G. Y. (2004) Effect of aluminum on growth and some physiological function of rice seedlings. *Guihaia.* **24**, 77-80.
30. Xiao, X. X., L. S. Chen, Y. H. Cai, Y. Huang and Y. Q. Xie (2005) The effect of aluminum stress on the absorption of nutrient elements in longan seedling. *Acta Agric. Univ. Jiangxiensis (in Chinese)* **27**, 230-233.
31. Moustakas, M. and G. Ouzounidou (1994) Increased non-photochemical quenching in leaves of aluminum-stressed wheat plants is due to Al^{3+} induced elemental loss. *Plant Physiol. Biochem.* **32**, 527-532.
32. Rutherford, A. W. (1989) Photosystem II, the water-splitting enzyme. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 227-232.
33. Debus, R. J. (1992) The manganese and the calcium ions of photosynthetic oxygen evolution. *Biochim. Biophys. Acta* **1102**, 269-352.

34. Najafpour, M. M. and S. I. Allakhverdiev (2012) Manganese compounds as water oxidizing catalysts for hydrogen production via water splitting: from manganese complexes to nano-sized manganese oxides. *Int. J. Hydrogen Energy* **37**, 8753-8764.
35. Najafpour, M. M., A. Nemati Moghaddam, S. I. Allakhverdiev and Govindjee (2012) Biological water oxidation: lessons from nature. *Biochim. Biophys. Acta* **1817**, 1110-1121.
36. Najafpour, M. M., A. N. Moghaddam, Y. N. Yang, E. M. Aro, R. Carpentier, J. J. Eaton-Rye, C. H. Lee and S. I. Allakhverdiev (2012) Biological water oxidizing complex: A nano-sized manganese-calcium oxide in a protein environment. *Photosynth. Res.* **114**, 1-13.
37. Najafpour, M. M., F. Rahimi, E. M. Aro, C. H. Lee and S. I. Allakhverdiev (2012) Nano-sized manganese oxides as biomimetic catalysts for water oxidation in artificial photosynthesis: a review. *J. Roy. Soc. Interface* **9**, 2383-2395.
38. Baker, N. R. (1991) A possible role for photosystem II in environmental perturbations of photosynthesis. *Physiol. Plant.* **81**, 563-570.
39. Havaux, M. (1992) Stress tolerance of photosystem II in vivo: antagonistic effects of water, heat, and photoinhibition stresses. *Plant Physiol.* **100**, 424-432.
40. Allakhverdiev, S. I. and N. Murata (2004) Environmental stress inhibits the synthesis *de novo* of proteins involved in the photodamage-repair cycle of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim. Biophys. Acta* **1657**, 23-32.
41. Murata, N., S. I. Allakhverdiev and Y. Nishiyama (2012) The mechanism of photoinhibition in vivo: re-evaluation of the roles of catalase, α -tocopherol, non-photochemical quenching, and electron transport. *Biochim. Biophys. Acta* **1817**, 1127-1133.
42. Boucher, N. and R. Carpentier (1999) Hg^{2+} , Cu^{2+} , and Pb^{2+} 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.
43. Juneau, P., D. Dewez, S. Matsui, S. G. Kim and R. Popovic (2001) Evaluation of different algal species sensitivity to mercury and metachlor by PAM-fluorometry. *Chemosphere* **45**, 589-598.

44. Carpentier, R. (2002) The negative action of toxic divalent cations on the photosynthetic apparatus. In Handbook of plant and crop physiology (Edited by Pessaraki M.), pp 764-772. Marcel Dekker, New York, USA.
45. Sigfridsson, K. G. V., G. Bernat, F. Mamedov and S. Styring (2004) Molecular interference of Cd²⁺ with photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* **1659**, 19-31.
46. Dewez, D., L. Geoffroy, G. Vernet and R. Popovic (2005) Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*. *Aquat. Toxicol.* **74**, 150-159.
47. Boisvert, S., D. Joly, S. Leclerc, S. Govindachary, J. Harnois and R. Carpentier (2007) Inhibition of the oxygen evolving complex of photosystem II and depletion of extrinsic polypeptides by nickel. *Biometals* **20**, 879-889.
48. Mihailovic, N., G. Drazic and Z. Vucinic (2008) Effects of aluminum on photosynthetic performance in Al-sensitive and Al-tolerant maize inbred lines. *Photosynthetica* **46**, 476-480.
49. Reyes-Diaz, M., C. Inostroza-Blancheteau, R. Millaleo, E. Cruces, C. Wulff-Zottele, M. Alberdi and M. D. Mora (2010) Long-term aluminum exposure effects on physiological and biochemical features of Highbush Blueberry cultivars. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **135**, 212-222.
50. Thake, B., L. Herfort, M. Randone and G. Hill (2003) Susceptibility of the invasive seaweed *Caulerpa taxifolia* to ionic aluminum. *Bot. Mar.* **46**, 17- 23.
51. Joly, D., C. Bigras, J. Harnois, S. Govindachary and R. Carpentier (2005) Kinetic analyses of the OJIP chlorophyll fluorescence rise in thylakoid membranes. *Photosynth. Res.* **84**, 107-112.
52. Porra, R. J., W. A. Thompson and P. E. Kriedemann (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophyll a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **975**, 384-394.
53. Beauchemin, R., A. Gauthier, J. Harnois, S. Boisvert, S. Govindachary and R. Carpentier (2007) Spermine and spermidine inhibition of photosystem II: disassembly of the oxygen evolving complex and consequent perturbation in electron donation from Tyr Z to P680⁺ and the quinone acceptors Q_A⁻ to Q_B⁻. *Biochim. Biophys. Acta* **1767**, 905-912.

54. 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.
55. Gauthier, A., S. Govindachary, J. Harnois and R. Carpentier (2006) Interaction of N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine with photosystem II as revealed by thermoluminescence: reduction of the higher oxidation states of the Mn cluster and displacement of plastoquinone from the Q_B niche. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**, 1547-1556.
56. Nakatani, H. Y. (1984) Photosynthetic oxygen evolution does not require the participation of polypeptides of 16 and 24 kilodaltons. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **120**, 299-304.
57. Lazár, D. (1999) Chlorophyll fluorescence induction. *Biochim. Biophys. Acta* **1412**, 1-28.
58. Lazár, D. (2006) The polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. *Funct. Plant Biol.* **33**, 9-30.
59. Zhu, X. G., Govindjee, N. R. Baker, E. DeSturler, D. R. Ort and S. P. Long (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.
60. Bukhov, N. G., E. A. Egorova, S. Govindachary and R. Carpentier (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.
61. Boisvert, S., D. Joly and R. Carpentier (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.
62. Joly, D., J. Essemine and R. Carpentier (2010) Redox state of the photosynthetic electron transport chain in wild-type and mutants leaves of *Arabidopsis thaliana*: Impact on photosystem fluorescence. *J. Photochem. Photobiol. B* **98**, 180-187.
63. Joly, D. and R. Carpentier (2009) Sigmoidal reduction kinetics of the photosystem II acceptor side in intact photosynthetic materials during fluorescence induction. *Photochem. Photobiol. Sci.* **8**, 167-173.

64. Msilini, N., M. Zaghdoudi, S. Govindachary, M. Lachaâl, Z. Ouerghi and R. Carpentier (2011) Inhibition of photosynthetic oxygen evolution and electron transfer from the quinone acceptor Q_A^- to Q_B by iron deficiency. *Photosynth. Res.* **107**, 247-256.
65. Hamdani, S. and R. Carpentier (2009) Interaction of methylamine with extrinsic and intrinsic subunits of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* **1787**, 1223-1229.
66. Pospíšil, P. and E. Tyystjärvi (1999) Molecular mechanism of high temperature-induced inhibition of acceptor side of photosystem II. *Photosynth. Res.* **62**, 55-66.
67. Putrenko, I. I., S. Vasil'ev and D. Bruce (1999) Modulation of flash induced photosystem II fluorescence by events occurring at the water oxidizing complex. *Biochemistry* **38**, 10632-10641.
68. De Wijn, R. and J. Van Gorkom (2001) Kinetics of electron transfer from Q_A to Q_B in photosystem II. *Biochemistry* **40**, 11912-11922.
69. Vass, I. and N. R. Govindjee (1996) Thermoluminescence from the photosynthetic apparatus. *Photosynth. Res.* **48**, 117-126.
70. Vass, I. (2003) The history of photosynthetic thermoluminescence. *Photosynth. Res.* **76**, 303-318.
71. Sane, P. V. (2004) Thermoluminescence: a technique for probing photosystem II. In *Photosynthesis Research Protocols* (Edited by R. Carpentier), pp. 229-248. Humana Press, Totowa, NJ, USA.
72. Aro, E. M., I. Virgin and B. Andersson (1993) Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta* **1143**, 113-134.
73. Yamane, Y., Y. Kashino, H. Koike and K. Satoh (1997) Increases in the fluorescence F_0 level and reversible inhibition of Photosystem II reaction center by high-temperature treatments in higher plants. *Photosynth. Res.* **52**, 57-64.
74. Ralph, P. J. and M. D. Burchett (1998) Photosynthetic response of *Halophila ovalis* to heavy metal stress. *Environ. Pollut.* **103**, 91-101.
75. Ekmekçia, Y., D. Tanyolaçb and B. Ayhana (2008) Effects of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars. *J. Plant Physiol.* **165**, 600-611.

76. Zaghdoudi, M., N. Msilini, S. Govindachary, M. Lachaâl, Z. Ouerghi and R. Carpentier (2011) Inhibition of photosystems I and II activities in salt stress-exposed Fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.). *J. Photochem. Photobiol. B*, **105**, 14-20.
77. Pospíšil, P. and H. Dau (2000) Chlorophyll fluorescence transients of photosystem II membrane particles as a tool for studying photosynthetic oxygen evolution. *Photosynth. Res.* **65**, 41-52.
78. Mohanty, N., J. Vass and S. Demeter (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.
79. Krieger, A., E. Weis and S. Demeter (1993) Low pH-induced Ca^{2+} ion release in the water-splitting system is accompanied by a shift in the midpoint redox potential of the primary quinone acceptor Q_A . *Biochim. Biophys. Acta* **1144**, 411-418.
80. Peeva, V. and L. Maslenkova (2004) Thermoluminescence study of Photosystem II activity in *Haberlea rhodopensis* and Spinach leaves during desiccation. *Plant Biology* **6**, 319-324.
81. Britt, R. D. (1996) Oxygen Evolution. In *Oxygenic photosynthesis: the light reactions* (Edited by D. R. Ort and C. Yocum), pp.137-164. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
82. Kawakami, K., Y. Umena, N. Kamiya and J. R. Shen (2011) Structure of the catalytic inorganic core of oxygen-evolving photosystem II at 1.9 Å resolution. *J. Photochem. Photobiol. B*, **104**, 9-18.
83. Bernier, M. and R. Carpentier (1995) The action of mercury on the binding of the extrinsic polypeptides associated with the water oxidizing complex of photosystem II. *FEBS Lett.* **360**, 251-254.

FIGURES CAPTIONS

Figure 1. Inhibition of oxygen evolution activity (mean \pm SD, n = 15) in thylakoid membranes measured at 24°C with DCBQ as electron acceptor at different concentrations of Al³⁺.

Figure 2. Effect of the addition of Al³⁺ on the Chl fluorescence parameters F₀, F_m (A) and F_v/F_m (B) (mean \pm SD, n = 15).

Figure 3. (A) Chl fluorescence induction traces of dark adapted thylakoid membranes treated with various Al³⁺ concentrations obtained at room temperature. (B) Fluorescence induction traces normalized at both initial and maximal intensities. Number adjacent to traces represents Al³⁺ concentrations (mM). Curves are the average of 15 independent measurements with samples from three different batches.

Figure 4. Effect of various Al³⁺ concentrations on Chl fluorescence decay kinetics in dark adapted thylakoid membranes at room temperature. Curves are the average of 15 independent measurements with samples from three different batches.

Figure 5. Thermoluminescence glow curves from thylakoid membranes treated with different concentrations of Al³⁺ in the absence (B band) (A) or presence (Q and C bands) (B) of 50 μ M DCMU. The samples were heated from 2°C to 62°C at a rate of 0.5°C/s. Curves are the average of 15 independent measurements with samples from three different batches.

Figure 6. Thermoluminescence peak intensity of the B band (closed circles), Q band (open circles) (in %) and C band (open triangles) (in a.u.) at various Al³⁺ concentrations.

Table 1. Half-times ($t_{1/2}$) and relative amplitudes (A) of the Chl fluorescence decay phases in thylakoid membranes. These data were obtained from decomposition of the decay curves shown in Fig. 4. The values represent average of 15 independent measurements with samples from three different batches.

Al (mM)	Fast phase		Middle phase		Slow phase	
	$t_{1/2}$ (ms)	A (%)	$t_{1/2}$ (ms)	A (%)	$t_{1/2}$ (ms)	A (%)
0	0.20	70	1.7	21	245	9
0.5	0.19	64	1.6	26	347	10
1	0.37	77	15.3	15	2230	8
1.5	0.85	63	13.2	26	1290	11
2	8.45	61	90	21	1140	18
3	15.60	55	140	12	616	33
4	19.30	47	167	13	733	40

Figure 1

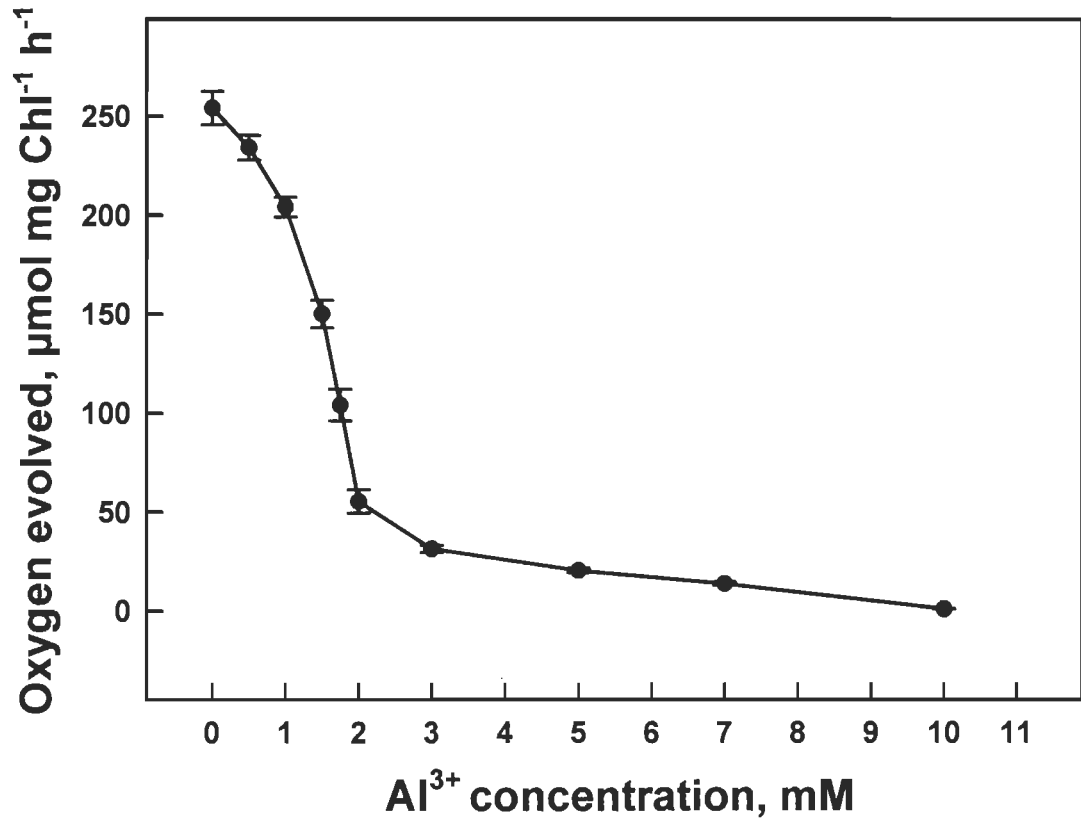


Figure 2

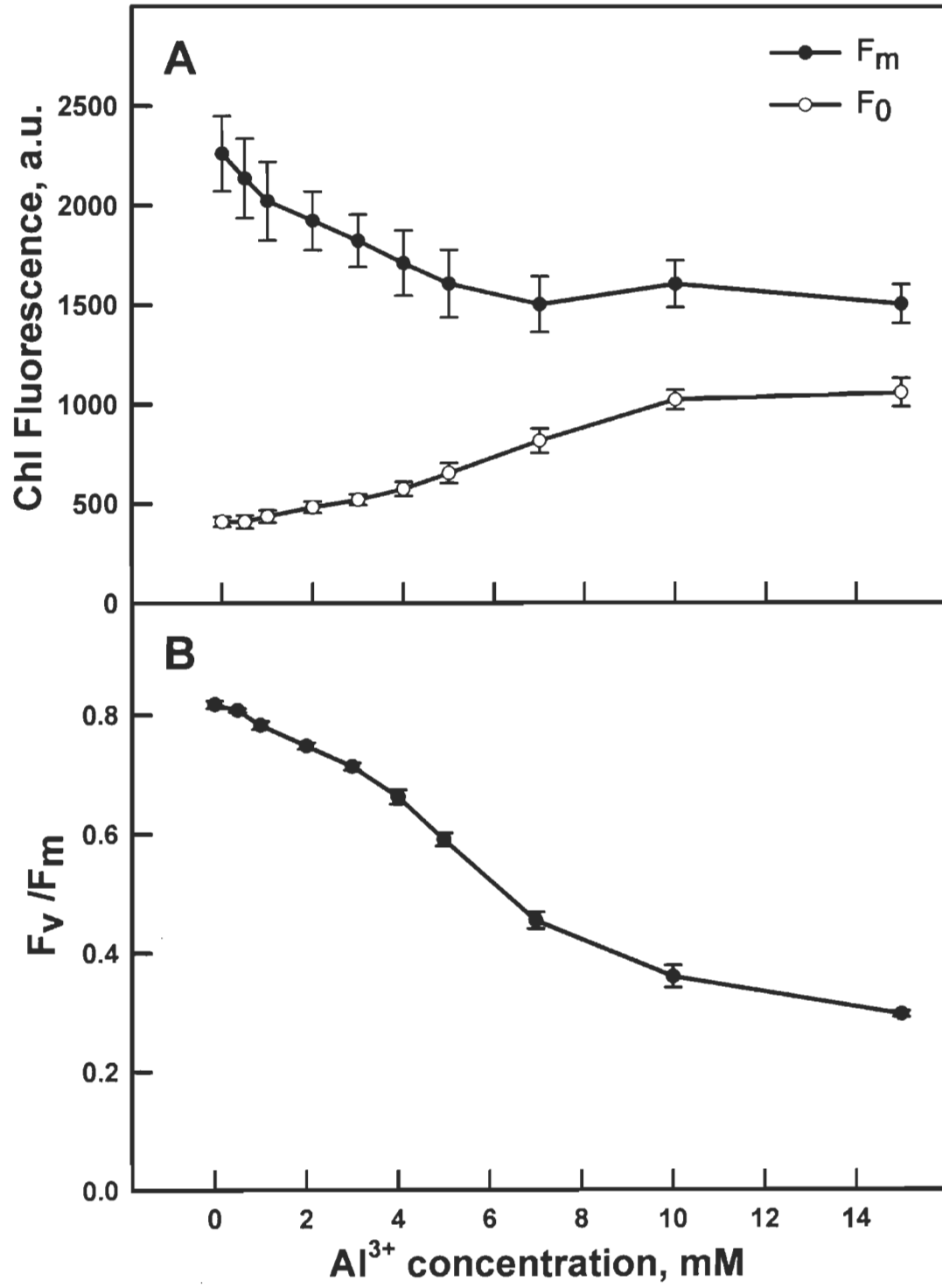


Figure 3

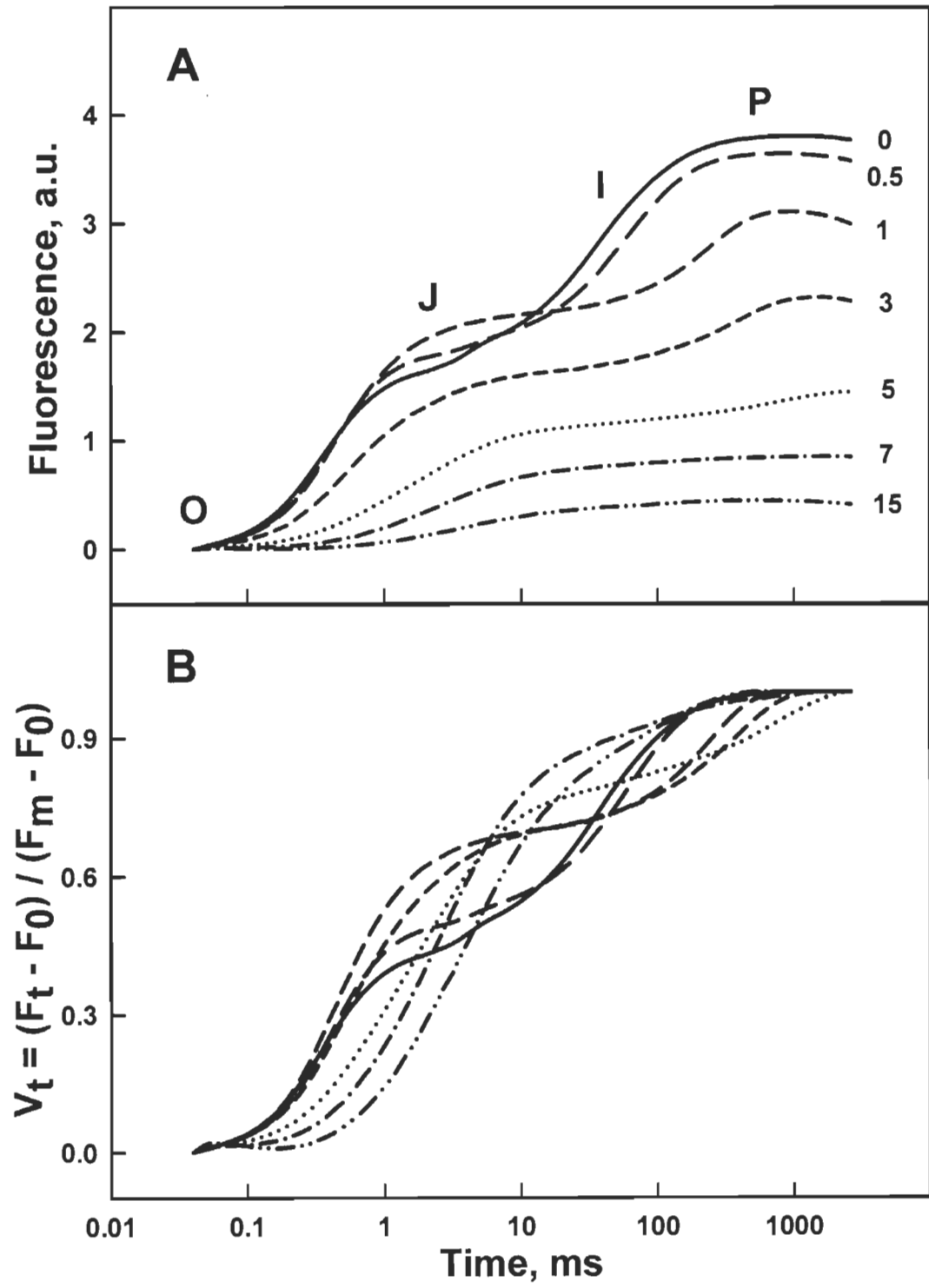


Figure 4

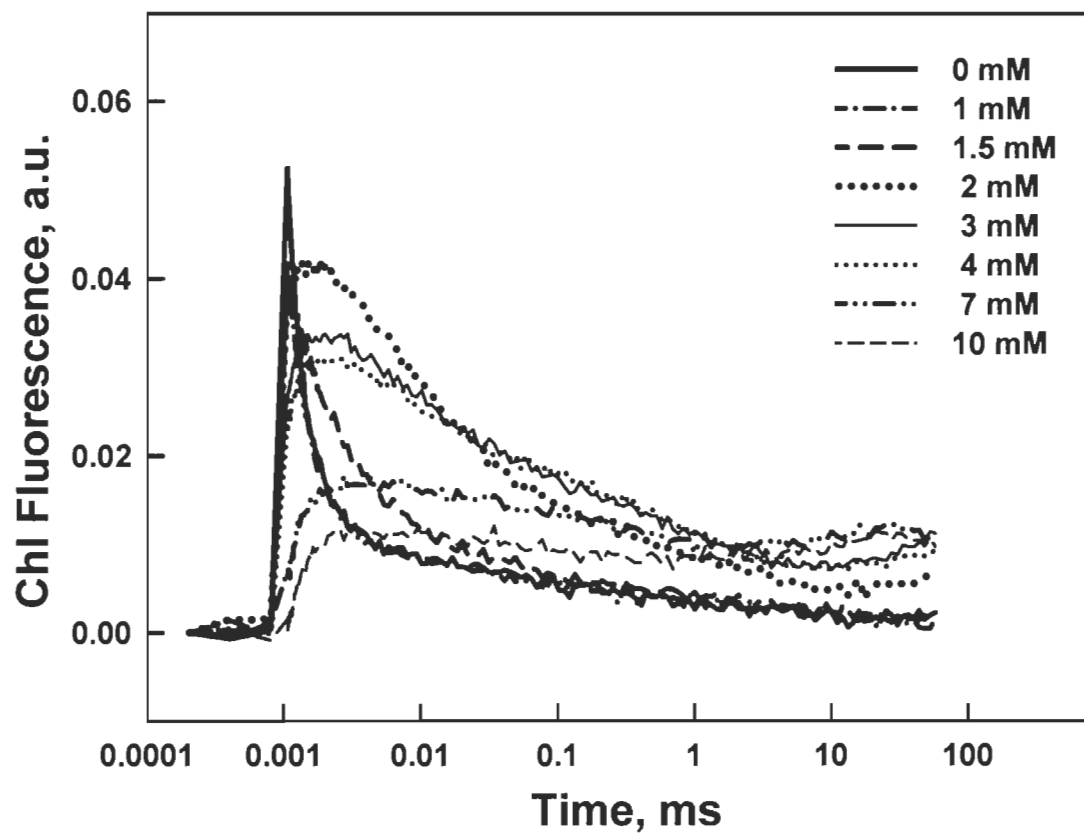


Figure 5

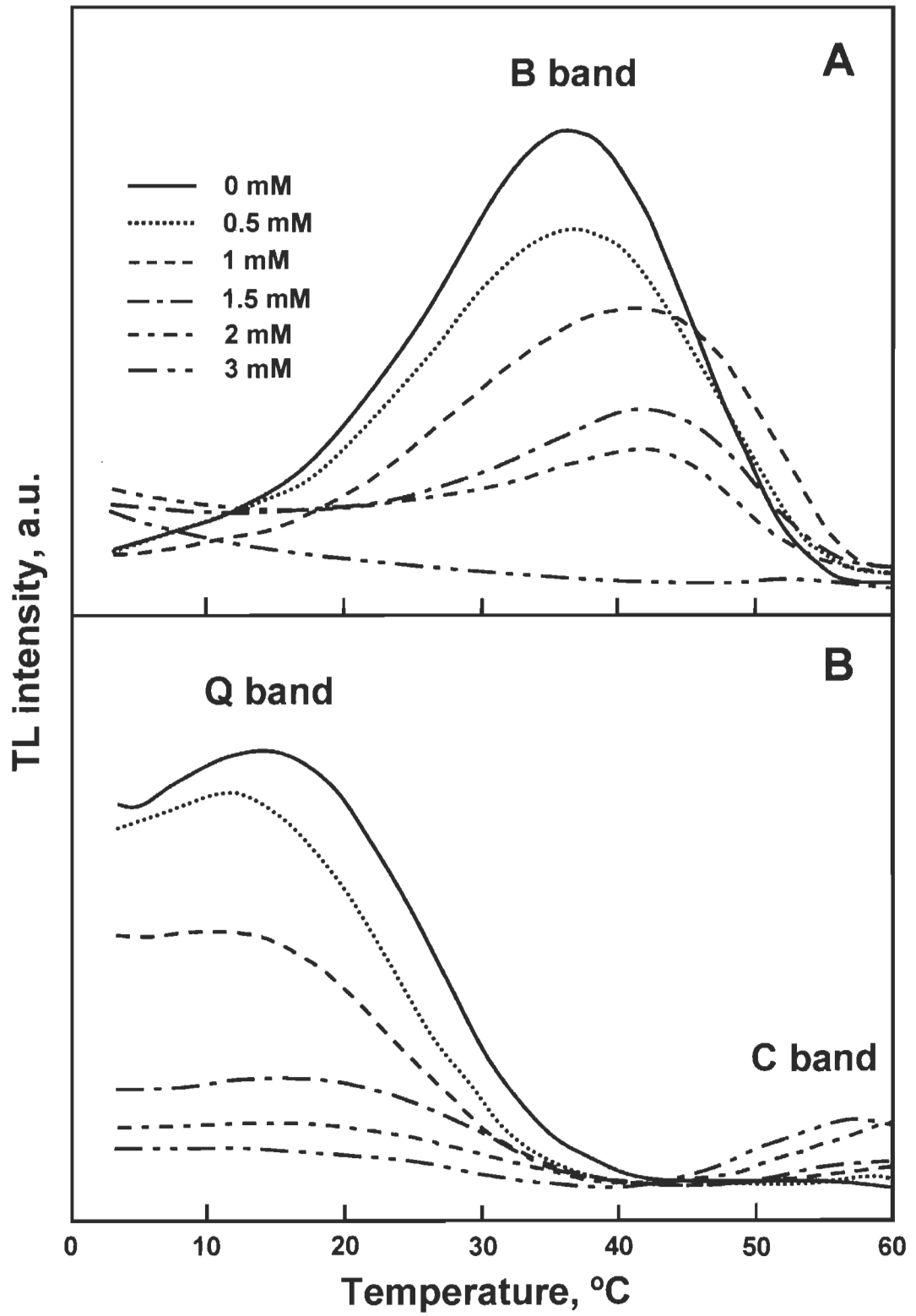
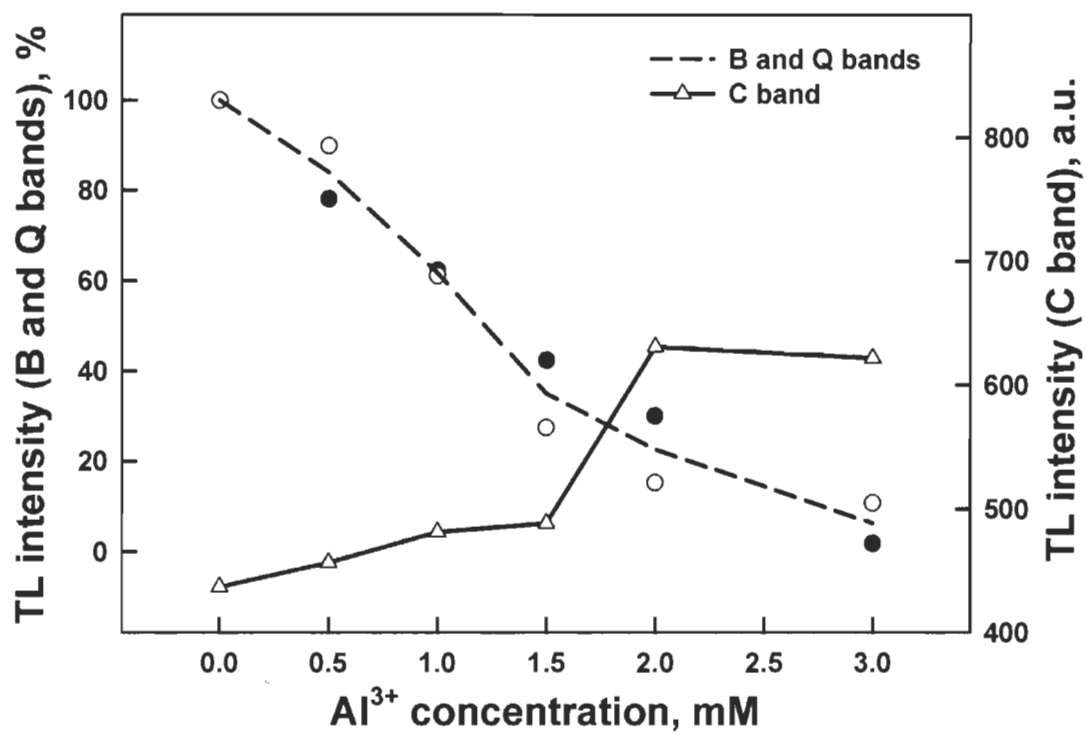


Figure 6

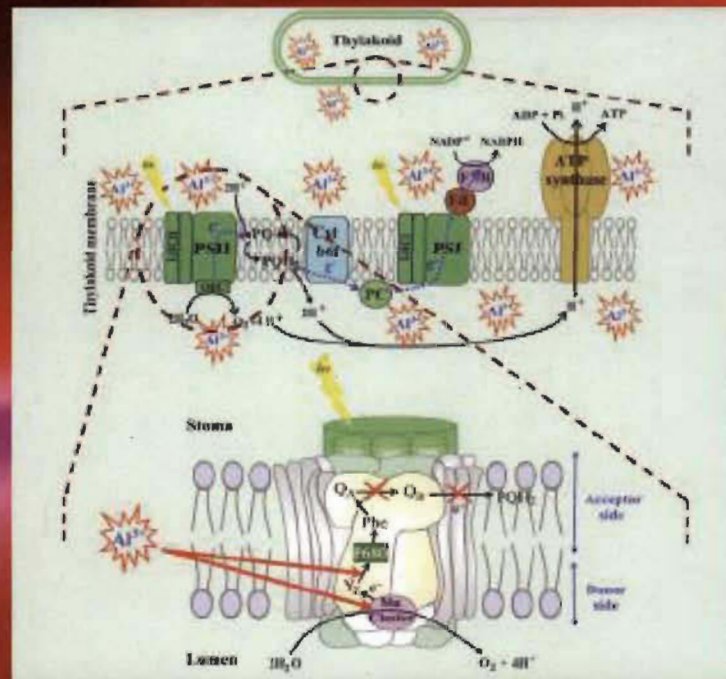


VOLUME 89 • SEPTEMBER/OCTOBER 2013

Photochemistry AND Photobiology

PUBLISHED BY
THE AMERICAN SOCIETY FOR PHOTOBIOLOGY

[www.aspjournal.com](http://www.aspjjournal.com)



WILEY
Blackwell

CHAPITRE III

MECHANISM OF INTERACTION OF Al^{3+} WITH THE PROTEINS COMPOSITION OF PHOTOSYSTEM II

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en 2015 dans la revue « PLOS ONE » : Imed Hasni, Hnia Yaakoubi, Saber Hamdani, Heidar-Ali Tajmir-Riahi, Robert Carpentier, « Mechanism of interaction of Al^{3+} with the proteins composition of photosystem II », vol. 10: e0120876.

3.1 Résumé de l'article

Afin d'élucider le mécanisme de l'action toxique d' Al^{3+} au niveau du PSII, l'interaction de ce cation avec les sous-unités polypeptidiques des fractions membranaires enrichies en PSII a été analysée. Différentes techniques biophysiques et biochimiques, à savoir la mesure du dégagement d' O_2 (standard et par flash), l'induction et l'émission de la fluorescence chlorophyllienne, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE et sur gel vert et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), ont été effectuées. Les résultats ont montré que les concentrations en Al^{3+} , supérieures à 3 mM inhibent considérablement l'activité du dégagement d' O_2 et affectent l'avancement des états S du complexe de Mn_4O_5Ca . Cette inhibition est due au détachement des polypeptides extrinsèques et à la désorganisation du complexe de Mn_4O_5Ca associés au CEO du PSII. Ce fait a été accompagné d'une baisse significative du rendement photochimique maximal du PSII (F_v/F_m) avec un fort amortissement de l'induction de fluorescence chlorophyllienne. Le transfert de l'énergie d'excitation des antennes collectrices de la lumière (LHCII) vers les CR de PSII a été affecté suite à l'altération des antennes LHCII. Ce dernier résultat a été démontré par la diminution de l'amplitude du spectre d'émission de la fluorescence chlorophyllienne à basse température (77 K), l'augmentation de F_0 et même confirmée par l'électrophorèse sur gel vert. Les mesures de FTIR ont indiqué que l'interaction d' Al^{3+} avec les polypeptides

intrinsèques et extrinsèques du PSII induit des altérations majeures dans leurs structures secondaires des polypeptides conduisant à des changements conformationnels. Cela a été traduit par une réduction importante du pourcentage d'hélices α avec une augmentation du pourcentage des structures feuillets β et pelotes statiques dans les complexes PSII-Al³⁺. Ces changements structuraux sont étroitement liés à l'altération fonctionnelle de l'activité du PSII illustrée par l'inhibition de l'activité du transport d'électrons au niveau du PSII.

Rapport-Gratuit.com

3.2 Deuxième article scientifique

Mechanism of Interaction of Al³⁺ with the Proteins Composition of Photosystem II

Imed **Hasni**¹, Hnia **Yaakoubi**¹, Saber **Hamdani**², Heidar-Ali **Tajmir-Riahi**¹,
Robert **Carpentier**^{1*}

¹ Research Group in Plant Biology, Department of Chemistry, Biochemistry and Physics, University of Quebec at Trois-Rivieres, Trois-Rivieres, Quebec, Canada

² Plant Systems Biology Group, Partner Institute of Computational Biology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai, China

*Corresponding author: E-mail: Robert.Carpentier@uqtr.ca

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: IH RC. Performed the experiments: IH HY. Analyzed the data: IH HATR RC. Contributed reagents/materials/analysis tools: HATR RC. Wrote the paper: IH SH HATR RC.

ABSTRACT

The inhibitory effect of Al^{3+} on photosystem II (PSII) electron transport was investigated using several biophysical and biochemical techniques such as oxygen evolution, chlorophyll fluorescence induction and emission, SDS-polyacrylamide and native green gel electrophoresis, and FTIR spectroscopy. In order to understand the mechanism of its inhibitory action, we have analyzed the interaction of this toxic cation with proteins subunits of PSII submembrane fractions isolated from spinach. Our results show that Al^{3+} , especially above 3 mM, strongly inhibits oxygen evolution and affects the advancement of the S states of the $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ cluster. This inhibition was due to the release of the extrinsic polypeptides and the disorganization of the $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ cluster associated with the oxygen evolving complex (OEC) of PSII. This fact was accompanied by a significant decline of maximum quantum yield of PSII (F_v/F_m) together with a strong damping of the chlorophyll a fluorescence induction. The energy transfer from light harvesting antenna to reaction centers of PSII was impaired following the alteration of the light harvesting complex of photosystem II (LHCII). The latter result was revealed by the drop of chlorophyll fluorescence emission spectra at low temperature (77 K), increase of F_0 and confirmed by the native green gel electrophoresis. FTIR measurements indicated that the interaction of Al^{3+} with the intrinsic and extrinsic polypeptides of PSII induces major alterations of the protein secondary structure leading to conformational changes. This was reflected by a major reduction of α -helix with an increase of β -sheet and random coil structures in Al^{3+} -PSII complexes. These structural changes are closely related with the functional alteration of PSII activity revealed by the inhibition of the electron transport chain of PSII.

INTRODUCTION

In higher plants, oxygenic photosynthesis is considered as one of fundamental processes of life that transforms light into chemical energy. This process takes place in photosystem II (PSII) embedded in the thylakoid membranes of the chloroplast. PSII is a multisubunit membrane protein complex, composed of more than 25 intrinsic and

extrinsic proteins, that catalyzes the oxidation of water and the reduction of plastoquinone (PQ) [1-10]. The intrinsic proteins include several transmembrane subunits such as D1, D2, CP43, CP47 and the α and β subunits of cytochrome b559 which constitute the reaction centre (RC) of PSII [11-13]. It has been shown that the transmembrane intrinsic polypeptides are rich in α -helices as they contain at least 29 different transmembrane α -helices [14]. Deletion of these intrinsic proteins leads to the complete loss of functional PSII and assembly [15].

On the luminal side of the thylakoid membrane, three extrinsic proteins associated with PSII core participate intensively in the oxygen evolving activity: PsbO, PsbP and PsbQ with apparent molecular masses of 33, 23 and 17 kDa, respectively [16-19]. These extrinsic proteins are associated with the inorganic $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ cluster to form the oxygen evolving complex (OEC) which is considered as the heart of the water-oxidizing machinery of photosynthesis [20-22]. The $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ cluster contains four Mn ions, one Ca^{2+} , and five oxo and is bounded by two Cl^- ions that act as indispensable cofactors to catalyze the oxygen evolving reaction [21-23]. The PsbO protein is known as the "manganese stabilizing protein" (MSP) given its important role in the stabilization of the $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ cluster. It has been known that its depletion significantly retards the S states transition in the $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ cluster [17, 18, 24]. PsbP and PsbQ proteins seem to modulate the functional roles of Ca^{2+} and Cl^- in oxygen evolution [17, 25-27].

Moreover, the OEC is associated with intrinsic transmembrane proteins to form the PSII heterodimeric core that binds the redox-active cofactors involved in electron transfer of PSII [28]. Roose et al. (2010) [29] suggested that the removal of the PsbP and PsbQ extrinsic polypeptides may induce transmembrane alterations in the structure of PSII complex leading to disruption of the Q_A and/or Q_B sites or modification of the plastoquinone-plastoquinol exchange channel.

The PSII RC is surrounded by two systems of pigment-protein complexes responsible for the light harvesting: the peripheral antenna called the light harvesting complex of PSII (LHCII) and the inner antenna located close to the RC. LHCII is the

most abundant membrane protein which binds chlorophyll (Chl) *a* and *b*. It has been considered as a major peripheral antenna complex able to absorb light energy and transfer it to the RC of PSII via the inner antenna [30-33]. This latter antenna includes the CP47 and CP43 proteins which connect the PSII RC to the minor antenna proteins CP29, CP26 and CP24 and LHCII in order to perform transfer of excitation energy from LHCII to RC [2, 5, 34, 35].

Roose et al. (2007) [19] and Boekema et al. (2000) [36] have determined the relation between different subunits of PSII. They claimed that the release of the extrinsic proteins associated with the OEC affects the intrinsic core components of PSII. Moreover, they suggested that the removal of the two extrinsic polypeptides PsbP and PsbQ (of 23 and 17 kDa) may change the peripheral antenna proteins positions. Also, it has been proposed that the removal of the third extrinsic polypeptides PsbO (of 33 kDa) induce a destabilization in the dimeric structure of PSII leading to the conformational changes, which may be important for the assembly and disassembly of the PSII complex [19, 36].

The photochemical events are initiated by the absorption of the photons by the antenna complexes, especially the LHCII. This excitation energy is rapidly transferred by CP43 and CP47 toward the RC chlorophyll *a* (P680) leading to the formation of the excited state P680*. This state of P680 (P680*) is followed by a charge separation to reduce pheophytin (Pheo) allowing the formation of the P680⁺Pheo⁻ pair. On the acceptor side, one electron is transferred from the reduced Pheo⁻ to the primary quinone of PSII, Q_A and then to the secondary quinone Q_B. Following two successive electrons Q_B becomes fully reduced and can accept two protons to form the plastoquinol molecule (PQH₂). In parallel, the P680⁺ radical is rapidly reduced by a redox active tyrosine Tyr Z (Tyrosine 161 of D1 subunit) that extracts electrons from the Mn₄O₅Ca cluster of the OEC. The Mn₄O₅Ca cluster is characterized by five distinct oxidized states (S₀, S₁, S₂, S₃, and S₄), known as S states where S₁ is considered as the dark stable state of the OEC. In this site, water oxidation reaction is performed through the cycle of advancement of S states and four successive quanta of excitation are required for the transition from

$S_0 \rightarrow S_1 \rightarrow S_2 \rightarrow S_3 \rightarrow (S_4) \rightarrow S_0$. At the end of the S state cycle, especially the transition from S_4 to S_0 is accompanied by oxidation of two water molecules and the formation of oxygen molecule.

PSII complex has been considered to be the major target of several toxic metal cations [37-42]. Among these, Al^{3+} , the solubilized toxic form of aluminum in acid soils, represents one of the major environmental stresses [43-47]. Owing to its abundance, aluminum, the third most common element in the earth's crust, acts as a highly toxic non-essential element for plants under its cationic form, Al^{3+} [43, 44]. In several plant species, Al^{3+} is absorbed by roots and translocated to the leaf tissues where it is accumulated especially in the chloroplast [48]. At this level, the presence of Al^{3+} affects the photosynthesis process [45-49]. Several studies have showed that this trivalent cation (Al^{3+}) inhibits photosynthetic electron transport in PSII and affects the PSII RC, causing the impairment of PSII activity [47-51].

Recent study has demonstrated that Al^{3+} interacts with different sites of PSII in isolated thylakoid membranes of spinach (*Spinacia oleracea* L.), leading to inhibition of oxygen evolution [42]. This inhibition was associated with the destabilization of the OEC including the disorganization of the Mn_4O_5Ca cluster at the donor side. Similar studies have associated this destabilization to the interaction of several cations such as Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} and Zn^{2+} with the luminal side of PSII causing the release of the three extrinsic polypeptides of 17, 23 and 33 kDa associated with the OEC [37, 39, 41, 52, 53]. Further, Yruela et al. (2000) [53] have reported that the release of the OEC proteins was accompanied by a destabilization and liberation of inner antenna proteins CP47 and CP43 of PSII in the presence of high concentration of Cu^{2+} . Also, Fagioni et al. (2009) [54] have showed that the Cd and Cu alter the structure and organization of the LHCII complex leading to a change in LHCII protein conformation.

In addition, Hasni et al. (2013) [42] have demonstrated that Al^{3+} induces an inhibition of electron transfer between Tyr Z and P680 causing the reduction of $P680^+$ form. Thus, this may cause an impairment of Q_B reduction by P680 leading to a loss of

electron transport through acceptor side of PSII which induces a decrease of the maximal fluorescence yield. Also, numerous studies have shown that the maximum quantum efficiency of PSII (F_v/F_m) decreases under aluminum stress [45, 48, 55, 56]. Furthermore, Li et al. (2012) [48] have suggested that the inhibition of PSII activity in tobacco leaves subjected to aluminum stress may be due to the reaction of Al^{3+} with the non-heme iron located between Q_A and Q_B . Nahar et al. (1997) [57] have reported that the interaction of Ga^{3+} and Al^{3+} , at high concentrations, with proteins of PSII causes a major conformational change of protein secondary structure. However, in spite of these studies, to our knowledge little information is available regarding the mechanisms of interaction of Al^{3+} with PSII complex and its effects on the structural change of proteins, proteins composition, and functionality of PSII complex.

In order to understand the mechanism of inhibitory action of Al^{3+} in PSII by focusing on its effect on the relation between the secondary structure of PSII proteins and the functional activity of PSII complex, we have analyzed the interaction of this cation at various concentrations with intrinsic and extrinsic protein subunits of PSII submembrane fractions isolated from spinach. For this purpose, different biophysical and biochemical techniques have been used. Water oxidation, S states transitions, Chl fluorescence induction and emission, electron transfer at both sides of PSII, polypeptides composition of both OEC and LHCII were affected, and structural changes of PSII complex have been noted.

MATERIALS AND METHODS

Thylakoid membrane preparation

Thylakoid membranes were isolated from fresh spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves, obtained from a local market (IGA, Trois-Rivières, Qc, Canada), according to Joly et al. (2005) [58] and the Chl content was determined as described in Porra et al. (1989) [59].

Isolation of PSII submembrane fractions

PSII submembrane fractions were isolated from thylakoid membranes as described elsewhere [60] with minor modifications. Following incubation of isolated thylakoid membranes for 90 min in the dark at ice-cold temperature, Triton X-100 was added with gently shaking for 1 min to obtain a final concentration of 1 mg Chl.ml⁻¹. The latter solution was incubated 1 min in the dark and centrifuged for 4 min at 600 x g. The resulting supernatants were centrifuged for 15 min at 35300 x g. The pellet was suspended in a buffer containing 20 mM Mes-NaOH (pH 6.2), 15 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, and 400 mM sucrose and centrifuged at 4960 x g for 4 min. Collected supernatants were centrifuged at 35300 x g for 15 min and their pellets were suspended in the same buffer. This homogenate of pellets was centrifuged for 15 min at 35300 x g. At the latest step, the new pellet obtained was suspended in the same buffer and the Chl content was calculated following the procedure described in Porra et al. (1989) [59].

Oxygen evolution activity measurements

The rate of oxygen evolution of PSII submembrane fractions samples was performed with Clark type electrode at 24°C under continuous saturating white light using Oxylab system (Hansatech Instrument, Norfolk, England). The assay medium contained 20 mM Mes-NaOH (pH 6.2), 1 mM NaCl, 0.5 mM MgCl₂, 0.35 mM DCBQ (2,5-dichlorobenzoquinone) as PSII electron acceptor, 25 µg Chl.ml⁻¹ of PSII submembrane fractions, and the specified Al³⁺ concentrations added as Al₂(SO₄)₃.

Oxygen flash yields of isolated thylakoid membranes were recorded at room temperature by a laboratory built polarographic oxygen rate electrode described in Zeinalov (2002) [61]. The sample at 200 µg.ml⁻¹ of Chl concentration was incubated 3 minutes in the dark before measurements. At each measurement, the dark adapted sample was illuminated by a train of 12 saturating (4J) single turnover flashes (10 µs). The assay medium contained 40 mM Hepes-NaOH (pH 7.6), 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 400 mM sucrose, and the specified concentrations of Al³⁺. The oxygen yields of the 12 flashes and their parameters were estimated using developed analytical solution

for the fitting of experimental data as described previously in Messinger et al. (1997) [62] based on extended Kok model [63].

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

PSII submembrane proteins were separated by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using miniature slab gels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California) containing 13% acrylamide and 6 M urea according to Laemmli (1970) [64]. Samples of PSII submembrane fractions at $100 \mu\text{g Chl.ml}^{-1}$ were treated with different concentrations of Al^{3+} , incubated for 5 min at room temperature in the dark and centrifuged at 12400 rpm for 5 min in an Eppendorf microcentrifuge. The pellets were washed twice in 20 mM Mes-NaOH (pH 6.2) centrifuged at 12400 rpm for 5 min and then used for polypeptides separation in the gel. The Tris-alkali extraction of the 17, 23 and 33 kDa polypeptides was carried out basically as described in Nakatani (1984) [65] and then concentrated against sucrose using Spectra/Por Molecularporous membranes (Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA, USA). 10 μl of the different samples of PSII submembrane fractions, treated with Al^{3+} concentrations and the Tris-alkali extraction, were loaded per lane onto the gel. Finally, SDS-polyacrylamide gels containing separated polypeptides were stained with Coomassie brilliant blue and analyzed with the Gel-Doc 2000 system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Chl fluorescence induction

Chl fluorescence induction (FI) measurements were carried out at room temperature using Plant Efficiency Analyser (Hansatech, Kings Lynn, Norfolk, UK). The assay medium contained 20 mM Mes-NaOH (pH 6.2), 15 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 400 mM sucrose, PSII submembrane fractions at $25 \mu\text{g Chl.ml}^{-1}$ and the specified concentrations of Al^{3+} . Samples were adapted for 1 min in the dark and then excited with saturating red actinic light (peaking at 655 nm and intensity of $3000 \mu\text{mol photons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) provided by light emitting diodes. As the fluorescence signal during the first 40 μs is ascribed to artifacts due to delay in response time of the instrument, these

data were not included in the analysis of FI traces. The signal at 40 μ s is taken as F_0 , the initial fluorescence intensity. Variable fluorescence, F_v (the difference between F_0 and the maximal fluorescence, F_m in dark adapted samples) was used to calculate the F_v/F_m and F_v/F_0 ratios.

Low temperature (77 K) chlorophyll fluorescence measurements

Fluorescence emission spectra from isolated thylakoid membranes were measured at 77 K using the Perkin-Elmer LS55 spectrofluorimeter equipped with an R928 red-sensitive photomultiplier (Woodbridge, ON, Canada). The assay medium contained 20 mM Hepes-NaOH (pH 7.6), 10 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 20 mM KCl, 400 mM sucrose, 5 μ g Chl. ml^{-1} and the specified Al^{3+} concentrations with the presence of 60% glycerol. Chl fluorescence was excited at 436 nm and emission spectral was detected from 650 to 800 nm as described by Rajagopal et al. (2002) [66]. The excitation and emission spectral widths were fixed at 5 and 2.5 nm, respectively. Emission spectra were corrected according to the photomultiplier sensitivity using the correction factor spectrum provided by Perkin-Elmer. The spectra were normalized at 732 nm.

Native green gel electrophoresis

Separation of different chlorophyll-protein complexes of isolated thylakoid membranes was performed following the method described previously [67]. The samples of isolated thylakoid membranes were incubated in the dark for 5 min at different Al^{3+} concentrations and then centrifuged at 10000 rpm for 10 min at 4°C in an Eppendorf microcentrifuge. The pellets were washed the first time in ice cold 2 mM Tris-maleate buffer (pH 7.0), then centrifuged at 12500 rpm for 15 min at 4°C. The resulted pellets were washed second time in ice cold 2 mM Tris-maleate-10% glycerol buffer (pH 7.0), then centrifuged at 12500 rpm for 15 min and finally solubilized for 30 min on ice in a buffer solution contained 0.45% (w/v) octyl glucoside, 0.45% (w/v) decyl maltopyroside, 0.1% (w/v) lithium dodecyl sulfate, 10% (v/v) glycerol and 2 mM Tris-maleate (pH 7.0) to adjust the ratio of total non-ionic detergents to Chl at 20:1

(w/w). The unsolubilized fragments were removed by centrifugation at 11000 rpm for 5 min and the supernatant obtained was loaded onto a 5% stacking polyacrylamide gel. Chlorophyll-protein complexes were resolved on a 12% separating polyacrylamide gel. Gels were run at 4°C for 1-2 h at a constant current of 10 mA and then photographed.

FTIR spectroscopic measurements

Infrared spectra measurements were performed using the FTIR spectrometer (Impact 420 model), equipped with deuterated triglycine sulphate (DTGS) detector and KBr beam splitter, using AgBr windows. The concentration of PSII submembrane fractions was 1 mg Chl.ml⁻¹. Samples were prepared by addition of Al³⁺ to the PSII submembrane fractions at concentrations of 1, 2, 3, 4 and 5 mM. Spectra were collected after 4 h incubation of PSII with Al³⁺ concentrations at room temperature in the dark using hydrated films. Interferograms were accumulated over the spectral range 4000-600 cm⁻¹ with a nominal resolution of 4 cm⁻¹ and 100 scans.

Analysis of PSII protein secondary structure

Analysis of the secondary structure of PSII proteins with the presence or not of Al³⁺ concentrations was carried out as described in Ahmed et al. (1995) [68]. For determination of secondary structure of PSII proteins, the shape of the amide I band, located around 1660-1650 cm⁻¹ was used. Spectral analysis was performed using the GRAMS/AI Version 7.01 software of the Galactic Industries Corporation. The FTIR spectra were smoothed and their baselines were corrected automatically. Thus the root-mean square (rms) noise of every spectrum was calculated. By means of the second derivative in the spectral region 1600-1700 cm⁻¹ five major peaks for free PSII and their Al³⁺ complexes were resolved. The spectral region was deconvoluted by the curve-fitting method following the Levenberg-Marquadt algorithm, and the peaks corresponds to α -helix (1654-1660 cm⁻¹), β -sheet (1637-1614 cm⁻¹), turn (1678-1670 cm⁻¹), random coil (1648-1638 cm⁻¹) and β -antiparallel (1691-1680 cm⁻¹) were adjusted. The area of all the component bands was measured with the Gaussian function, and then summed up and divided by the total area [69].

RESULTS

Oxygen evolution

Fig. 1 shows the effects of Al^{3+} on photosynthetic oxygen evolution activity in PSII submembrane fractions isolated from spinach. This parameter was measured with DCBQ as specific artificial electron acceptor for PSII in the presence or not of Al^{3+} . Oxygen evolution activity decreased significantly with increasing aluminum cation concentration. A sharp 91% drop in the oxygen evolution occurred by the addition of 2 mM of Al^{3+} compared with the control. Above this concentration, the oxygen evolution decreased slightly until it reached 99% at 5 mM of Al^{3+} . We note that the loss of oxygen evolution activity under Al^{3+} action was more pronounced in PSII submembrane fractions compared to thylakoid membranes [see 42]. This difference is likely due to a more accessible binding of Al^{3+} in PSII submembrane fractions than in thylakoid membranes due to their structural differences. In addition, PSII is considered a more simple and specific system without interference from other components of the thylakoid membrane.

Similar trends were observed during the measurements of flash-induced oxygen evolution of dark adapted isolated thylakoid membranes from spinach in Fig. 2. The flash-induced oxygen evolution patterns, for the control dark adapted thylakoid membranes, show a typical period of four oscillations with first maxima on the third flash. This periodicity is related to the advancement of the S states of the $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ cluster in the OEC that generates an oxygen molecule at the third flash when samples are excited after dark adaptation [63].

Addition of 0.5-5 mM Al^{3+} in thylakoid membranes induced a decline in the amplitudes of the flash-induced oxygen yields. This decline was accentuated with increasing concentrations of Al^{3+} and the oscillation pattern was also modified.

This effect was accompanied by modification of the parameters of oxygen yields such as misses (zero-step advance), hits (one-step advance) and double hits (double-step

advance) determined according to the Kok's model. Data shows an increase in the percentage of misses and double hits, and a decrease in the percentage of hits with increasing Al^{3+} concentrations (Table 1). This reflects the reduction and/or destruction of oxygen evolving complex at the donor side.

PSII polypeptide profile in SDS page electrophoresis

In order to get more information about the interaction of Al^{3+} with the polypeptides composition of PSII submembrane fractions, especially the extrinsic polypeptides associated with the OEC, we used the polyacrylamide gel electrophoresis. The polypeptide profile of PSII submembrane fractions after various treatments of Al^{3+} concentration is shown in Fig. 3. To identify the three extrinsic polypeptides of the OEC, we incubated PSII submembrane fractions with Tris-alkali (pH 9.2), a specific treatment that causes release of three extrinsic polypeptides of the OEC from their positions in PSII complex. In lane 7, the positions that correspond to the extrinsic polypeptides associated with the OEC are indicated by their specific molecular weight of 17, 23 and 33 kDa in the Tris-alkali supernatant fractions and were also used as reference added to molecular weight standard in lane 1. Incubation of PSII submembrane fractions at low Al^{3+} concentrations (up to 3 mM), led to a loss of 17 and 23 kDa oxygen evolving extrinsic polypeptides, presented in lanes 3 and 4 as compared to the control in lane 2 (Fig. 3). However, as is distinctly seen, the band that represents the 33 kDa polypeptide was gradually reduced in intensity with increasing Al^{3+} concentrations. This polypeptide was partially removed at low concentrations of Al^{3+} . Nevertheless, addition of higher concentrations of Al^{3+} (above 3 mM Al^{3+}) caused a dissociation of the 17, 23 and 33 kDa polypeptides associated with the OEC (Fig. 3, lanes 5, 6). Based on the above data we note a correlation between the removal of extrinsic polypeptides associated with the OEC and the loss of oxygen evolution activity observed in Figure 1 and consequently the destabilization of OEC of PSII complex treated with Al^{3+} concentrations. It is important to note that other polypeptides of PSII complex such as proteins of LHCII antenna remained bound to the PSII core and are not removed or degraded.

Chl fluorescence induction

In order to evaluate the effects of Al^{3+} in the electron transport chain of PSII, chlorophyll fluorescence parameters of PSII submembrane fractions are measured. Fig. 4 shows the variation of F_0 , the initial Chl fluorescence obtained in dark adapted samples, F_m , the maximal Chl fluorescence measured under saturating red-light illumination, the F_v/F_0 and F_v/F_m ratios. Result in Fig. 4A shows an increase in F_0 with increasing Al^{3+} concentrations. This effect was mainly marked above 2 mM. Nevertheless, with the same range of Al^{3+} concentrations, F_m registered a decline and reaches a larger decrease at higher levels of concentrations (above 2 mM) (Fig. 4B). The decline in F_m and the increase of F_0 coincided with a strong decrease in both F_v/F_0 , a parameter that accounts for the simultaneous variations in F_m and F_0 in determinations of the maximum quantum yields of PSII [70], and the maximal quantum yield of PSII (F_v/F_m) (Figs. 4C, 4D). Addition of low concentrations of Al^{3+} (below 2 mM) to the submembrane fractions of PSII did not affect significantly the values of the maximal PSII photochemical quantum yield, F_v/F_m . However, at the same range of Al^{3+} concentrations, F_v/F_0 showed a significant decrease. In addition, F_v/F_m and F_v/F_0 had obvious decreases with increasing concentrations of Al^{3+} above 2 mM, which can respectively reach 35% and 74% of reduction at 5 mM Al^{3+} compared to the control. This drop in F_v/F_0 and F_v/F_m ratios observed with Al^{3+} concentrations correlates with the inhibition of oxygen evolution and the removal of the three extrinsic polypeptides associated with the OEC illustrated in Figures 1 and 3, respectively.

The OJIP traces of Chl fluorescence induction were obtained in order to elucidate the effect of Al^{3+} on the PSII photochemistry by characterizing the electron transport in both donor and acceptor sides of PSII [71]. The OJIP trace represents the successive reduction of the quinones located at the acceptor side of PSII [72] and it is composed of three main phases corresponding to OJ, JI, and IP [73-75] (Fig. 5A). OJ phase corresponds to the first phase and reflects the reduction of Q_A , the primary quinone electron acceptor of PSII. The second phase (JI) reflects an accumulation of the Q_A - Q_B -form. Whereas, the last phase IP reflects the reduction of the plastoquinone pool together with reduction of the secondary quinone acceptor Q_B [58, 74, 75].

Fig. 5A shows that with increasing the Al^{3+} concentration, the yield of the OJIP curves was considerably decreased. This progressive decrease demonstrates a distinct reduction of the PSII capacity for electron transport from OEC toward quinone acceptors. This fact is well illustrated in Fig. 5B where the FI traces are normalized at both minimal and maximal values (V_t curves). Relative fluorescence intensity at OJ phase gradually increased with low Al^{3+} concentrations (below 2 mM). This suggests that the rate of Q_A^- reoxidation by Q_B was delayed [42, 76-78]. When Al^{3+} concentrations increased above 2 mM, the FI was damped progressively at all phases suggesting that the destabilized OEC becomes unable to supply electrons for PSII to reduce adequately the quinone acceptors of PSII thus decreasing the maximal fluorescence yield.

Low temperature (77 K) Chl fluorescence emission spectra

In order to investigate the effect of Al^{3+} on the functional connection of the LHCII antenna to the PSII RC and therefore evaluate the excitation energy transfer to the PSII RC, we examined the changes in the 77 K Chl fluorescence emission spectra in isolated thylakoid membranes in the presence of Al^{3+} at various concentrations. At low temperature (77 K) the chlorophyll fluorescence emission spectra of the control thylakoid membranes exhibited the characteristic emission bands at 684, 692 and 732 nm. The emission band at 684 with shoulder at 692 nm is associated with the Chl *a* of PSII and the prominent band at 732 nm characterises the Chl *a* related to PSI [79-81]. Fig. 6 shows Chl fluorescence emission spectra obtained with excitation at 436 nm and also normalized at 732 nm. The relative amplitude of the peak at 684 nm gradually decreased with increasing Al^{3+} concentration. This effect was more pronounced at higher Al^{3+} concentrations. This result can indicate an alteration of LHCII, and consequently a decrease of excitation energy transfer from LHCII to PSII RC.

Native green gel electrophoresis

To gain deeper insight into effect of Al^{3+} addition on the chlorophyll-protein complexes, green gel electrophoresis of isolated thylakoid membranes treated with different concentrations of Al^{3+} was performed (Fig. 7). As shown in Fig. 7, lane 1, we observed five major subunits of chlorophyll-protein complexes in the control of isolated thylakoid membranes: RC PSI-LHCI, PSI core (core protein complexes of PSI), PSII core (core protein complexes of PSII), LHCII (oligomers and monomers), small complexes (SC) and free pigments (FP) [82]. This lane was used as a standard of the gel electrophoretic analysis of isolated thylakoid membranes treated with different concentrations of Al^{3+} . The addition of 1-5 mM Al^{3+} in isolated thylakoid membranes resulted in a gradual change in the electrophoretic pattern of the chlorophyll-protein complexes. Addition of Al^{3+} at low concentrations (below 3 mM), induced especially a disturbance of the LHCII complex (Fig. 7, lane 3). This effect was observed at concentrations of 2 and 3 mM Al^{3+} , and also affected other bands such as SC and FP (Fig. 7, lanes 3, 4). Notably, at high concentrations of Al^{3+} (above 3 mM) we observed the disappearance of the chlorophylls of both LHCII and SC complexes bands. This may be due essentially to an important loss of the chlorophylls of LHCII and SC complexes bands (Fig. 7, lanes 5, 6). In addition, results shown by SDS-gel electrophoresis demonstrates that antenna proteins of LHCII complex remained bound to the PSII core and are not removed which minimize the possibility of their degradation (Fig. 3). Nevertheless, the LHCI complex band seemed not to be affected by the concentrations of Al^{3+} . Therefore, the alteration of the native structures of these chlorophyll-protein complexes of PSII, especially LHCII complex, were correlated with many parameters such as, the drop in fluorescence intensity in emission peaks at 684 nm at low temperature (77 K), the increase of both F_0 and misses percentage. Thus, these changes resulted in a disturbance of the energy transfer from LHCII to PSII RC.

FTIR spectra of Al^{3+} -PSII complexes

FTIR spectroscopy is a very powerful technique applied to investigate the secondary structure of several proteins, such as soluble and membrane proteins. Also, it

has been used to determine the secondary structure of protein complexes having a structural complexity and with high molecular weight such as protein complexes of PSII [83-86]. The infrared amide I band in the 1700-1600 cm^{-1} region shows a strong absorption at 1658 cm^{-1} that originates from the C=O stretching vibrational mode in the peptide group [87, 88]. This band is sensitive to the protein complexation and changes in the secondary structure and it is widely used for studying protein conformation [86, 89]. In our present study, we have used FTIR spectroscopy in order to provide more detailed information about changes in the secondary structure of the proteins of PSII submembrane fractions induced by addition of Al^{3+} . A quantitative secondary structure analysis using the infrared absorption spectra and decomposition of amide I band of the free PSII proteins and their Al^{3+} complexes with various concentrations are performed and the results are presented in Figs. 8 and 9. Based on the curve-fitting analysis method, the secondary structure of the free PSII protein complexes contained 54% α -helix (1658 cm^{-1}), 9% β -sheet (1626 cm^{-1}), 15% turn structure (1670 cm^{-1}), 4% β -antiparallel (1687 cm^{-1}) and 18% random coil (1639 cm^{-1}). The addition of Al^{3+} at low concentrations (below 2 mM), induced a change in the secondary structure of the PSII proteins due to the formation of an Al^{3+} -PSII complex. This change was shown by a decrease of α -helix and an increase of β -sheet and random coil structures while the turn and β -antiparallel structures remained steady. With increasing Al^{3+} concentration above 2 mM, major changes of some conformational components were observed. Compared to free PSII proteins, the secondary structure of the Al^{3+} -complex at 5 mM showed a significant decrease of the α -helix content from 54% to 29%, accompanied by an important increase of the β -sheet and random coil contents from 9% to 24% and 18% to 29%, respectively. Nevertheless, both the turn and β -antiparallel structures were still stable at the presence of Al^{3+} even at high concentrations (Figs. 8, 9). This important change of protein secondary structure in PSII complex in the presence of Al^{3+} demonstrates conformational changes of PSII proteins, which may be due to the denaturation of these proteins of PSII complex that affected PSII function.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

In this study, we used isolated PSII submembrane fractions to investigate in detail the modes and the mechanisms of the inhibitory action of Al^{3+} in PSII complex by analyzing the interaction of Al^{3+} with protein subunits of PSII. It has been shown that Al^{3+} exerts an inhibitory effect on PSII activity at concentrations of millimolar range [42]. In fact, our results confirm the decrease of the oxygen evolution activity by the addition of 2-3 mM of Al^{3+} (Fig. 1). This inhibition of oxygen yield was closely related to the interaction of Al^{3+} with the donor side of the PSII causing the release of the two extrinsic polypeptides of 17 and 23 kDa associated with the OEC at the luminal side (Fig. 3) [17, 25, 26]. However, the latest extrinsic polypeptide of 33 kDa associated with the OEC remained bound to PSII and not much affected by the presence of Al^{3+} at these concentrations (Fig. 3). In addition, previous studies have demonstrated that the release of these two extrinsic polypeptides of 17 and 23 kDa reduces the binding affinity of the cofactors, such as Ca^{2+} and Cl^- , for the OEC [17]. Also, several studies revealed that these cofactors (Ca^{2+} and Cl^-) are important to maintain the active conformation of the OEC keeping the proper advancement of the S states of the $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ cluster [41, 90, 91].

Under 2-3 mM of Al^{3+} treatment, the advancement of the S states of the $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ cluster associated with the OEC was only slightly affected (Fig. 2). This could be explained by the presence of the extrinsic polypeptides of 33 kDa which allows the stabilization of the $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ cluster and modulates the Ca^{2+} and Cl^- requirements for oxygen evolution [18]. Moreover, it has been shown that the absence of extrinsic polypeptides of 33 kDa induces the release of two or four Mn ions leading to the loss of the oxygen evolving activity [92]. At the same lowest Al^{3+} concentrations (below 3 mM), a relative increase of the OJ rise in the OJIP curves was shown in Fig. 4B, indicating a delay in reoxidation of the primary PSII quinone acceptor Q_A^- . This fact has been confirmed by Hasni et al. (2013) [42] in thylakoid membranes treated with concentrations of Al^{3+} below 3 mM. Indeed, it has been shown also that the removal of 17 and 23 kDa extrinsic polypeptides and/or Ca^{2+} induces the modification in the Q_A mid-point potential, increasing the life-time for Q_A^- reoxidation [93, 94].

However, at high Al^{3+} concentrations, especially at 5 mM, oxygen yield was completely abolished. In addition, this effect was accompanied with a drastic decline in the amplitudes of the flash-induced oxygen yields and a loss of characteristic oscillations (Fig. 2). This change in the flash pattern might be explained by a severe reduction and/or destruction of the total number of functionally active oxygen evolving centers [77, 78]. This indicates that the OEC was severely impaired. This impairment was associated, in part, with the release of the three extrinsic polypeptides of 17, 23 and 33 kDa (Fig. 3). Similar results were obtained with several cations metal such as Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} and Zn^{2+} [37, 39, 41, 52, 53, 95, 96].

On the other hand, the pattern of oxygen evolution showed a rise in the values of misses and of double hits (Table 1), suggesting that higher concentrations of Al^{3+} could affect directly the $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ cluster and induce a delay of the transition between the S states [97]. This may be due to the loss of Ca^{2+} and/or Mn from $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ cluster. Therefore, the cluster is disorganized and becomes not functional. This effect was associated with the removal of the extrinsic polypeptides of 33 kD from the PSII complex, which is considered as an important protein for the functional conformation of the catalytic $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ cluster [98]. In addition, Miyao et al. (1987) [24] have demonstrated that the depletion of PsbO retards significantly the transition between S_3 -[S_4] \rightarrow S_0 .

Shevela et al. (2006) [99] have proposed that the addition of bicarbonate causes a delay in the transition between S states of $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ cluster. This delay is attributed to the binding reaction of bicarbonate with Mn ions causing changes in the redox properties of the OEC. Further, Pospíšil et al. (2003) [100] and Barra et al. (2005) [101] have claimed that the inactivation of OEC by heat stress is related to the release of extrinsic proteins from the thylakoid membrane, followed by progressive release of Mn atoms. In concordance with our results, Sandusky and Yocum (1986) [90] have reported that some monoamines induce an inhibition of oxygen evolution activity and affect the distribution of higher S states of the $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ cluster. Our results are in agreement with several works which demonstrated that addition of Cu^{2+} affects both the $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ cluster and

the extrinsic proteins of the OEC at the donor side of PSII [53, 102-105]. At 5 mM of Al^{3+} , the complete loss of oxygen yield was accompanied by a total inhibition of electron transfer from donor side to acceptor side of PSII. This was shown by a strong damping of the Chl FI and was also reflected by a drastic decrease in F_v/F_0 and F_v/F_m ratios (Figs. 4A, 5C, 5D). In a recent paper, Hasni et al. (2013) [42] have demonstrated that the decline in F_v/F_m together with the amplitudes of the OJ and IP phases of the OJIP traces, in the presence of Al^{3+} in thylakoid membranes, was associated with the impairment of OEC, reducing the electrons transfer to PSII and consequently the decrease in the maximal fluorescence yield. In addition, Hasni et al. (2013) [42] have demonstrated that the disorganization of the OEC by Al^{3+} , at concentration above 3 mM, causes an alteration of the molecular surrounding of Tyr Z leading to the inhibition of electron transfer from Tyr Z to P680^+ . Consequently, the inhibition of electron donation to PSII has promoted an accumulation of P680^+ species quenching the fluorescence intensity of PS II at the peak of 684 nm (S1 Fig.).

This mechanism has been discussed in detail as described in Hasni et al. (2013) [42]. Similar results have been recently reported in pea thylakoid membranes treated with UV-B irradiation [106]. Further, our results strongly support the reports of Msilini et al. (2011) [77], Hamdani and Carpentier (2009) [78] and Ait Ali et al. (2006) [107] suggesting that the inhibition of the oxygen yields together with the damping of Chl fluorescence may be caused by a reduced number of active PSII RC.

It is important to note that F_0 increased with increasing Al^{3+} concentrations. This increase may be due to the reduction in the energy transfer from the antennae complexes to the RC of PSII [78, 108-110]. This suggests that the release of the extrinsic polypeptides facilitates the interaction of Al^{3+} with the antennae complexes at the luminal side of PSII resulting in an increase in F_0 . This result is corroborated by an increase in the percent of misses and the drop of the peak at 684 nm of the fluorescence intensity emission at low temperature (77 K) (Table 1, Fig. 6). In addition, the results, provided by the native green gel electrophoresis and SDS-gel electrophoresis, reflected changes in the structure of the architecture of LHCII (Figs. 3, 7). In concordance with

our data, similar results have been shown under Cd and Cu effects [31, 32, 54, 111, 112]. These changes are probably attributed to the denaturation of the LHCII antenna proteins accompanied by the loss or degradation of the chlorophylls pigment under Al^{3+} treatment (Figs. 3, 7). Kochubey (2010) [113] demonstrated that heat stress causes damage in the protein conformation, changing the ensemble structure of chlorophyll and leading to disrupt energy transfer from the antennae complexes to the RC of PSII. In line with these results, Hamdani and Carpentier (2009) [78] have also suggested that the interaction of methylamine with the amino acids of the large hydrophilic loops of the proximal antenna protein of CP47 and/or CP43 induces a conformational change leading to the inhibition of the transfer of excitation energy from these complexes to the RC. In addition, Roose et al. (2007) [19] and Boekema et al. (2000) [36] have suggested that the release of the extrinsic proteins associated with the OEC may affect the intrinsic core components of PSII. Moreover, the removal of the two extrinsic polypeptides PsbP and PsbQ (of 23 and 17 kDa) has been proposed to affect the position of peripheral antenna proteins. Roose et al. (2010) [29] have suggested that the removal of the PsbP and PsbQ extrinsic polypeptides may induce transmembrane alterations in the structure of PSII complex leading to disruption of the Q_A and/or Q_B sites or modification of the plastoquinone-plastoquinol exchange channel. Besides that, the removal of the third extrinsic polypeptides PsbO (of 33 kDa) might induce additional changes in the positions of the peripheral antenna proteins and causes a destabilization in the dimeric structure of PSII leading to the conformational changes [19, 36].

Therefore, the results described above demonstrated that the functional alteration of PSII activity by Al^{3+} effect should be closely related with structural changes within PSII complex. To provide more detailed information about the changes of the secondary structure content of PSII complex in the presence of Al^{3+} concentrations, we used FTIR spectroscopy. With increasing Al^{3+} concentrations, the main conformational components obviously changed. This was caused probably by electrostatic interaction between positive charges of Al^{3+} with protein groups leading to local perturbations of protein structure [57]. These conformational changes are shown by a major secondary structural alterations reflected by the decrease of the α -helix, and an increase of the β -sheet and

random-coil structures, while no major alterations were observed for the β -anti and turn structures (Figs. 8, 9). This suggests that the α -helix structure is modified simultaneously with the β -sheet and random-coil structures. Therefore, this implies that a major component of PSII complex was denatured. Our result also supports the finding of Nahar et al. (1997) [57] and Nahar and Tajmir-Riahi (1996) [114] claiming the interaction of some divalent and trivalent cations metal such as Hg^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Ga^{3+} and Al^{3+} with proteins of PSII complex. According to these studies, analysis of FTIR amide I band in the presence of these metal cations has showed especially, a decrease of α -helix structures and an increase of β -sheet contents. Besides that, an increase of random-coil structures was shown only under Al^{3+} and Ga^{3+} treatments. These alterations in the secondary structures led to major conformational changes of PSII proteins [57, 114].

It is important to note that, in the presence of high Al^{3+} concentrations, a clear relationship was observed between the loss of oxygen evolution activity, inhibition of energy transfer from antennae complexes to RC on PSII and the modification of the protein secondary structures. We propose that Al^{3+} may disrupt polypeptides secondary structure in PSII enriched submembrane fractions at high concentrations, causing conformational changes of transmembrane intrinsic polypeptides rich in α -helices such as D1, D2, CP43, CP47, LHCII and other intrinsic polypeptides associated with both the OEC and the Q_B niche [3, 31, 32]. This modification leads to reduction in the percentage of α -helix structures. Moreover, we suggest that the removal of the three extrinsic polypeptides of 17, 23 and 33 kDa may promote an increase in the percentage of random-coil contents at the luminal side of PSII complex. This modification is accompanied with a complete loss of oxygen evolution activity. At the same range of Al^{3+} concentration, we have observed a change in the LHCII structure, showed by an increase of F_0 and the percent of misses, in parallel with a decrease in the percentage of α -helix structures and an increase of β -sheet contents leading to inhibition in the energy transfer from LHCII to RC of PSII. All these transmembrane conformational changes probably modify the mid-point potential of both Q_A and Q_B and consequently cause an

impairment of the quinone reduction on the acceptor side of PSII, resulting the inhibition of electron transfer and consequently the drop in PSII activity.

To our knowledge, our study is the first detailed work that provides structural data about the interaction mechanism of Al^{3+} with the PSII complex. The set of results demonstrate that the interaction of Al^{3+} with the intrinsic and extrinsic polypeptides of PSII complex induces major alterations of the protein secondary structure leading to conformational changes. These structural changes are closely related with the functional alteration of PSII activity. At the donor side of PSII, these changes cause the release of extrinsic polypeptides and disorganize the Mn_4O_5Ca cluster resulting in impairment of the OEC which leads to a complete loss of the oxygen evolution activity. Indeed, conformational changes of transmembrane intrinsic polypeptides cause especially an alteration of LHCII, reducing the energy transfer to PSII RC. Therefore, this disruption in polypeptides secondary structure of PSII probably affect other intrinsic polypeptides causing an impairment of the quinone reduction on the acceptor side of PSII leading to inhibition of electron transport activity.

REFERENCES

1. Rutherford AW. Photosystem II, the water-splitting enzyme. Trends Biochem Sci. 1989; 14: 227-232. PMID: [2669240](#)
2. Ferreira K, Iverson T, Maghlaoui K, Barber J, Iwata S. Architecture of the photosynthetic oxygen evolving center. Science. 2004; 303: 1831-1838. PMID: [14764885](#)
3. Dekker JP, Boekema EJ. Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. Biochim Biophys Acta. 2005; 1706: 12-39. PMID: [15620363](#)
4. Loll B, Kern J, Saenger W, Zouni A, Biesiadka J. Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II. Nature. 2005; 438: 1040-1044. PMID: [16355230](#)
5. Barber J. Photosystem II: an enzyme of global significance. Biochem. Soc Trans. 2006; 34: 619-631. PMID: [17052167](#)

6. Nelson N, Yocum CF. Structure and function of photosystems I and II. *Annu Rev Plant Biol.* 2006; 57: 521-565. PMID: [16669773](#)
7. Enami I, Okumura A, Nagao R, Suzuki T, Iwai M, Shen JR. Structures and functions of the extrinsic proteins of photosystem II from different species. *Photosynth Res.* 2008; 98: 349-363. doi: [10.1007/s11120-008-9343-9](#) PMID: [18716894](#)
8. Renger G, Renger T. Photosystem II: The machinery of photosynthetic water splitting. *Photosynth Res.* 2008; 98: 53-80. doi: [10.1007/s11120-008-9345-7](#) PMID: [18830685](#)
9. Shen JR, Henmi T, Kamiya N. Structure and Function of Photosystem II. In: Fromme P editor. *Structure of Photosynthetic Proteins.* Wiley, Weinheim; 2008. pp. 83-106.
10. Sproviero EM, Gascon JA, McEvoy JP, Brudvig GW, Batista VS. Quantum mechanics/molecular mechanics study of the catalytic cycle of water splitting in photosystem II. *J Am Chem Soc.* 2008; 130: 3428-3442. doi: [10.1021/ja076130q](#) PMID: [18290643](#)
11. Murata N, Mijao M, Omata T, Matsunami H, Kuwabara T. Stoichiometry of components in the photosynthetic oxygen evolution system of photosystem II particles prepared with Triton X-100 from spinach chloroplast. *Biochim Biophys Acta.* 1984; 765: 363-369.
12. Burnap R, Shen JR, Jursinic PA, Inoue Y, Sherman LA. Oxygen yield and thermoluminescence characteristics of a cyanobacterium lacking the manganese-stabilizing protein of photosystem II. *Biochemistry.* 1992; 31: 7404-7410. PMID: [1510930](#)
13. Suorsa M, Aro EM. Expression assembly and auxiliary functions of photosystem II oxygen-evolving proteins in higher plants. *Photosynth Res.* 2007; 93: 89-100. PMID: [17380423](#)
14. Hankamer B, Nield J, Zheleva D, Boekema E, Jansson S, Barber J. Isolation and biochemical characterisation of monomeric and dimeric photosystem II complexes from spinach and their relevance to the organisation of photosystem II in vivo. *Eur J Biochem.* 1997; 243: 422-429. PMID: [9030768](#)
15. Bricker TM, Ghanotakis DF. Introduction to oxygen evolution and the oxygen-evolving complex. In: Ort DR, Yocum CF, editors. *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht; 1996. pp. 113-136.

16. Shen JR, Inoue Y. Binding and functional properties of two new extrinsic components, cytochrome c-550 and a 12-kDa protein, in cyanobacterial photosystem II. *Biochemistry*. 1993; 32: 1825-1832. PMID: [8382523](#)
17. Seidler A. The extrinsic polypeptides of Photosystem II. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1277: 35-60. PMID: [8950371](#)
18. Bricker TM, Burnap RL. The extrinsic proteins of photosystem II. In: Wydrzynski T, Satoh K, editors. *Photosystem II: The Light-Driven Water: Plastoquinone Oxidoreductase of Photosynthesis*. Springer, Dordrecht; 2005. pp 95-120.
19. Roose JL, Wegener K, Pakrasi HB. The extrinsic proteins of photosystem II. *Photosynth Res*. 2007; 92: 369-387. PMID: [17200881](#)
20. Debus RJ. The manganese and the calcium ions of photosynthetic oxygen evolution. *Biochim Biophys Acta*. 1992; 1102: 269-352. PMID: [1390827](#)
21. Najafpour MM, Allakhverdiev SI. Manganese compounds as water oxidizing catalysts for hydrogen production via water splitting: from manganese complexes to nano-sized manganese oxides. *Int J Hydrogen Energy*. 2012; 37: 8753-8764.
22. Najafpour MM, Nemati Moghaddam AS, Allakhverdiev I, Govindjee. Biological water oxidation: lessons from nature. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1817: 1110-1121. doi: [10.1016/j.bbabi.2012.04.002](#) PMID: [22507946](#)
23. Bricker TM, Roose JL, Fagerlund RD, Frankel LK, Eaton-Rye JJ. The extrinsic proteins of Photosystem II. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1817: 121-142. doi: [10.1016/j.bbabi.2011.07.006](#) PMID: [21801710](#)
24. Miyao M, Murata N, Lavorel J, Maissonpeteri B, Boussac A, Etienne AL. Effect of the 33 kDa protein on the S-state transitions in photosynthetic oxygen evolution. *Biochim Biophys Acta*. 1987; 890: 151-159.
25. Kuwabara T, Murata N. Inactivation of photosynthetic oxygen evolution and concomitant release of three polypeptides in the photosystem II particles of spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*. 1982; 23: 533-539.
26. Ghanotakis DF, Babcock GT, Yocum CF. On the role of water-soluble polypeptides (17, 23 kDa) calcium and chloride in photosynthetic oxygen evolution. *FEBS Lett*. 1985; 192: 1-3. PMID: [3915890](#)
27. Bricker TM. Oxygen evolution in the absence of the 33 kDa manganese-stabilizing protein. *Biochemistry*. 1992; 31: 4623-4628. PMID: [1581313](#)

28. Nanba O, Satoh K. Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D1 and D2 polypeptides and cytochrome b-559. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; 84:109-112. PMID: [16593792](#)
29. Roose JL, Yocum CF, Popelkova H. Function of PsbO, the photosystem II manganese-stabilizing protein: probing the role of aspartic acid 157. *Biochemistry*. 2010; 49: 6042-6051. doi: [10.1021/bi100303f](#) PMID: [20568728](#)
30. Blankenship RE. *Molecular mechanisms of photosynthesis*. Blackwell Science, Oxford; 2002.
31. Liu ZF, Yan HC, Wang KB, Kuang TY, Zhang JP, Gui LL, et al. Crystal structure of spinach major light harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature*. 2004; 428: 287-292. PMID: [15029188](#)
32. Lucinski R, Jackowski G. The structure, functions and degradation of pigment-binding proteins of photosystem II. *Acta Biochim Pol*. 2006; 53: 693-708. PMID: [17106511](#)
33. Barros T, Royant A, Standfuss J, Dreuw A, Kuhlbrandt W. Crystal structure of plant light-harvesting complex shows the active, energy-transmitting state. *EMBO J*. 2009; 28: 298-306. doi: [10.1038/emboj.2008.276](#) PMID: [19131972](#)
34. Barber J, Nield J, Morris EP, Hankamer B. Subunit positioning in photosystem II revisited. *Trends Biochem Sci*. 1999; 24: 43-45. PMID: [10098396](#)
35. Ballottari M, Girardon J, Dall'Osto L, Bassi R. Evolution and functional properties of photosystem II light harvesting complexes in eukaryotes. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1817: 143-157. doi: [10.1016/j.bbabi.2011.06.005](#) PMID: [21704018](#)
36. Boekema EJ, Van Breemen JFL, Van Roon H, Dekker JP. Conformational Changes in Photosystem II Supercomplexes upon Removal of Extrinsic Subunits. *Biochemistry*. 2000; 39: 12907-12915. PMID: [11041855](#)
37. Boucher N, Carpentier R. Hg²⁺, Cu²⁺, and Pb²⁺ induced changes in photosystem II photochemical yield and energy storage in isolated thylakoid membranes: A study using simultaneous fluorescence and photoacoustic measurements. *Photosynth Res*. 1999; 59: 167-174.
38. Carpentier R. The negative action of toxic divalent cations on the photosynthetic apparatus. In: Pessaraki M, editor. *Handbook of plant and crop physiology*. Marcel Dekker, New York; 2002. pp 764-772.

39. Sigfridsson KGV, Bernat G, Mamedov F, Styring S. Molecular interference of Cd²⁺ with photosystem II. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1659:19-31. PMID: [15511524](#)
40. Dewez D, Geoffroy L, Vernet G, Popovic R. Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*. *Aquat Toxicol*. 2005; 74: 150-159. PMID: [15992939](#)
41. Boisvert S, Joly D, Leclerc S, Govindachary S, Harnois J, Carpentier R. Inhibition of the oxygen evolving complex of photosystem II and depletion of extrinsic polypeptides by nickel. *Biometals*. 2007; 20: 879-889. PMID: [17588196](#)
42. Hasni I, Hamdani S, Carpentier R. Destabilization of the oxygen evolving complex of Photosystem II by Al³⁺. *Photochem Photobiol*. 2013; 89:1135-1142. doi: [10.1111/php.12116](#) PMID: [23789745](#)
43. Kochian LV. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1995; 46: 237-260.
44. Kochian LV, Pineros MA, Hoekenga OA. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant Soil*. 2005; 274: 175-195.
45. Jiang HX, Chen LS, Zheng JG, Han S, Tang N, Smith BR. Aluminum induced effects on photosystem II photochemistry in citrus leaves assessed by the chlorophyll a fluorescence transient. *Tree Physiol*. 2008; 28: 1863-1871. PMID: [19193569](#)
46. Silva S, Pinto G, Dias MC, Correia CM, Moutinho-Pereira J, Pinto-Carnide O, et al. Aluminum longterm stress differently affects photosynthesis in rye genotypes. *Plant Physiol Biochem*. 2012; 54: 105-112. doi: [10.1016/j.plaphy.2012.02.004](#) PMID: [22391128](#)
47. Moustakas M, Ouzounidou G, Eleftheriou EP, Lannoye R. Indirect effects of aluminum stress on the function of the photosynthetic apparatus. *Plant Physiol Biochem*. 1996; 34: 553-560.
48. Li Z, Xing F, Xing D. Characterization of target site of aluminum phytotoxicity in photosynthetic electron transport by fluorescence techniques in Tobacco leaves. *Plant Cell Physiol*. 2012; 53: 1295-1309. doi: [10.1093/pcp/pcs076](#) PMID: [22611177](#)

49. Peixoto HP, Da Matta FM, Da Matta JC. Responses of the photosynthetic apparatus to aluminum stress in two sorghum cultivars. *J Plant Nutr.* 2002; 25: 821-832.
50. Chen LS, Qi YP, Liu XH. Effects of aluminum on light energy utilization and photoprotective systems in citrus leaves. *Ann Bot.* 2005; 96: 35-41. PMID: [15829508](#)
51. Mihailovic N, Drazic G, Vucinic Z. Effects of aluminum on photosynthetic performance in Al-sensitive and Al-tolerant maize inbred lines. *Photosynthetica.* 2008; 46: 476-480.
52. Bernier M, Carpentier R. The action of mercury on the binding of the extrinsic polypeptides associated with the water oxidizing complex of photosystem II. *FEBS Lett.* 1995; 360: 251-254. PMID: [7883042](#)
53. Yruela I, Alfonso M, Baron M, Picorel R. Copper effect on the protein composition of photosystem II. *Physiol Plant.* 2000; 110: 551-557.
54. Fagioni M, D'Amici GM, Timperio AM, Zolla L. Proteomic analysis of multiprotein complexes in the thylakoid membrane upon cadmium treatment. *J Proteome Res.* 2009; 8: 310-326. doi: [10.1021/pr800507x](#) PMID: [19035790](#)
55. Reyes-Diaz M, Inostroza-Blancheteau C, Millaleo R, Cruces EC, Wulff-Zottele AM, Mora MD. Longterm aluminum exposure effects on physiological and biochemical features of Highbush Blueberry cultivars. *J Am Soc Hortic Sci.* 2010; 135: 212-222.
56. Jin SH, Li XQ, Jia XL. Genotypic differences in the responses of gas exchange, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzymes to aluminum stress in *Festuca arundinacea*. *Russ J Plant Physiol.* 2011; 58: 560-566.
57. Nahar S, Carpentier R, Tajmir-Riahi HA. Interaction of trivalent Al and Ga cations with proteins of PSII. Cation binding mode and protein conformation by FTIR spectroscopy. *J Inorg Biochem.* 1997; 65: 245-250.
58. Joly D, Bigras C, Harnois J, Govindachary S, Carpentier R. Kinetic analyses of the OJIP chlorophyll fluorescence rise in thylakoid membranes. *Photosynth Res.* 2005; 84: 107-112. PMID: [16049762](#)

59. Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE. 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*. 1989; 975: 384-394.
60. Berthold DA, Babcock GT, Yocum CF. A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes EPR and electron transport properties. *FEBS Lett*. 1981; 134: 231-234.
61. Zeinalov Y. An equipment for investigations of photosynthetic oxygen production reactions. *Bulg J Plant Physiol*. 2002; 28: 57-67.
62. Messinger J, Seaton G, Wydrzynski T, Wacker U, Renger G. S3 state of the water oxidase in photosystem II. *Biochemistry*. 1997; 36: 6862-6873. PMID: [9188681](#)
63. Kok B, Forbush B, McGloin M. Cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution-I. A linear four step mechanism. *Photochem Photobiol*. 1970; 11: 457-475. PMID: [5456273](#)
64. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680-685. PMID: [5432063](#)
65. Nakatani HY. Photosynthetic oxygen evolution does not require the participation of polypeptides of 16 and 24 kilodaltons. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984; 120: 299-304. PMID: [6712700](#)
66. Rajagopal S, Bukhov NG, Carpentier R. 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*. 2002; 62: 194-200.
67. Allen KD, Staehelin LA. Resolution of 16 to 20 chlorophyll-protein complexes using a low ionic strength native green gel system. *Anal Biochem*. 1991; 194: 214-222. PMID: [1867380](#)
68. Ahmed A, Tajmir-Riahi HA, Carpentier R. A quantitative secondary structure analysis of the 33 kDa extrinsic polypeptide of photosystem II by FTIR spectroscopy. *FEBS Lett*. 1995; 363: 65-68. PMID: [7729557](#)
69. Vandenbussche G, Celercs A, Curstedt T, Johansson J, Jornvall H, Ruysshaert JM. Structure and orientation of the surfactant associated protein C in a lipid bilayer. *Eur J Biochem*. 1992; 203: 201-209. PMID: [1730226](#)

70. Babani F, Lichtenthaler HK. Light-induced and age dependent development of chloroplasts in etiolated barley leaves as visualized by determination of photosynthetic pigments, CO₂ assimilation rates and different kinds of chlorophyll fluorescence ratios. *J Plant Physiol*. 1996; 148: 555-566.
71. Krüger GHJ, Tsimilli-Michael M, Strasser RJ. Light stress provokes plastic and elastic modifications in structure and function of Photosystem II in camellia leaves. *Physiol Plant*. 1997; 101: 265-277.
72. Govindjee. Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll a fluorescence. *Aust J Plant Physiol*. 1995; 22: 131-160.
73. Zhu XG, Govindjee, Baker NR, DeSturler E, Ort DR, Long SP. 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*. 2005; 223: 114-133. PMID: [16411287](#)
74. Boisvert S, Joly D, Carpentier R. Quantitative analysis of the experimental O-J-I-P chlorophyll fluorescence induction kinetics. Apparent activation energy and origin of each kinetic step. *FEBS J*. 2006; 273: 4770-4777. PMID: [16987315](#)
75. Lazár D. The polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. *Funct Plant Biol*. 2006; 33: 9-30.
76. Beauchemin R, Gauthier A, Harnois J, Boisvert S, Govindachary S, Carpentier R. Spermine and spermidine inhibition of photosystem II: disassembly of the oxygen evolving complex and consequent perturbation in electron donation from TyrZ to P680⁺ and the quinone acceptors Q_A⁻ to Q_B⁻. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1767: 905-912. PMID: [17511958](#)
77. Msilini N, Zaghoudi M, Govindachary S, Lachaâl M, Ouerghi Z, Carpentier R. Inhibition of photosynthetic oxygen evolution and electron transfer from the quinone acceptor Q_A⁻ to Q_B by iron deficiency. *Photosynth Res*. 2011; 107: 247-256. doi: [10.1007/s11120-011-9628-2](#) PMID: [21311974](#)
78. Hamdani S, Carpentier R. Interaction of methylamine with extrinsic and intrinsic subunits of photosystem II. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1787: 1223-1229. doi: [10.1016/j.bbabi.2009.05.009](#) PMID: [19477161](#)
79. Krause GH, Weis E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1991; 42: 313-49.

80. Bredenkamp GJ, Baker NR. Modification of excitation energy distribution to photosystem I by protein phosphorylation and cation depletion during thylakoid biogenesis in wheat. *Photosynth Res.* 1990; 23: 111-117. doi: [10.1007/BF00030071](https://doi.org/10.1007/BF00030071) PMID: [24421000](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24421000/)
81. Siffel P, Hunalov I, Rohacek K. Light-induced quenching of chlorophyll fluorescence at 77 K in leaves, chloroplasts and photosystem II particles. *Photosynth Res.* 2000; 65: 219-229. PMID: [16228489](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16228489/)
82. Tang Y, Wen X, Lu C. Differential changes in degradation of chlorophyll-protein complexes of photosystem I and photosystem II during flag leaf senescence of rice. *Plant Physiol Biochem.* 2005; 43: 193-201. PMID: [15820668](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15820668/)
83. Susi H, Byler DM. Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy of enzymes. *Methods Enzymol.* 1986; 130: 290-311. PMID: [3773736](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3773736/)
84. Trewhella J, Liddle WK, Heidorn DB, Strynadka N. Calmodulin and troponin C structures studied by Fourier transform infrared spectroscopy: Effects of Ca²⁺ and Mg²⁺ binding. *Biochemistry.* 1989; 28: 1294-1301. PMID: [2713365](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2713365/)
85. Jackson M, Hafts PI, Chapman D. Fourier transform infrared spectroscopic studies of Ca²⁺-binding proteins. *Biochemistry.* 1991; 30: 9681-9686. PMID: [1911755](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1911755/)
86. De Las Rivas J, Barber J. Structure and thermal stability of photosystem II reaction centres studied by infrared spectroscopy. *Biochemistry.* 1997; 36: 8897-8903. PMID: [9220977](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9220977/)
87. Krimm S, Bandekar J. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides and proteins. *Adv Protein Chem.* 1986; 38: 181-364. PMID: [3541539](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3541539/)
88. He WZ, Newell WR, Haris PI, Chapman D, Barber J. Protein secondary structure of the isolated photosystem II reaction centre and conformational changes studied by Fourier transformation infrared spectroscopy. *Biochemistry.* 1991; 30: 4552-4559. PMID: [1850626](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1850626/)
89. Surewicz WK, Mantsch HH. New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra. *Biochim Biophys Acta.* 1988; 952: 115-130. PMID: [3276352](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3276352/)
90. Sandusky PO, Yocum CF. The chloride requirement for photosynthetic oxygen evolution: factors affecting nucleophilic displacement of chloride from the oxygen-evolving complex. *Biochim Biophys Acta.* 1986; 849: 85-93.

91. V-Gorkom HJ, Yocum CF. The calcium and chloride cofactors. In: Wydrzynski TJ, Satoh K, editors. *Photosystem II: The Light-Driven Water: Plastoquinone Oxidoreductase*. Springer, Dordrecht; 2005. pp. 307-327.
92. Wyman AJ, Yocum CF. Structure and activity of the photosystem II manganese stabilizing protein: role of the conserved disulfide bond. *Photosynth Res*. 2005; 85: 359-372. PMID: [16170637](#)
93. Krieger A, Weis E, Demeter S. Low pH-induced Ca^{2+} ion release in the water-splitting system is accompanied by a shift in the midpoint redox potential of the primary quinone acceptor Q_A . *Biochim Biophys Acta*. 1993; 1144: 411-418.
94. Putrenko II, Vasilev S, Bruce D. Modulation of flash induced photosystem II fluorescence by events occurring at the water oxidizing complex. *Biochemistry*. 1999; 38: 10632-10641. PMID: [10451357](#)
95. Rashid A, Bernier M, Pazdernick L, Carpentier R. Interaction of Zn^{2+} with the donor side of photosystem II. *Photosynth Res*. 1991; 30: 123-130. doi: [10.1007/BF00042010](#) PMID: [24415261](#)
96. Rashid A, Camm EL, Ekramoddoula AKM. Molecular mechanism of action of Pb^{2+} and Zn^{2+} on water oxidizing complex of photosystem II. *FEBS Lett*. 1994; 350: 296-298. PMID: [8070582](#)
97. Vass I, Szilard A, Sicora C. Adverse effects of UV-B light on the structure and function of the photosynthetic apparatus. In: Pessaraki M editor. *Handbook of Photosynthesis (2nd Edition)*. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton-London-New York-Singapore; 2005. pp. 827-844.
98. Nedunchezian N, Kulandaivelu G. Evidence for the ultraviolet-B (280-320 nm) radiation induced structural reorganization and damage of photosystem II polypeptides in isolated chloroplasts. *Physiol Plant*. 1991; 81: 558-562.
99. Shevela DN, Khorobrykh AA, Klimov VV. Effect of bicarbonate on the water-oxidizing complex of photosystem II in the super-reduced S-states. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1757: 253-261. PMID: [16797261](#)
100. Pospíšil P, Michael H, Dittmer J, Solè VA, Dau H. Stepwise transition of the tetra-manganese complex of photosystem II to a binuclear $\text{Mn}_2(\text{l-O})_2$ complex in response to a temperature jump: a timeresolved structural investigation employing X-ray absorption spectroscopy. *Biophys J*. 2003; 84: 1370-1386. PMID: [12547817](#)

101. Barra M, Haumann M, Dau H. Specific loss of the extrinsic 18 kDa protein from photosystem II upon heating to 47 degrees C causes inactivation of oxygen evolution likely due to Ca release from the Mncomplex. *Photosynth Res.* 2005; 84: 231-237. PMID: [16049779](#)
102. Renger G, Gleiter HM, Haag E, Reifarth F. Photosystem II: Thermodynamics and kinetics of electron transport from Q_A^- to Q_B (Q_B^-) and deleterious effects of copper (II). *Z Naturforsch.* 1993; 48: 234-240.
103. Jegerschöld C, Arellano JB, Schröder WP, Van Kan PJM, Baron M, Styring S. Cu(II) inhibition of the electron transfer through photosystem II studied by EPR spectroscopy. *Biochemistry.* 1995; 34: 12747-12754. PMID: [7548028](#)
104. Sersen K, Kralova K, Bumbalova A, Svajlenova O. The effect of Cu(II) ions bound with tridentate Schiff base ligands upon the photosynthetic apparatus. *J Plant Physiol.* 1997; 151: 299-305.
105. Jegerschöld C, MacMillan F, Lubitz W, Rutherford AW. Effects of copper and zinc ions on photosystem II studied by EPR spectroscopy. *Biochemistry.* 1999; 38: 12439-12445. PMID: [10493813](#)
106. Lazarova D, Stanoeva D, Popova A, Vasilev D, Velitchkova M. UV-B induced alteration of oxygen evolving reactions in pea thylakoid membranes as affected by scavengers of reactive oxygen species. *Biol Plantarum.* 2014; 58: 319-327.
107. Ait Ali N, Dewez D, Didur O, Popovic R. Inhibition of photosystem II photochemistry by Cr is caused by the alteration of both D1 protein and oxygen evolving complex. *Photosynth Res.* 2006; 89: 81-87. PMID: [16969717](#)
108. Ralph PJ, Burchett MD. Photosynthetic response of *Halophila ovalis* to heavy metal stress. *Environ Pollut.* 1998; 103: 91-101.
109. Mallick N, Mohn FH. Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2003; 55: 64-69. PMID: [12706394](#)
110. Ekmekçia Y, Tanyolaçb D, Ayhana B. Effects of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars. *J Plant Physiol.* 2008; 165: 600-611. PMID: [17728009](#)
111. Küpper H, Šetlík I, Spiller M, Küpper FC, Prášil O. Heavy metal-induced inhibition of photosynthesis: targets of in vivo heavy metal chlorophyll formation. *J Phycol.* 2002; 38: 429-441.

112. Janik E, Maksymiec W, Mazur R, Garstka M, Gruszecki WI. Structural and Functional Modifications of the Major Light-Harvesting Complex II in Cadmium or Copper Treated Secale cereal. *Plant Cell Physiol.* 2010; 51: 1330-1340. doi: [10.1093/pcp/pcq093](https://doi.org/10.1093/pcp/pcq093) PMID: [20627948](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20627948/)
113. Kochubey MS. Changes in antenna of photosystem II induced by short-term heating. *Photosynth Res.* 2010; 106: 239-246. doi: [10.1007/s11120-010-9599-8](https://doi.org/10.1007/s11120-010-9599-8) PMID: [21140217](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21140217/)
114. Nahar S, Tajmir-Riahi HA. Complexation of Heavy Metal Cations Hg, Cd, and Pb with Proteins of PSII: Evidence for Metal-Sulfur Binding and Protein Conformational Transition by FTIR Spectroscopy. *J Colloid Interface Sci.* 1996; 178: 648-656.

FIGURES CAPTIONS

Fig 1. Inhibition of oxygen evolution activity in PSII submembrane fractions under effect of different concentrations of Al^{3+} . Each point represents the mean \pm SD of nine independent measurements obtained from three different samples. Details are given in "Materials and Methods" section.

Fig 2. Effect of various Al^{3+} concentrations on the period of oscillation of the yield of oxygen evolution. All traces have been normalized to the third flash in the control sample. Each trace is the average of nine independent measurements with samples from three different batches.

Fig 3. SDS-PAGE polypeptide profile of PSII submembrane fractions treated with different concentrations of Al^{3+} . Lane 1, molecular weight standards; lane 2, control PSII; lane 3, 1 mM Al^{3+} treated PSII; lane 4, 2 mM Al^{3+} treated PSII; lane 5, 4 mM Al^{3+} treated PSII; lane 6, 5 mM Al^{3+} treated PSII; lane 7, supernatant of the Tris-alkali treated PSII; lane 8, Tris-alkali treated PSII. Numbers on the left side indicate the masses (in KDa) of molecular markers. See details in the "Materials and methods" section.

Fig 4. Effect of the addition of various Al^{3+} concentrations in PSII submembrane fractions on the Chl fluorescence parameters. (A) F_0 ; (B) F_m ; (C) F_v/F_0 and (D) F_v/F_m . The data are the mean \pm SD of nine independent measurements.

Fig 5. OJIP traces of Chl Fluorescence induction: (A) of PSII submembrane fractions treated with different concentrations of Al^{3+} . (1) Control, (2) 1 mM, (3) 1.5 mM, (4) 2 mM, (5) 3 mM, (6) 4 mM, (7) 5 mM; **(B) normalized at both initial and maximal intensities.** Each curve is the average of nine independent measurements. See details in the Materials and Methods.

Fig 6. Changes in the Low temperature (77 K) chlorophyll fluorescence emission spectra of thylakoids membranes exposed to different Al^{3+} concentrations. The slit widths for excitation and emission were set at 5 and 2.5 nm, respectively. Spectra were

normalized at 732 nm. The presented spectra are representative of three separate experiments.

Fig 7. Native green gel electrophoresis of chlorophyll-protein complexes isolated from spinach thylakoid membranes treated with Al³⁺ at various concentrations.

Lane 1: Control; lane 2: 1 mM Al³⁺ treated thylakoid membranes; lane 3: 2 mM Al³⁺ treated thylakoid membranes; lane 4: 3 mM Al³⁺ treated thylakoid membranes; lane 5: 4 mM Al³⁺ treated thylakoid membranes; lane 6: 5 mM Al³⁺ treated thylakoid membranes. Symbols on the left side indicate the following separated bands: PSI-LHCI, a number of large PSI complexes with attached LHCI antenna; PSI core, core protein complexes of PSI; PSII core, core protein complexes of PSII; LHCII OC, oligomeric LHCII complexes; LHCII MC, monomeric LHCII complexes; SC, small complexes; FP, free pigments. The electrophoretic patterns are representative for three independent experiments.

Fig 8. Second derivative resolution enhancement and curve-fitted amide I region (1700-1600 cm⁻¹) of IR spectra of PSII proteins in the presence of Al³⁺ at various concentrations. The presented spectra are representative of three separate experiments.

Fig 9. Variation of the composition of the main conformation components (%) of PSII proteins in spinach PSII submembrane fractions treated with various Al³⁺ concentrations. The data are the mean ± SD of three independent measurements.

Supporting Information

S1 Fig. Fluorescence emission spectra at room temperature of isolated thylakoid membranes treated with different Al³⁺ concentrations. The slit widths for excitation and emission were set at 5 and 2.5 nm, respectively. The Chl content of the samples was adjusted to 5 µg.ml⁻¹. The presented spectra are representative of three separate experiments.

Table 1. Effect of the addition of Al³⁺ concentrations on the oxygen flash yields parameters for isolated thylakoid membranes treated with various concentrations of Al³⁺.

Parameters, %	Al ³⁺ concentration, mM						
	0	0.5	1	1.5	2	3	4
Misses (±2%)	13.9	13.8	13.9	14.6	14.9	16.9	20.3
Hits (±3%)	84.9	84.3	83.5	82.7	82.1	79.3	75.8
Double-Hits (±1%)	1.3	2.0	2.5	2.7	3.0	3.7	3.8

The data are average ± SD from nine independent experiments.

Figure 1

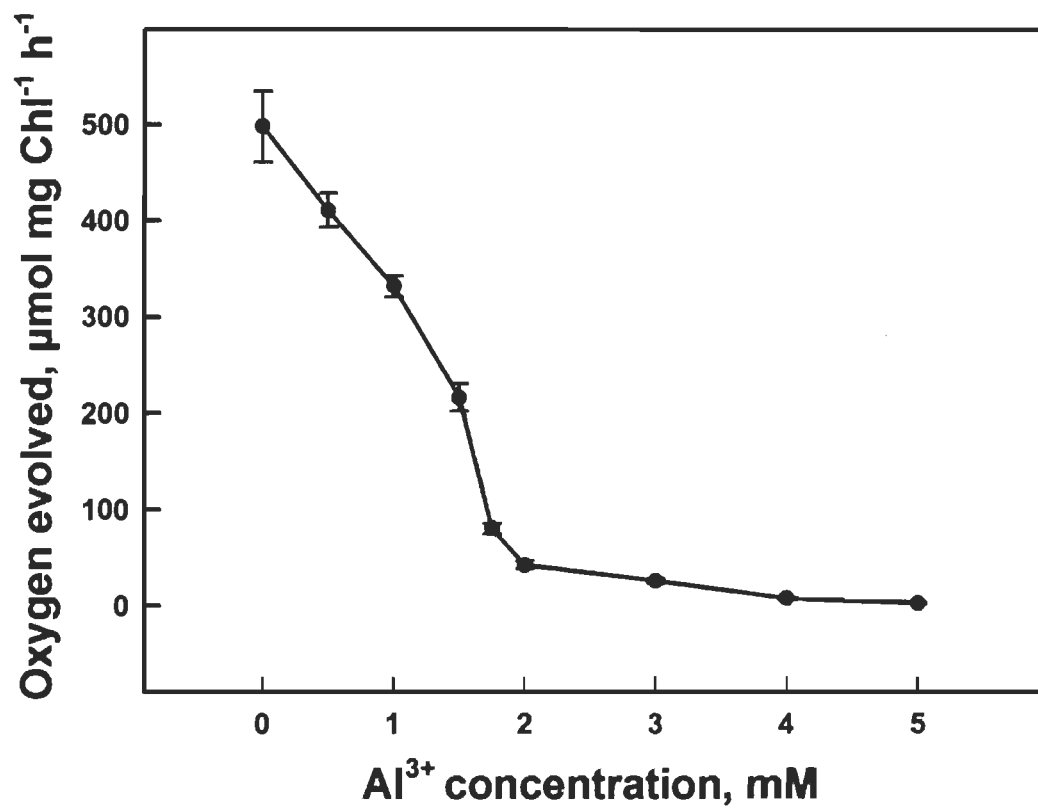


Figure 2

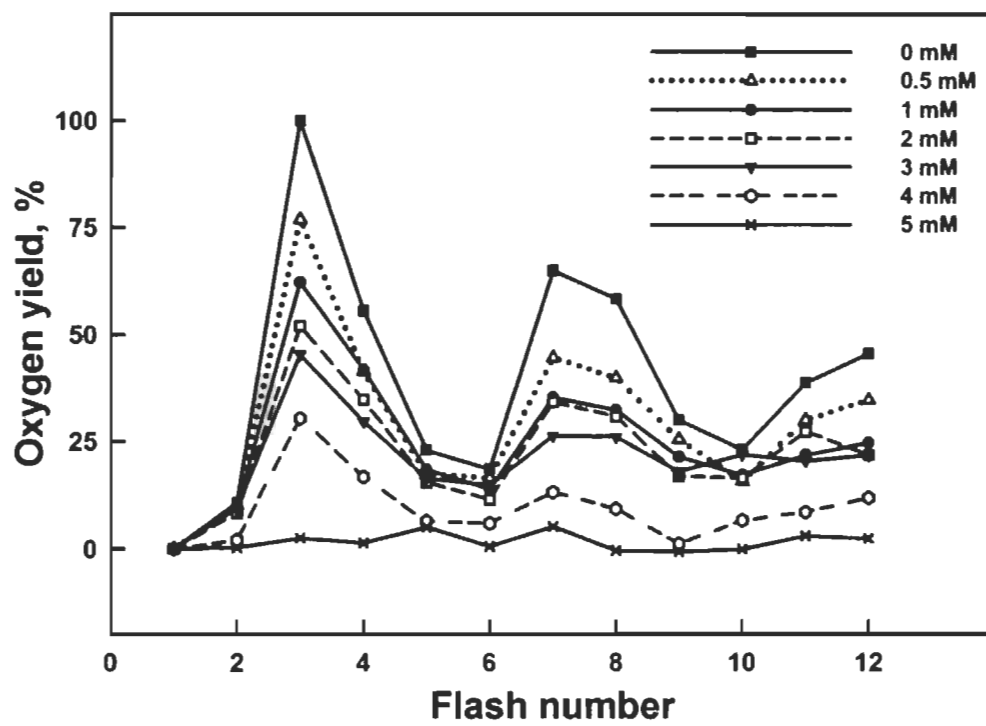


Figure 4

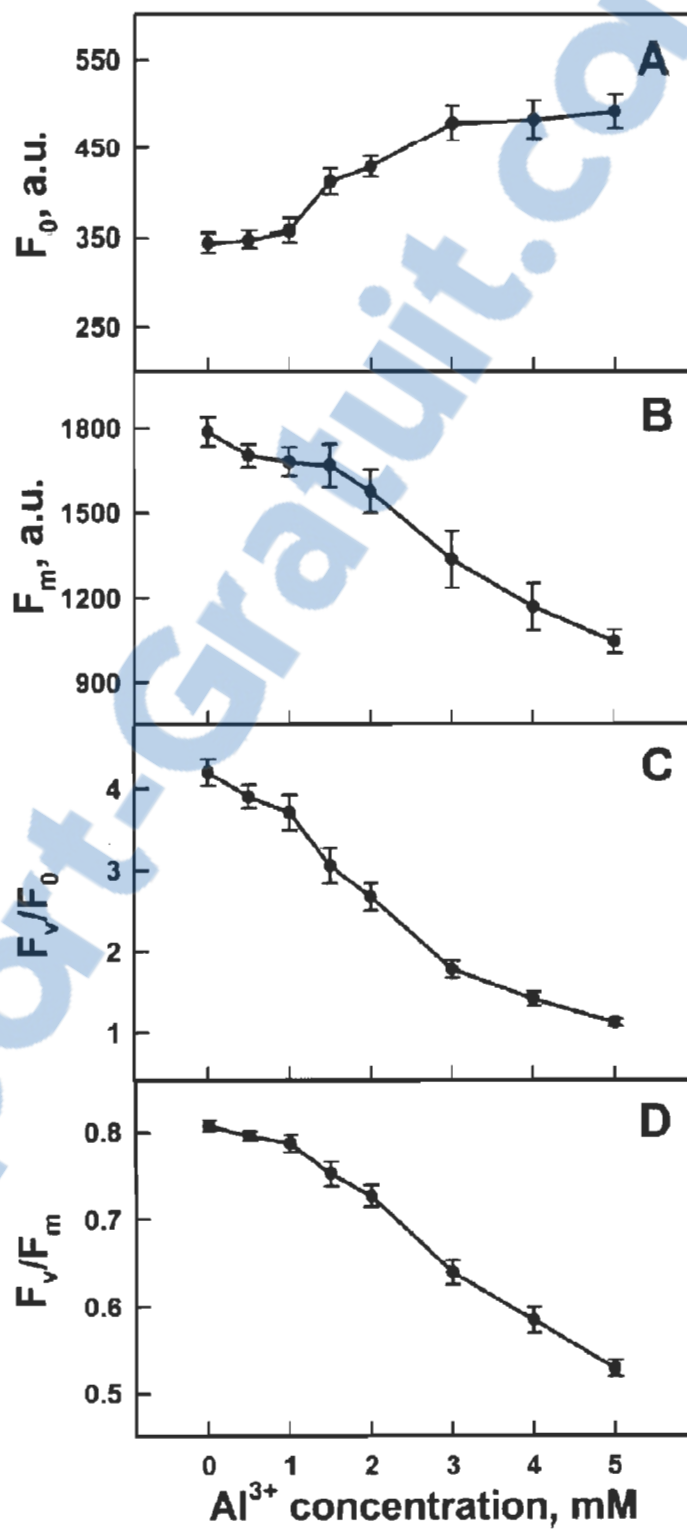


Figure 5

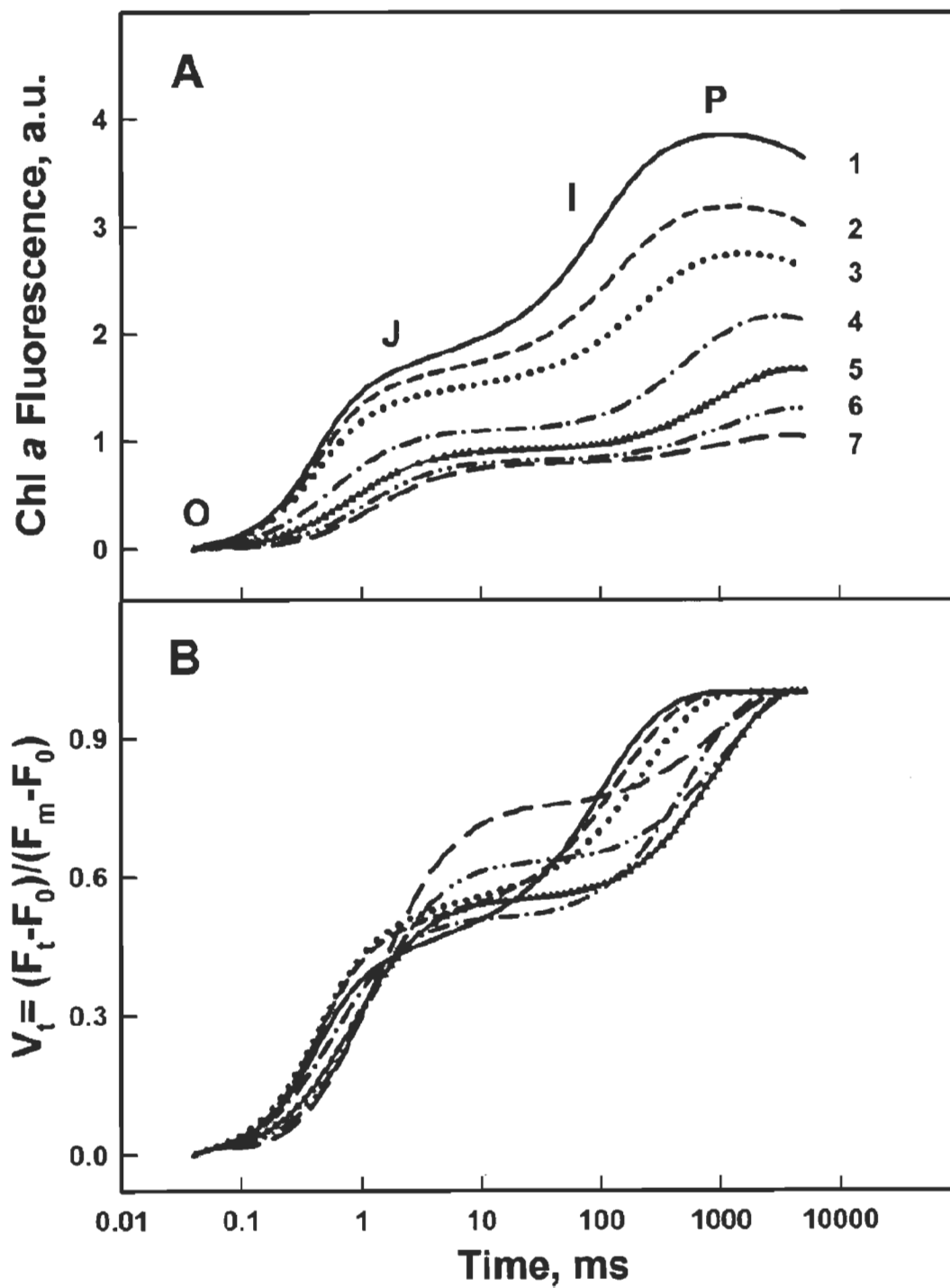


Figure 6

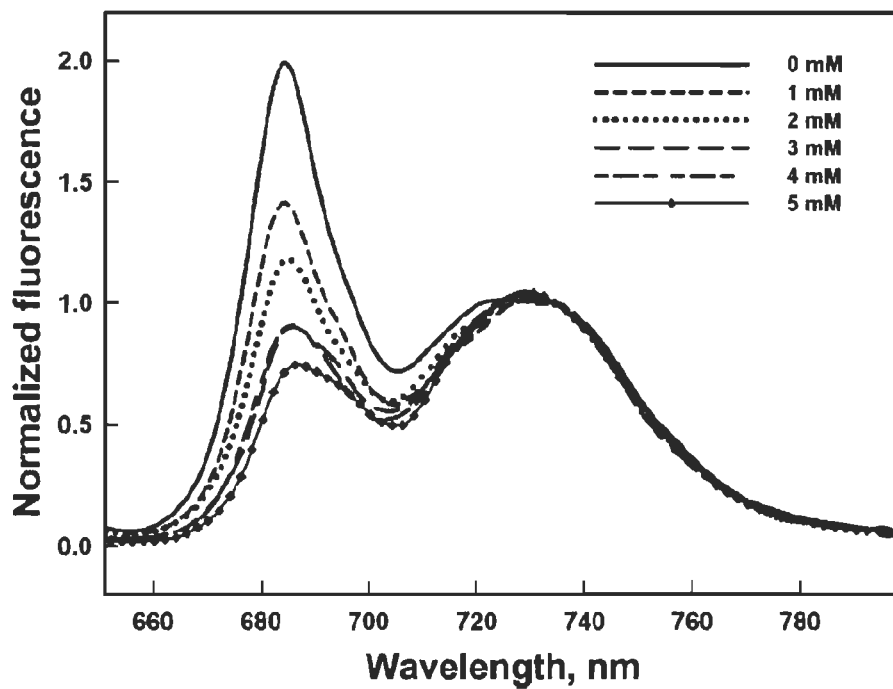


Figure 7

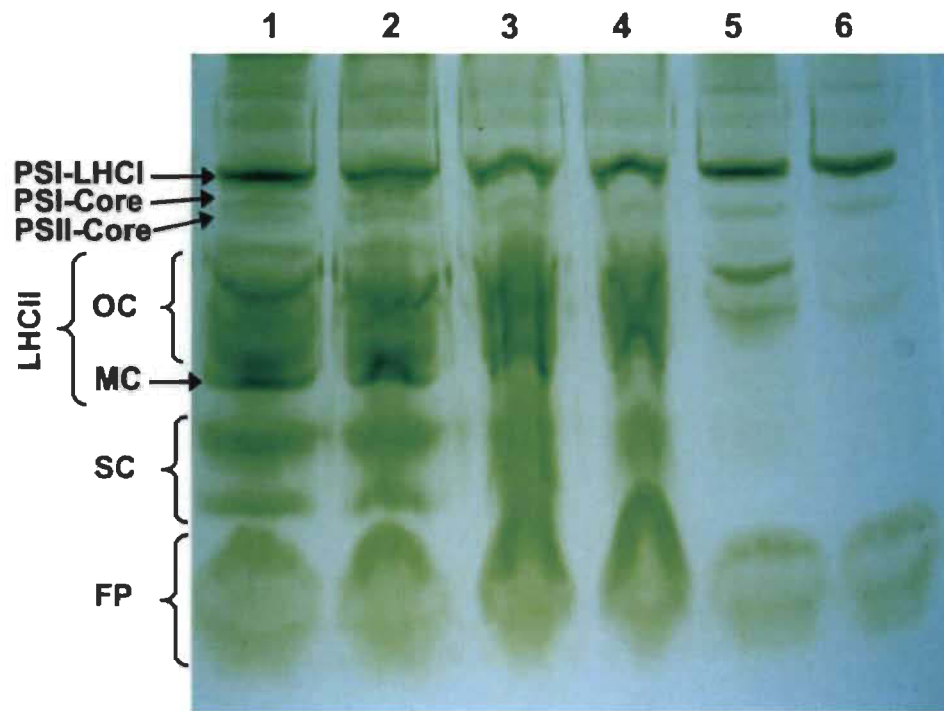


Figure 8

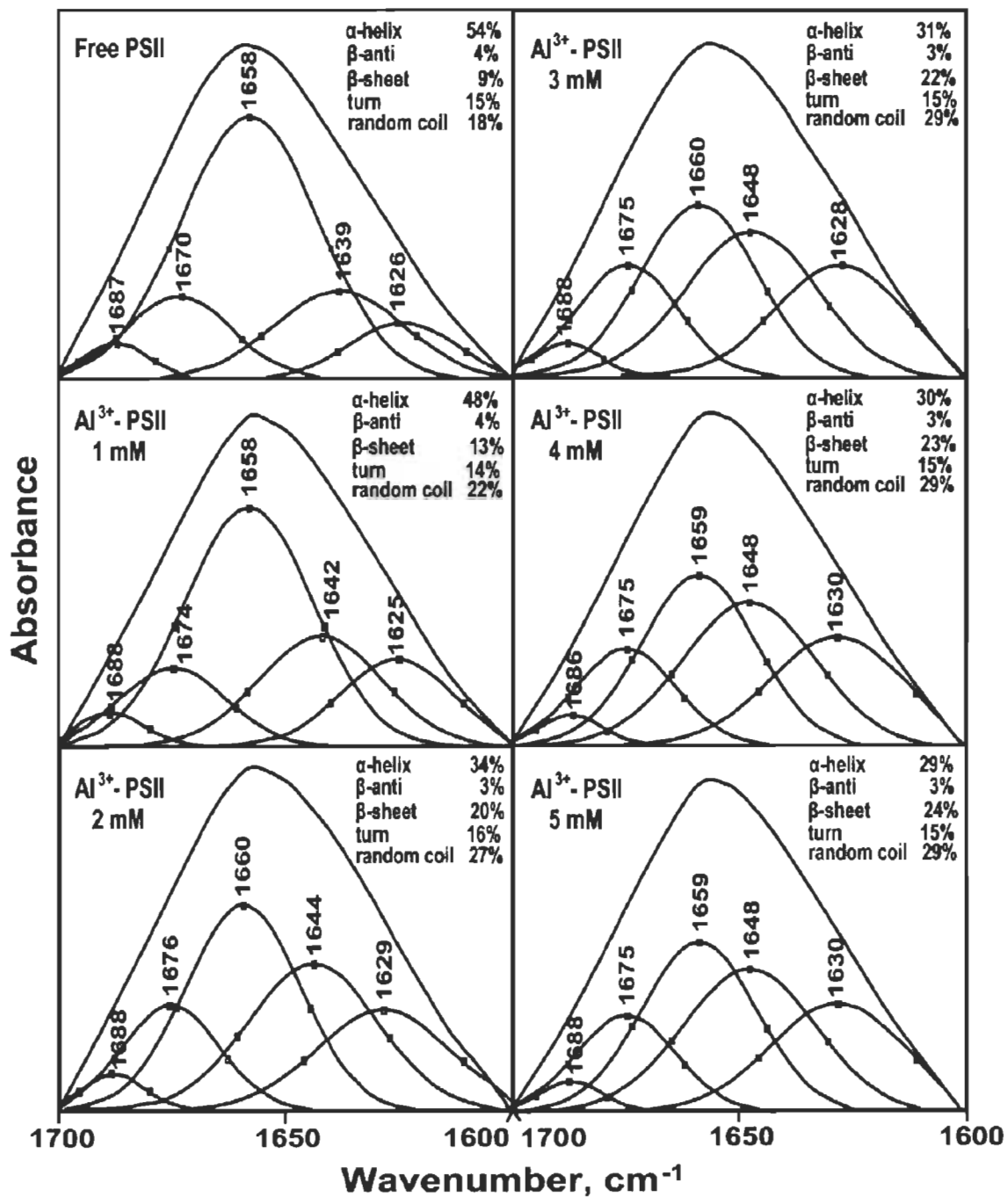


Figure 9

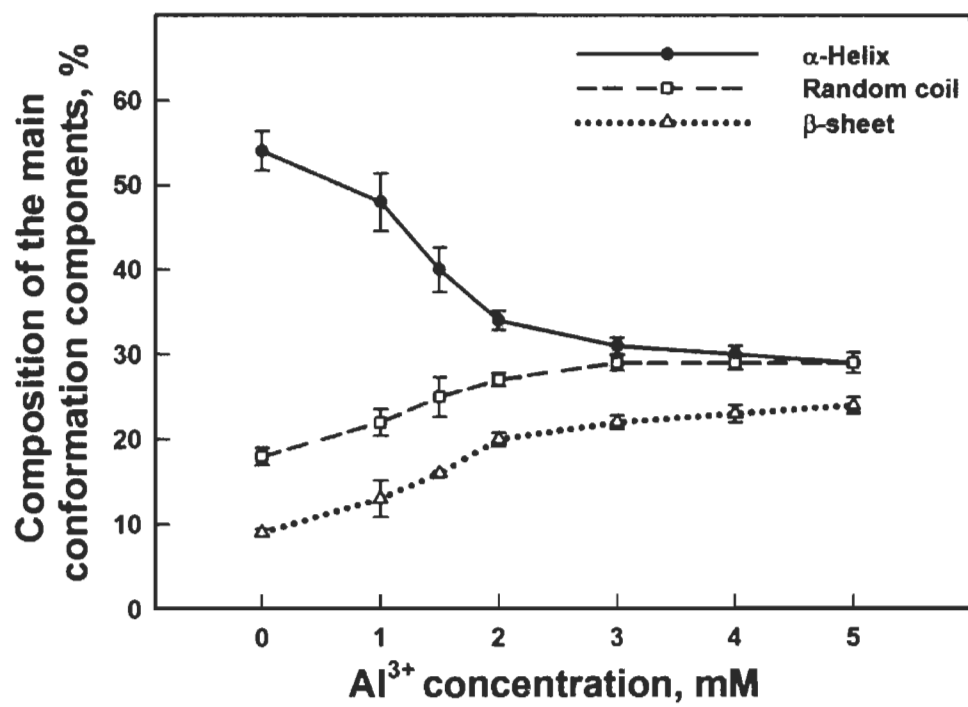
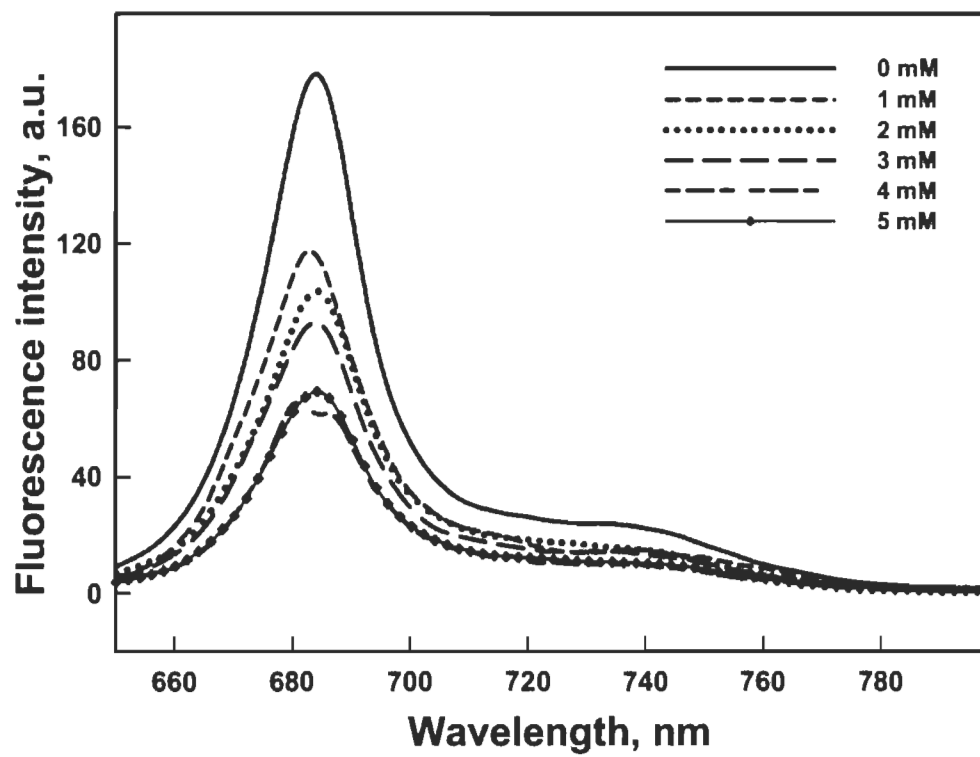


Figure S1



CHAPITRE IV

CHARACTERIZATION OF THE STRUCTURAL CHANGES AND PHOTOCHEMICAL ACTIVITY OF PHOTOSYSTEM I UNDER Al^{3+} EFFECT

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en 2015 dans la revue : « Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology » : Imed Hasni, Najoua Msilini, Saber Hamdani, Heidar-Ali Tajmir-Riahi, Robert Carpentier « Characterization of the structural changes and photochemical activity of photosystem I under Al^{3+} effect », vol. 149: 292-299.

4.1 Résumé

L'effet toxique d' Al^{3+} sur l'activité photochimique du photosystème I (PSI) a été étudié en se basant sur l'interaction d' Al^{3+} avec les membranes de thylakoïdes et les fractions membranaires enrichies en PSI. À cet effet, différentes techniques biophysiques et biochimiques telles que la mesure de la consommation d' O_2 , le changement d'absorbance à 820 nm, l'émission de la fluorescence chlorophyllienne à basse température (77 K), l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE et la spectroscopie FTIR ont été utilisées pour caractériser les sites et les modes d'action de ce cation au niveau du complexe de PSI. Nos résultats ont montré que la concentration en Al^{3+} , supérieure à 3 mM, induit des changements dans l'état redox de P700 reflétés par l'augmentation de l'amplitude de la phase de photooxydation du P700 à l'état stationnaire et un retard du taux de re-réduction de P700 caractérisé par une phase de déclin plus lente, ce qui témoigne que l' Al^{3+} a exercé une action inhibitrice sur le côté donneur du PSI, plus particulièrement au niveau du PC. Par ailleurs, les résultats de photooxydation du P700 mesurée en présence de DCMU avec ou sans MV suggèrent que la même gamme de concentrations d' Al^{3+} altère le CR du PSI, ce qui est démontré par la diminution de la quantité de la population active du P700. De même, Al^{3+} perturbe la séparation de charge entre P700 et A_0 , le premier accepteur d'électrons,

entraînant ainsi l'inhibition du transfert d'électrons au niveau du côté accepteur de PSI. Ces effets inhibiteurs d' Al^{3+} ont été accompagnés d'une réduction du transfert de l'énergie d'excitation des antennes collectrices de lumière (LHCI) au CR du PSI, suite à la déconnexion des antennes LHCI comme démontré par l'augmentation de l'amplitude relative des spectres d'émission de la fluorescence chlorophyllienne à basse température (77 K). Tous ces résultats sont associés avec les mesures de FTIR indiquant des changements conformationnels des structures secondaires des polypeptides du complexe de PSI où 25 % d'hélices α ont été transformées en feuillets β , feuillets β -antiparallèles et coudes β . Ces changements structuraux au niveau des polypeptides du complexe de PSI sont à l'origine de l'inhibition de l'activité photochimique du PSI, y compris l'inhibition du transport d'électrons à travers les deux côtés donneur et accepteur du PSI.

4.2 Troisième article scientifique

Characterization of the structural changes and photochemical activity of photosystem I under Al³⁺ effect

Imed **Hasni**^a, Najoua **Msilini**^c, Saber **Hamdani**^b, Heidar-Ali **Tajmir-Riahi**^a,
Robert **Carpentier**^{a,*}

^a Groupe de Recherche en Biologie Végétale, Département de Chimie, Biochimie et Physique, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Qc G9A 5H7, Canada

^b Plant Systems Biology Group, Partner Institute of Computational Biology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China

^c Laboratory of Physiology and Biochemistry of Salt Tolerance in Plants, Faculty of Sciences of Tunis, Campus University, 1060, Tunisia

*Corresponding author: Robert.Carpentier@uqtr.ca (R. Carpentier).

Keywords: Aluminum, Light harvesting complex I, Oxygen uptake activity, P700, Photosystem I, Protein secondary structure.

Abbreviations: A₀ and A₁, primary and secondary electron acceptors of PSI, respectively; Chl, chlorophyll; Cyt b₆/f, cytochrome b₆/f complex; DCMU, 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea; DCPIPH₂, reduced 2,6-dichlorophenol indophenols; DQH₂, duroquinol (reduced duroquinone); ΔA₈₂₀, absorbance changes at 820 nm; FR light, Far red light; FTIR, Fourier Transform Infra Red; F_A, F_B and F_x, [4Fe-4S] iron-sulfur clusters of the PSI electron acceptor chain; LHCI, light harvesting complex I; MV, methyl viologen; NaN₃, sodium azide; P700, primary electron donor of PSI; PC, plastocyanin; PSI, photosystem I; PSII, photosystem II; RC, reaction center; TMPD, N,N,N',N'-tetramethylphenylenediamine.

Highlights

- Inhibitory sites of Al^{3+} were determined in PSI complex.
- Al^{3+} exerts multiple effects on the electron transport chain of PSI.
- Al^{3+} induces a reduction in the energy transfer from the LHCI to the PSI RC.
- Al^{3+} induced conformational change of the protein secondary structures in PSI.
- Structural changes are associated with alterations of PSI photochemical activity.

ABSTRACT

The photochemical activity of photosystem I (PSI) as affected by Al^{3+} was investigated in thylakoid membranes and PSI submembrane fractions isolated from spinach. Biophysical and biochemical techniques such as oxygen uptake, light induced absorbance changes at 820 nm, chlorophyll fluorescence emission, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and FTIR spectroscopy have been used to analyze the sites and action modes of this cation on the PSI complex. Our results showed that Al^{3+} above 3 mM induces changes in the redox state of P700 reflected by an increase of P700 photooxidation phase and a delay of the slower rate of P700 re-reduction which reveals that Al^{3+} exerted an inhibitory action at the donor side of PSI especially at plastocyanin (PC). Furthermore, results of P700 photooxidation monitored in the presence of DCMU with or without MV suggested that the same range of Al^{3+} concentrations impairs the photochemical reaction centers (RC) of PSI, as shown by the decline in the amount of active population of P700, and disrupts the charge separation between P700 and the primary electron acceptor A_0 leading to the inhibition of electron transfer at the acceptor side of PSI. These inhibitory actions were also accompanied by an impairment of the energy transfer from light harvesting complex (LHCI) to RC of PSI, following the disconnection of LHCI antenna as illustrated by an enhancement of chlorophyll fluorescence emission spectra at low temperature (77 K). The above results coincided with FTIR measurements that indicated a conformational change of the protein secondary structures in PSI complex where 25% of α -helix was converted into β -sheet, β -antiparallel and turn structures. These structural changes in PSI complex proteins are

closely related with the alteration photochemical activity of PSI including the inhibition of the electron transport through both acceptor and donor sides of PSI.

INTRODUCTION

In higher plant, photosystem I (PSI), a multisubunit pigment-protein complex embedded in the thylakoid membranes of the chloroplast, catalyzes the light-driven electron transfer from plastocyanin (PC) to ferredoxin (Fd) [1,2]. The PSI core complex contains several transmembrane and stromal protein subunits denoted PsaA to PsaN [3-5]. It has been shown that the transmembrane intrinsic polypeptides are rich in α -helices among which 11 transmembrane α -helices are incorporated in PsaA and PsaB subunits [4,6]. Moreover, major loop regions contain α -helices and β -sheet structures. However, transmembrane α -helices are absent from the PsaC, PsaD and PsaE subunits [6]. Besides that, P700, a primary electron donor that consists of a dimer of chlorophyll *a* molecules, and five different electron carriers involved in photochemistry, namely A_0 , A_1 , F_x (iron-sulfur center X) located in PsaA and PsaB protein subunits, and F_A , F_B (iron-sulfur centers A, B) located in PsaC protein are included in the PSI core complex [7].

The PSI core complex is surrounded by peripheral antenna which consists of nuclear encoded chlorophyll binding proteins (Lhca) and form a light harvesting complex (LHCI) responsible for the light harvesting in PSI complex. LHCI is a membrane protein which binds chlorophyll *a/b* (Chl *a/b*) and carotenoids. It has been considered as an antenna complex able to absorb light energy and transfer it to the reaction center (RC) of PSI. LHCI is composed of four Lhca subunits (Lhca1, Lhca2, Lhca3, and Lhca4) that are assembled into two functional heterodimers: Lhca2,3 and Lhca1,4 which both contained red Chl forms [8-13].

Photochemical activity of PSI consists of harvesting photons and using their energy for electron transfer through a series of redox centers. After absorption of the photons by pigments in LHCI antenna complex, the excitation energy is transferred

through antenna pigment molecules to the RC, P700, located in PsaA/B proteins of PSI core complex leading to the formation of the excited state P700^{*}. This state of P700 (P700^{*}) is followed by a charge separation, which reduces the primary electron acceptor A₀ (a Chl *a* molecule). On the acceptor side, one electron is transferred from the reduced A₀ molecule to the secondary electron acceptor A1 (a phylloquinone molecule) and then finally to the iron-sulfur clusters (F_x, F_A and F_B) leading to the reduction of the soluble ferredoxin located at the stromal side [3,14,15]. In parallel, the formed P700⁺ radical is rapidly reduced by PC, a luminal mobile protein that receives electrons from cytochrome b₆/f (Cyt b₆/f) [3,15-17].

PSI is considered to be sensitive to various environmental stresses [18-24,27-29]. Farhat et al. (2015) [23] reported that the Mg²⁺ deficiency stress applied to *Sulla carnosa* plants leaves causes an impairment of PSI photochemical activity accompanied by a significant reduction in the abundance of the LHCI antenna and PsaA polypeptides of PSI RC. These results are correlated with a decrease in the relative amount of oxidizable P700. Indeed, Hermans et al. (2004) [24] associated the decrease of the P700 photooxidation amplitude to the loss of PSI centers in Mg deficient sugar beet leaves. Further, several studies showed that PSI complex is also one of the targets of several toxic divalent metal cations such as Cd²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺ and Pb²⁺. It has been reported that these cations affect photochemical activity, inhibit electron transport between PC and P700 at the donor side, decreased the active P700 content, alter the LHCI antenna and cause a conformational changes of the secondary structure polypeptides of PSI [18,22, 25-29].

Among the metal cation, Al³⁺ species, a soluble form of aluminum released in acid soils solution, is considered one of the major environmental stresses [30]. Under its trivalent cationic form, Al³⁺ acts as a highly toxic non-essential element for plants growth causing a number of adverse effects on physiological and biochemical processes, especially the inhibition of photosynthetic activity. At this level, it was shown that Al³⁺ inhibits photosynthetic electron transport in photosystem II (PSII), affects the PSII RC, destabilizes the oxygen evolution complex (OEC), impairs light harvesting complex

(LHCII) antenna of PSII and induces a conformational changes of the secondary structure polypeptides of PSII [31-38].

Although numerous studies have reported detailed information about the target and the action mode of Al^{3+} on PSII, our understanding of the mechanisms of action of Al^{3+} at PSI complex remains quite limited. To our knowledge, there is no report available regarding the effect of Al^{3+} on activity and structural organization of PSI in higher plant leaves.

In this context, the present study is the first initiative to analyze the interaction of this toxic cation (Al^{3+}) at various concentrations with PSI submembrane fractions isolated from spinach to investigate its sites and modes of action on the PSI complex. For this purpose, different biophysical and biochemical techniques have been used. Our results revealed that electron transfer at the donor side of PSI, the amount of active photooxidizable P700 and the charge separation between P700 and the electron carriers at the acceptor side of PSI were affected. Moreover, a disconnection of LHCI antenna complex and a conformational change in the polypeptides secondary structure of the PSI complex have been noted.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of thylakoid membranes

Thylakoid membranes were isolated from fresh spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves, obtained from a local market, according to Joly et al. (2005) [39]. The resultant pellet was finally resuspended in a medium containing 20 mM Hepes-NaOH (pH 7.6), 400 mM sucrose, 10 mM NaCl, 20 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, and 20 mM KCl and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in the dark until use. The Chl content was determined as described in Porra et al. (1989) [40].

Isolation of PSI submembrane fractions

PSI submembrane fractions were isolated from fresh spinach leaves obtained from a local market according to the procedure of Peters et al. (1983) [41] with some modifications [42]. The isolated fractions with 1 mg of Chl.ml⁻¹ were finally suspended in a medium containing 20 mM Tricine-KOH (pH 7.8), 10 mM NaCl, 10 mM KCl, and 5 mM MgCl₂ and stored in the dark at -80 °C until use. The obtained PSI submembrane fractions, with about 260 Chl/ RC, contain all the components of PSI complex including the Cyt b₆/f complex and PC [41-43]. Chl concentration was calculated following the procedure outlined in Porra et al. (1989) [40].

Oxygen uptake activity measurements

The rate of oxygen uptake in isolated thylakoid membranes samples was performed with Clark type electrode at 24 °C under continuous saturating white light using Oxylab system (Hansatech Instrument, Norfolk, England) as previously described in Carpentier et al. (1984) [44]. The assay medium contained 20 mM Tricine-KOH (pH 7.8), 10 mM KCl, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 50 µM 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU), 0.1 mM DCPIPH₂, an artificial electron donor of PSI at Cyt b₆/f [45], 0.5 mM methyl viologen (MV) (an artificial electron acceptor of PSI), 1 mM NaN₃, 1 mM sodium ascorbate. To more specify the site(s) of action of Al³⁺ at the electron transport chain of PSI, especially at the donor side of PSI, two other different artificial electron donors, DQH₂ and TMPD are used. 0.1 mM of TMPD, an artificial electron donor of PSI at PC [45], was added to the same reaction mixture described above which contained 20 mM Tricine-KOH (pH 7.8), 10 mM KCl, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 50 µM DCMU, 0.5 mM MV, 1 mM NaN₃, 1 mM sodium ascorbate. The reaction mixture used for assay of reduced duroquinone (DQH₂), an artificial electron donor of PSI at PQ pool [46], consisted of 20 mM Tricine-KOH (pH 7.8), 10 mM KCl, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 50 µM DCMU, 0.5 mM MV, 1 mM NaN₃ and 1 mM DQH₂. DQH₂ was prepared immediately before use according to Izawa and Pan (1978) [47]. In all the assays thylakoid membranes at 11 µg Chl.ml⁻¹ and the specified Al³⁺ concentrations were used.

Fluorescence measurements

Fluorescence emission spectra from isolated PSI submembrane fractions treated with different Al^{3+} concentrations were performed at low temperature (77 K) in the presence of 60% glycerol as described previously in Rajagopal et al. (2002) [48] using the Perkin-Elmer LS55 spectrofluorimeter equipped with a red-sensitive photomultiplier R928 (Woodbridge, ON, Canada). Chl fluorescence was excited at 436 nm and emission spectra were detected from 650 to 800 nm. The excitation and emission spectral widths were fixed at 5 and 2.5 nm, respectively. The Chl content of the samples was adjusted to $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Emission spectra were corrected according to the photomultiplier sensitivity using the correction factor spectrum provided by Perkin-Elmer.

Measurements of P700 redox state

P700 Photooxidation and dark reduction of P700^+ , an indicator of redox changes of P700, were measured, at room temperature, as light induced absorbance changes at 820 nm ($\Delta\text{A}820$) using a PAM-101 fluorometer (Walz, Effeltrich, Germany) equipped with ED-P700DW, a dual-wavelength emitter-detector unit. The ED-P700DW unit detects strictly the differential absorbance changes peaking at 820 nm ascribed for the P700^+ radical absorption and removes the PC absorbance changes [49]. Far-red light of $78 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, applied especially to oxidize P700, was obtained by passing the beam from a Fiber-Lite light source (Microview, Thornhill, ON, Canada) through a RG-9 filter (Schott, Mainz, Germany). The signals of absorbance changes ($\Delta\text{A}820$) were recorded with a computer connected to the PAM Data Acquisition System PDA-100 (Walz, Effeltrich, Germany) and the sampling rate was 3 ms/point. The measurements were performed in an assay medium contained 20 mM HEPES-NaOH (pH 7.6), 20 mM KCl, 10 mM NaCl, 2 mM MgCl_2 and thylakoid membranes at a concentration of $500 \mu\text{g Chl}\cdot\text{ml}^{-1}$ subjected to various concentrations of Al^{3+} and at different treatments: (1) in the presence of DCMU (100 μM) alone, (2) in the presence of DCMU (100 μM) together with MV (50 μM), or (3) without the both DCMU (100 μM) and MV (50 μM). DCMU and MV were added to prevent reduction of P700 by electrons coming from

PSII and to prevent charge recombination between reduced acceptor side and P700⁺, respectively.

Analysis of polypeptide composition of PSI complex by SDS-PAGE

The polypeptide composition of PSI submembrane fractions was analyzed by sodium dodecyl sulfate urea polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) as described previously in Hui et al. (2000) [19]. Electrophoresis was performed using 13% separating and 4% stacking gels of polyacrylamide. Aliquots of PSI submembrane fractions, at a concentration of 5 $\mu\text{g Chl.ml}^{-1}$, are treated with different Al^{3+} concentrations, added to equal volume of 2 x buffer (0.25 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% sodium dodecyl sulfate). After incubation for 30 min at 4 °C, they are used for polypeptides separation in the gel. SDS-polyacrylamide gels containing separated polypeptides were stained with Coomassie brilliant blue and analyzed with the Gel-Doc 2000 system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

FTIR spectroscopic measurements

Infrared spectra measurements were performed using the FTIR spectrometer (Impact 420 model), equipped with deuterated triglycine sulphate (DTGS) detector and KBr beam splitter, using AgBr windows. The Chl concentration of PSI submembrane fractions was adjusted to 1 mg.ml^{-1} . Samples were prepared by addition of Al^{3+} at different concentrations of 1, 3, 5, 7 and 10 mM to the PSI submembrane fractions. After 4 h incubation at room temperature in the dark, samples spectra were recorded using hydrated films. Interferograms were accumulated over the spectral range 4000-600 cm^{-1} with a nominal resolution of 4 cm^{-1} and 100 scans.

Analysis of PSI protein secondary structure

Analysis of the secondary structure of PSI proteins, with or without Al^{3+} at different concentrations, was carried out as described in Ahmed et al. (1995) [50]. For

determination of secondary structure of PSI proteins, the shape of the amide I band, located around 1660-1650 cm^{-1} , was used [50,51]. Spectral analysis was performed using the GRAMS/AI Version 7.01 software of the Galactic Industries Corporation. The FTIR spectra were smoothed and their baselines were corrected automatically. Thus the root-mean square (rms) noise of every spectrum was calculated. By means of the second derivative in the spectral region 1600-1700 cm^{-1} five major peaks for free PSI and their Al^{3+} complexes were resolved. The spectral region was deconvoluted by the curve-fitting method following the Levenberg-Marquadt algorithm, and the peaks correspond to α -helix (1658-1650 cm^{-1}), β -sheet (1640-1613 cm^{-1}), turn (1678-1663 cm^{-1}), random coil (1648-1641 cm^{-1}) and β -antiparallel (1685-1679 cm^{-1}) were adjusted. The area of all the component bands was measured with the Gaussian function, and then summed up and divided by the total area [51].

RESULTS

Oxygen uptake rates

Fig. 1 shows the effect of aluminum cation addition on the rates of oxygen uptake measured in isolated thylakoid membranes in the presence of DCPIP $_2$, an artificial electron donor of PSI, MV as the electron acceptor and DCMU, as an inhibitor to block electron derived from PSII. A significant inhibition of oxygen uptake was already observed below 2 mM Al^{3+} . Increased concentrations of Al^{3+} (above 2 mM) induced a gradual decline of the oxygen uptake rates until it reached 89% of inhibition at 10 mM of Al^{3+} as compared to control sample.

In order to identify the target site(s) of Al^{3+} at the electron transport chain of PSI, the activity of oxygen uptake has been measured by using various artificial electron donors acting at different sites: DQH $_2$ at PQ pool, DCPIP $_2$ at Cyt b_6/f , and TMPD at PC [45,46] together MV as electron acceptor and in the presence of DCMU, as an inhibitor to block electron derived from PSII (Table 1). Regardless of electron donors, the oxygen uptake rate was decreased with increasing Al^{3+} concentrations. However, this

inhibition of oxygen uptake was more pronounced when TMPD was used and a sharp drop of 95% occurred by the addition of 4 mM of Al^{3+} as compared to a decrease of 69% and 77% in the presence of DQH_2 and DCPIP_2 , respectively.

Redox state of P700

To study the action of Al^{3+} on the photochemical activity of PSI, the photooxidation and dark re-reduction of P700 were analyzed using the absorbance changes at 820 nm (Figs. 2 and 3). Fig. 2 illustrates the oxidation and re-reduction kinetics of P700 measured in isolated thylakoid membranes treated only with various concentrations of Al^{3+} . The photo-oxidation kinetics of P700 in control samples showed a biphasic pattern. The first fast phase characterised by a rapid increase in the level of oxidized P700 was followed by a dip reflecting a partial reduction of P700^+ by the electron derived from PSII. This is likely due to the competition between the photooxidation and the re-reduction of P700. After that, the second slower phase of the oxidation of P700 was established with a stable steady state level. Even though 1 mM Al^{3+} is known to alter a fraction of PSII complexes [37,38], addition of 1 mM Al^{3+} keeps the biphasic pattern of P700 photooxidation owing to the remaining functional PSII centers that still could donate electrons to reduce a proportion of P700^+ . However, the amplitude of the second phase of P700 photooxidation increased. Under higher Al^{3+} concentrations, above 3 mM, PSII activity was inhibited [37,38] and therefore the inhibition of electrons generated by PSII to PSI led to a suppression of the biphasic pattern. At the same range of Al^{3+} concentration, the amplitude of P700 photooxidation phase increased markedly with increasing Al^{3+} concentrations. The dark reduction of oxidized P700 is established when the FR light was turned off and P700 was recovered through the reduction of P700^+ . The control sample was characterized by a fast decay phase of P700^+ reduction. Similarly, at 1 mM Al^{3+} , the reduction phase remains fast due to the remaining functional population of PSII centers that can provide electrons to reduce P700^+ . Nevertheless, addition of high concentrations of Al^{3+} induced a decrease in the rates of P700^+ reduction reflected by a slower phase at 10 mM Al^{3+} (Fig. 2). These results can indicate that Al^{3+} exerts an inhibitory action at the donor side of PSI,

especially at PC, leading to a delay in the electron transfer from donor side to RC of PSI to reduce P700⁺.

Fig. 3A shows the photooxidation of P700 in isolated thylakoid membranes samples treated with DCMU alone that blocks the electron flow from PSII to P700⁺. In control samples a slow phase leading to a steady state level was observed. Addition of Al³⁺ strongly declined the amplitude of the slow phase of P700 photooxidation even at the lowest Al³⁺ concentrations used (below 3 mM). It is important to note that the addition of Al³⁺ concentrations above 3 mM completely damped the signal of P700 photooxidation. This delay of the rate of P700 photooxidation to reach steady state level and the reduction of the level amplitude of photooxidized P700 may be a result of the inhibition of the photochemical charge separation which occurred between P700, the primary electron donor of PSI, and the primary electron acceptor A₀ at the acceptor side of PSI.

To quantify the maximal amount of active P700 population, we added MV to DCMU to the reaction mixture [14] (Fig. 3B). MV is considered as a very effective electron acceptor that strongly competes with Fd for electrons from iron-sulfur clusters of PSI and consequently suppresses the charge recombination [14,52-54]. As compared to control sample treated with DCMU alone, addition of MV to DCMU accelerated the photooxidation of P700 which rapidly attained the steady state level and increased the P700⁺ level of control samples (Fig. 3B). In the presence of Al³⁺, the amplitude of P700 photooxidation decreased progressively with increasing Al³⁺ concentration. At 10 mM Al³⁺, the remaining activity showed a decline in the active population of P700. However, the extent of this effect was less pronounced as compared to treatment with DCMU alone. This reduction of photooxydized P700 amount can indicate a decline in the active population of P700 of which a fraction of P700 in PSI RC was affected by Al³⁺ and became not functional.

Chl fluorescence emission spectra

In order to investigate the effect of various Al^{3+} concentrations on the excitation energy transfer from LHCI to PSI RC, we examined the functional connection of the LHCI antenna to the PSI RC using the Chl fluorescence emission spectra at low temperature (77 K) in isolated submembrane fractions of PSI (Fig. 4). The 77 K fluorescence emission spectra of the PSI submembrane fractions showed a characteristic peak at 730 nm (Fig. 4). As previously reported that in plants, the two dimers Lhca2,3 and Lhca1,4 which composed the outer antenna system of PSI (LHCI), are the origin of this characteristic peak. They both contain red Chl forms and emit a peak with a maximum around 730 nm at 77 K because they have similar biochemical and spectroscopic properties [13,55]. The relative amplitude of this peak gradually increased with increasing Al^{3+} concentrations. This effect was more pronounced at higher Al^{3+} concentrations. These results suggest that LHCI is a target of Al^{3+} effect which leads to a decrease of excitation energy transfer from LHCI to PSI RC.

Polypeptide composition of PSI complexes

In order to get more information about the effect of Al^{3+} addition on the polypeptide composition of PSI complex, the SDS-PAGE profile of PSI submembrane fractions was analyzed (Fig. 5). As shown in Fig. 5, lane 2, we observed many bands in the control of isolated PSI submembrane fractions mainly: PsaA/PsaB subunits, two heterodimers Lhca2,3 and Lhca1,4 polypeptides and the three extrinsic proteins at the stromal side: PsaD, PsaE and PsaC. The reaction center proteins PsaA and PsaB, with apparent molecular weights of approximately 60 kDa in SDS-PAGE, remained stable at 1 mM Al^{3+} (Fig. 5, lane 3). At high concentrations of Al^{3+} , the bands that represent the PsaA/PsaB polypeptides are gradually reduced in intensity (Fig. 5, lanes 6 and 7).

It is interesting to note that addition of Al^{3+} did not result in a prominent degradation of Lhca2,3 and Lhca1,4 polypeptides, with an apparent molecular weight of 21-25 kDa. In addition, results shown by SDS-gel electrophoresis demonstrate that several small polypeptides of PSI such as extrinsic polypeptides PsaD, PsaE and PsaC

seemed not to be affected by the concentrations of Al^{3+} . It seems that Al^{3+} affects PsaA and PsaB polypeptides, the major components of PSI RC, and consequently PSI function can be altered.

FTIR spectra of Al^{3+} -PSI complexes

The conformational changes of the polypeptides in PSI submembrane fractions upon Al^{3+} addition were studied using the FTIR spectroscopy. This technique was widely used to give detailed information about the secondary structures of PSI proteins [28,43,56,57]. The decomposition of amide I bands and the quantitative secondary structures analysis measured from control (free PSI) and Al^{3+} -PSI complexes with different Al^{3+} concentrations are presented in Fig. 6 and Table 2. Our results show that the structure of free PSI sample contained 51% of α -helix, 27% of β -sheet, 13% of β -antiparallel and 8% of turn as previously reported by Rajagopal et al. (2003), Belatik et al. (2013) and Yaakoubi et al. (2014) [28,43,57]. From the lowest Al^{3+} concentration, some changes in the structural components of the amide I band were observed. These modifications were shown by a decrease of α -helix and an increase of both β -sheet and β -antiparallel structures, while the turn structures practically remained stable. Increasing Al^{3+} concentration induced a greater conformational change of the structural components in Al^{3+} -PSI complexes. Indeed, addition of 10 mM Al^{3+} concentration caused a decrease of α -helix to 38% and an increase of β -sheet, β -antiparallel and turn structures to 33%, 18% and 11%, respectively. These conformational changes observed may be due to the alteration of PSI complex proteins in the presence of Al^{3+} which indicate a partial protein destabilization that can affect PSI function.

DISCUSSION

It has been reported in previous studies that Al^{3+} exerts an inhibitory effect on the photochemical activity of PSII complex in isolated thylakoid membranes and in PSII submembrane fractions [32,34,37,38]. However, there is a lack of information about the site(s), and the mode(s) of the Al^{3+} interaction with PSI complex. In this study, both

isolated thylakoid membranes and PSI submembrane fractions were used to investigate the effect of Al^{3+} addition on photochemical activity and structural properties of PSI complex.

In order to evaluate the effect of Al^{3+} at various concentrations on the electron transport chain of PSI complex, we have measured oxygen uptake rates in isolated thylakoid membranes using DCMU, as an inhibitor to block electron derived from PSII, MV, as an artificial electron acceptor, and DQH₂, DCPIPH₂ or TMPD as artificial electron donors that are acting at different sites (Table 1). DQH₂ and DCPIPH₂ donate electrons at PQ pool and Cyt b₆/f complex, respectively, but TMPD is oxidized by PC [45,46]. Results have showed that Al^{3+} induced a decrease of oxygen uptake rates with all artificial electron donors. The inhibition of oxygen uptake was more pronounced with TMPD than with DQH₂ and DCPIPH₂ (Table 1). This can be explained by the binding of Al^{3+} with free PC population, which are preferentially accessible to TMPD. This suggests that Al^{3+} inhibits electron transport at the donor side of PSI and especially at PC which becomes unable to supply electrons reduce adequately the P700⁺. This inhibition on the donor site of PSI was confirmed by the photooxidation and dark reduction of P700 experiments without DCMU and MV (Fig. 2). Govindachary et al. (2007) [14] have demonstrated that inhibition of electron transport on the donor side of PSI was necessary to obtain a more complete oxidation of the photooxidizable P700. In line with this data, our results presented in Fig. 2 have showed an increase of P700 photooxidation in the presence of Al^{3+} which indicates that electron transfer was inhibited on the donor side of PSI. Further, the dark reduction of P700⁺, that reflects the P700⁺ reduction by electrons transferred from Cyt b₆/f to P700⁺ via PC [15], presented a much slower rate phase in Al^{3+} treated samples, especially at 10 mM, as compared to control, thereby confirming the inhibition of electron transport particularly between PC and P700. In concordance with our results, studies have reported that toxic divalent cations such as Hg²⁺ and Pb²⁺ affect the donor side of PSI, following the binding on PC which becomes inactive, and consequently causing an inhibition of electron transport between PC and P700 [18,25,28]. Also, Jajoo et al. (2008) [58] showed that oxalate, an

organic anion, inhibited PSI activity by binding on the donor and the acceptor sides of PSI.

To evaluate the photooxidation of P700 under Al^{3+} treatment, we measured P700 absorbance changes measurements at 820 nm. MV, an artificial electron acceptor, was used to accept electrons from iron-sulfur clusters F_A/F_B and consequently suppresses the charge recombination [14,52-54]. In the presence of MV, the measured activity reflects only non-functional P700. Our results have showed that Al^{3+} concentrations decreased the amount of photooxidizable P700 (P700^+). This effect, observed either in the presence or the absence of MV, presumably indicates a decline in the amount of active population of P700 following a partial damage of the photochemical RC of PSI. However, it is important to note that under high Al^{3+} concentrations, the remaining fraction of active P700 represents a large proportion (Fig. 3B). In concordance with our data, Msilini et al. (2013) [59] have demonstrated that iron deficiency declined the amount of active P700 population in lettuce plant leaves in the presence of MV and DCMU. Comparable change in the amount of active P700 was also observed under salt stress [60]. Further, Hermans et al. (2004) [24] reported that the decrease of the P700 photooxidation amplitude was associated to the loss of PSI centers in Mg-deficient sugar beet leaves. Moreover, the decline in the photochemical activity of PSI RC may be associated to the changes in the integrity of PsaA/PsaB subunits and therefore, the decrease of the fraction of active P700 population (Figs. 3 and 5). Farhat et al. (2015) [23] associated the impairment of PSI photochemical activity by Mg^{2+} deficiency in *Sulla carnososa* plants leaves to a significant reduction in the abundance of the LHCI antenna and PsaA polypeptides of PSI which are correlated with the decrease of the relative amount of photooxidizable P700.

Despite the decrease in the amount of photooxidizable P700 under Al^{3+} treatment, it is important to note the accelerated rate of P700 photooxidation and the early onset of its steady state level in isolated thylakoid membranes subjected to DCMU together with MV treatment as compared to results obtained with DCMU alone which demonstrate a delay of the rate of P700 photooxidation to reach steady state level (Fig. 3A and B).

These results suggested that addition of Al^{3+} concentrations may induce a decrease of the rate of charge separation between P700 and the primary electron acceptor A_0 leading to the inhibition of electron transfer at the electron carriers on the acceptor side of PSI.

The effect of Al^{3+} addition on LHCI function and organization was analyzed by chlorophyll fluorescence emission and SDS gel electrophoresis. It is well known that LHCI isolated from higher plant is composed two functional heterodimers, Lhca2,3 and Lhca1,4. They both emit in the red, with a maximum around 730 nm at 77 K [13,55]. A significant change was observed in the chlorophyll fluorescence emission spectra of PSI submembrane fractions treated with Al^{3+} concentrations. The relative amplitude of emission spectra, measured at low temperature (77 K), increased with increasing Al^{3+} concentrations. This increase may be due to the reduction in the energy transfer from the LHCI antenna complex to the PSI RC probably as a result of the disconnection of LHCI antenna from the RC of PSI (Fig. 4). LHCI disconnection from PSI RC has been also shown upon illumination and heating stresses [61-64]. Given that the bands in the SDS gel electrophoresis attributed to Lhca2,3 and Lhca1,4 polypeptides remained stable under Al^{3+} addition, we suggest that LHCI antenna are not degraded but probably are denatured following the conformational changes of their structure thus leading to their disconnection from PSI RC (Fig. 5).

It is worth to mention that the functional alteration of PSI activity under Al^{3+} addition could be closely related to structural changes. In this context, we used FTIR spectroscopy to characterize the secondary structure of PSI proteins complex in the presence of Al^{3+} . Addition of Al^{3+} obviously altered the main conformational components of PSI complex. These changes are shown by the conversion of α -helix to β -sheet, β -antiparallel and turn structures of the polypeptides. This effect can be carried out especially at the transmembrane intrinsic polypeptides rich in α -helices such as PsaA and PsaB subunits, LHCI and other associated intrinsic polypeptides [4,6,9,65]. These conformational changes demonstrate that Al^{3+} alter the protein secondary structures revealing that a reorganization of PSI domain has occurred including proteins and pigments within PSI RC and LHCI. This can lead to the denaturation of PSI proteins

(Fig. 6). The observed structural changes were probably related to the electrostatic Al^{3+} -proteins interaction [66]. The interaction of cations with PSI proteins was also reported in the presence of Pb^{2+} and spermine, a heavy metal and an organic cation, respectively [28,57]. Moreover, Hu et al. (2004) [20] have suggested that the conformational changes of protein secondary structures in PSI complex were accompanied by energetic disconnection of LHCI from PSI core and denaturation of PSI complex under heat stress. All these alterations led to inhibition of PSI photochemical activity reflected by the loss of electron transport through both acceptor and donor sides of PSI.

CONCLUSION

In our current study, we have demonstrated that Al^{3+} addition altered the secondary structure of PSI polypeptides leading to conformational changes. This was due to the interaction of Al^{3+} with the polypeptides of PSI complex. These structural changes were closely related with the functional alteration of PSI activity in which Al^{3+} exerts multiple effects on the electron transport chain of PSI. Indeed, Al^{3+} affected the donor side of PSI, especially PC, leading to inhibition of electron transport between PC and P700. In addition, Al^{3+} induced a partial damage of the photochemical RC of PSI associated to a decline in the amount of active population of P700 and inhibited the rate of charge separation between P700 and the primary electron acceptor A_0 leading to the inhibition of electron transfer between the electron carriers on the acceptor side of PSI. These modifications were accompanied by a disconnection of LHCI antenna causing a reduction of energy transfer from LHCI to PSI RC.

REFERENCES

- [1] J.H. Golbeck, Structure and function of photosystem I, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43 (1992) 293-324.
- [2] P.R. Chitnis, Q. Xu, V.P. Chitnis, R. Nechushtai, Function and organization of photosystem I polypeptides, *Photosynth. Res.* 44 (1995) 23-40.

- [3] H.V. Scheller, P.E. Jensen, A. Haldrup, C. Lunde, J. Knoetzel, Role of subunits in eukaryotic photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta* 1507 (2001) 41-60.
- [4] P. Jordan, P. Fromme, O. Klukas, H.T. Witt, W. Saenger, N. Krauß, Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution, *Nature* 411 (2001) 909-917.
- [5] J. Knoetzel, A. Mant, A. Haldrup, P.E. Jensen, H.V. Scheller, PSI-O, a new 10 kDa subunit of eukaryotic photosystem I, *FEBS Lett.* 510 (2002) 145-148.
- [6] P. Fromme, P. Jordan, N. Krauß, Structure of photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta* 1507 (2001) 5-31.
- [7] R. Nechushtai, A. Eden, Y. Cohen, J. Klein, Introduction to photosystem I: reaction center function, composition and structure, in: D.R. Ort, C.F. Yocum (Eds.), *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*, Kluwer Academic, Dordrecht, 1996, pp. 289-311.
- [8] E.J. Boekema, A. Hifney, A.E. Yakushevska, M. Piotrowski, W. Keegstra, S. Berry, K.P. Michel, E.K. Pistorius, J. Kruip, A giant chlorophyll-protein complex induced by iron deficiency in cyanobacteria, *Nature* 412 (2001) 745-748.
- [9] A. Ben-Shem, F. Frolow, N. Nelson, Crystal structure of plant photosystem I, *Nature* 426 (2003) 630-635.
- [10] P.E. Jensen, A. Haldrup, L. Rosgaard, H.V. Scheller, Molecular dissection of photosystem I in higher plants: topology, structure and function, *Physiol. Plant.* 119 (2003) 313-321.
- [11] A. Amunts, O. Drory, N. Nelson, The structure of a plant photosystem I supercomplex at 3.4 Å resolution, *Nature* 443 (2007) 58-63.
- [12] E. Wientjes, I.H.M. van Stokkum, H. van Amerongen, R. Croce, Excitation energy transfer dynamics of higher plant photosystem I light harvesting complexes, *Biophys. J.* 100 (2011) 1372-1380.
- [13] R. Croce, H. Van Amerongen, Light harvesting in photosystem I, *Photosynth. Res.* 116 (2013) 153-166.
- [14] 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 C3 plant, *Cucumis sativus* L., *Photosynth. Res.* 94 (2007) 333-345.

- [15] A. Busch, M. Hippler, The structure and function of eukaryotic photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta* 1807 (2011) 864-877.
- [16] P. Pospisil, Enzymatic function of cytochrome b559 in photosystem II, *J. Photochem. Photobiol. B* 104 (2001) 341-347.
- [17] M.A. Schöttler, C.A.A. Ralph Bock, Photosystem I: its biogenesis and function in higher plants, *Biochim. Biophys. Acta* 168 (2011) 1452-1461.
- [18] É. Sárvári, F. Fodor, E. Cseh, A. Varga, G. Záray, L. Zolla, Relationship between changes in ion content of leaves and chlorophyll-protein composition in cucumber under Cd and Pb stress. *Z. Naturforsch.* 54c (1999) 746-753.
- [19] Y. Hui, W. Jie, R. Carpentier, Degradation of the photosystem I complex during photoinhibition, *Photochem. Photobiol.* 72 (2000) 508-512.
- [20] Z.H. Hu, Y.N. Xu, G.Z. Jiang, T.Y. Kuang, Degradation and inactivation of photosystem I complexes during linear heating, *Plant Sci.* 166 (2004) 1177-1183.
- [21] Z.H. Hu, Y.N. Xu, Y.D. Gong, T.Y. Kuang, Effects of heat treatment on the protein secondary structure and pigment microenvironment in photosystem I complex, *Photosynthetica* 43 (2005) 529-534.
- [22] C.N. Deng, D.Y. Zhang, X.L. Pan, F.Q. Chang, S.Z. Wang, Toxic effect of mercury on PSI and PSII activities, membrane potential and trans-thylakoid proton gradient in *Microsorium pteropus*, *J. Photochem. Photobiol. B* 127 (2013) 1-7.
- [23] N. Farhat, A.G. Ivanov, M. Krol, M. Rabhi, A. Smaoui, C. Abdelly, N.P.A. Hüner, Preferential damaging effects of limited magnesium bioavailability on photosystem I in *Sulla carnosia* plants, *Planta* 241 (2015) 1189-1206.
- [24] C. Hermans, G.N. Johnson, R.J. Strasser, N. Verbruggen, Physiological characterization of magnesium deficiency in sugar beet: acclimation to low magnesium differentially affects photosystems I and II, *Planta* 220 (2004) 344-355.
- [25] R.C. Honeycutt, D.W. Krogmann, Inhibition of chloroplast reactions with phenylmercuric acetate, *Plant Physiol.* 49 (1972) 376-380.
- [26] D. Wong, Govindjee, Effects of lead ions on photosystem I in isolated chloroplasts: studies on the reaction center P700, *Photosynthetica* 10 (1976) 241-254.

- [27] B. Wodala, G. Eitel, T.N. Gyula, A. Ördög, F. Horváth, Monitoring moderate Cu and Cd toxicity by chlorophyll fluorescence and P700 absorbance in pea leaves, *Photosynthetica* 50 (2012) 380-386.
- [28] A. Belatik, S. Hotchandani, H.A. Tajmir-Riahi, R. Carpentier, Alteration of the structure and function of photosystem I by Pb^{2+} , *J. Photochem. Photobiol. B* 123 (2013) 41-47.
- [29] M. Chen, T.S. Bibby, J. Nield, A. Larkuma, J. Barber, Iron deficiency induces a chlorophyll d-binding Pcb antenna system around photosystem I in *Acaryochloris marina*, *Biochim. Biophys. Acta* 1708 (2005) 367-74.
- [30] L.V. Kochian, M.A. Pineros, O.A. Hoekenga, The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity, *Plant Soil* 274 (2005) 175-195.
- [31] M. Moustakas, G. Ouzounidou, E.P. Eleftheriou, R. Lannoye, Indirect effects of aluminum stress on the function of the photosynthetic apparatus, *Plant Physiol. Biochem.* 34 (1996) 553-560.
- [32] H.P. Peixoto, F.M. Da Matta, J.C. Da Matta, Responses of the photosynthetic apparatus to aluminum stress in two sorghum cultivars, *J. Plant Nutr.* 25 (2002) 821-832.
- [33] N. Mihailovic, G. Drazic, Z. Vucinic, Effects of aluminum on photosynthetic performance in Al-sensitive and Al-tolerant maize inbred lines, *Photosynthetica* 46 (2008) 476-480.
- [34] H.X. Jiang, L.S. Chen, J.G. Zheng, S. Han, N. Tang, B.R. Smith, Aluminum induced effects on photosystem II photochemistry in citrus leaves assessed by the chlorophyll a fluorescence transient. *Tree Physiol.* 28 (2008) 1863-1871.
- [35] Z. Li, F. Xing, D. Xing, Characterization of target site of aluminum phytotoxicity in photosynthetic electron transport by fluorescence techniques in tobacco leaves, *Plant Cell Physiol.* 53 (2012) 1295-1309.
- [36] S. Silva, G. Pinto, M.C. Dias, C.M. Correia, J. Moutinho-Pereira, O. Pinto-Carnide, C. Santos, Aluminum long-term stress differently affects photosynthesis in rye genotypes. *Plant Physiol. Biochem.* 54 (2012) 105-112.
- [37] I. Hasni, S. Hamdani, R. Carpentier, Destabilization of the Oxygen Evolving Complex of Photosystem II by Al^{3+} , *Photochem. Photobiol.* 89 (2013) 1135-1142.

- [38] I. Hasni, H. Yaakoubi, S. Hamdani, H.A. Tajmir-Riahi, R. Carpentier, Mechanism of Interaction of Al^{3+} with the Proteins Composition of Photosystem II, *PLOS ONE* 3 (2015) e0120876.
- [39] D. Joly, C. Bigras, J. Harnois, S. Govindachary, R. Carpentier, Kinetic analyses of the OJIP chlorophyll fluorescence rise in thylakoid membranes. *Photosynth. Res.* 84 (2005) 107-12.
- [40] R.J. Porra, W.A. Thompson, P.E. Kriedemann, Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta* 975 (1989) 384-394.
- [41] F.A.J. Peters, J.E. van Wielink, W.F. Sang, S. Pevries, R. Krayenhof, Studies on well coupled photosystem I enriched subchloroplast vesicles content and redox properties of electron transfer components, *Biochim. Biophys. Acta* 722 (1983) 460-470.
- [42] J. Harnois, N. Msilini, R. Carpentier, Isolation of photosystem I submembrane fractions, in: R. Carpentier (Ed.), *Photosynthesis Research Protocols*, 2nd ed., Springer Science, New York, 2011, pp. 11a-15.
- [43] S. Rajagopal, N.G. Bukhov, 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.
- [44] R. Carpentier, B. Larue, R.M. Leblanc, Photoacoustic spectroscopy of *Anacystis nidulans*: III. Detection of photosynthetic activities, *Arch. Biochem. Biophys.* 228 (1984) 534-543.
- [45] S. Izawa, Acceptors and donors for chloroplast electron transport, *Methods Enzymol.* 69 (1980) 413-434.
- [46] C. White, C.R.K. Chain, R. Malkin, Duroquinol as an electron donor for chloroplast electron transfer reaction, *Biochim. Biophys. Acta* 502 (1978) 127-137.
- [47] S. Izawa, R.L. Pan, Photosystem I electron transport and phosphorylation supported by electron donation to the plastoquinone region, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83 (1978) 1171-1177.

- [48] S. Rajagopal, N.G. 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* 67 (2002) 194-200.
- [49] C. Klughammer, U. Schreiber, Measuring P700 absorbance changes in the near infrared spectral region with a dual wavelength pulse modulation system, in: G. Garab (Ed.), *Photosynthesis: Mechanism and Effects*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1998, pp. 4357-4360.
- [50] A. Ahmed, H.A. Tajmir-Riahi, R. Carpentier, A quantitative secondary structure analysis of the 33 kDa extrinsic polypeptide of photosystem II by FTIR spectroscopy, *FEBS Lett.* 363 (1995) 65-68.
- [51] G. Vandenbussche, A. Celerics, T. Curstedt, J. Johansson, H. Jörmvall, J.M. Ruyschaert Structure and orientation of the surfactant associated protein C in a lipid bilayer. *Eur. J. Biochem.* 203 (1992) 201-209.
- [52] Y. Kobayashi, U. Heber, Rates of vectorial proton transport supported by cyclic electron flow during oxygen reduction by illuminated intact chloroplasts, *Photosynth. Res.* 41 (1994) 419-428.
- [53] G. Cornic, N.G. Bukhov, C. Wiese, R. Bligny, U. Heber, Flexible coupling between light-dependent electron and vectorial proton transport in illuminated leaves of C3 plants, role of photosystem I dependent proton pumping, *Planta* 210 (2000) 468-477.
- [54] U. Heber, Irrungen, Wirrungen? The Mehler reaction in relation to cyclic electron transport in C3 plants, *Photosynth. Res.* 73 (2002) 223-231.
- [55] E. Wientjes, R. Croce, The light-harvesting complexes of higher-plant photosystem I: Lhca1/4 and Lhca2/3 form two redemitting heterodimers, *Biochem. J.* 433 (2011) 477-485.
- [56] X. Ruan, J. Wei, Q. Xu, J. Wang, Y. Gong, X. Zhang, T. Kuang, N. Zhao, Comparison of the effects of Triton X-100 treatment on the protein secondary structure of photosystem I and photosystem II studied by FT-IR spectroscopy, *J. Mol. Struct.* 525 (2000) 97-106.
- [57] H. Yaakoubi, I. Hasni, H.A. Tajmir-Riahi, R. Carpentier, Effect of biogenic polyamine spermine on the structure and function of photosystem I, *J. Photochem. Photobiol. B* 141 (2014) 76-83.

- [58] A. Jajoo, A. Sahay, P. Singh, S. Mathur, S.K. Zharmukhamedov, V.V. Klimov, S.I. Allakhverdiev, S. Bharti, Elucidating the site of action of oxalate in photosynthetic electron transport chain in spinach thylakoid membranes, *Photosynth. Res.* 97 (2008) 177-184.
- [59] N. Msilini, J. Essemine, M. Zaghdoudi, J. Harnois, M. Lachaâl, Z. Ouerghi, R. Carpentier, How does iron deficiency disrupt the electron flow in photosystem I of lettuce leaves?, *J. Plant Physiol.* 170 (2013) 1400-1406.
- [60] M. Zaghdoudi, N. Msilini, S. Govindachary, M. Lachaâl, Z. Ouerghi, R. Carpentier, Inhibition of photosystems I and II activities in salt stress exposed Fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.), *J. Photochem. Photobiol. B* 105 (2011) 14-20.
- [61] A. Alboresi, M. Ballottari, R. Hienerwadel, G.M. Giacometti, T. Morosinotto, Antenna complexes protect photosystem I from photoinhibition, *BMC Plant Biol.* 9 (2009) 71.
- [62] L. Lípová, P. Krchňák, J. Komenda, P. Ilík, Heat-induced disassembly and degradation of chlorophyll-containing protein complexes in vivo, *Biochim. Biophys. Acta* 1797 (2010) 63-70.
- [63] S.B. Krumova, Z. Varkonyi, P.H. Lambrev, L. Kovacs, S.J. Todinova, M.C. Busheva, S.G. Taneva, G. Garab, Heat and light-induced detachment of the light harvesting antenna complexes of photosystem I in isolated stroma thylakoid membranes, *J. Photochem. Photobiol. B* 137 (2014) 4-12.
- [64] S. Nellaepalli, O. Zsiros, T. Tóth, V. Yadavalli, G. Garab, R. Subramanyam, L. Kovács, Heat and light induced detachment of the light harvesting complex from isolated photosystem I supercomplexes, *J. Photochem. Photobiol. B* 137 (2014) 13-20.
- [65] J.N. Henderson, J. Zhang, B.W. Evans, K. Redding, Disassembly and degradation of photosystem I in an in vitro system are multievent, metal-dependent processes. *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 39978-39986.
- [66] S. Nahar, R. Carpentier, H.A. Tajmir Riahi, Interaction of trivalent Al and Ga cations with proteins of PSII Cation binding mode and protein conformation by FTIR spectroscopy, *J. Inorg. Biochem.* 65 (1997) 245-250.

FIGURES CAPTIONS

Fig. 1. Effect of different Al^{3+} concentrations on oxygen uptake activity in isolated thylakoid membranes measured at 24 °C in the presence of DCPIPH₂ as electron donor and MV as electron acceptor. Each point represents the mean \pm SD of 9 independent measurements. See Section 2 for details.

Fig. 2. Original traces of the FR light induced photooxidation and re-reduction kinetics of P700 monitored as absorbance changes at 820 nm in isolated thylakoid membranes treated with different Al^{3+} concentrations. The numbers adjacent to the curves indicate Al^{3+} concentrations. Upward and downward arrows indicate the time at which the FR light was turned on and off, respectively. Each curve is the average of 9 different measurements. See Section 2 for details.

Fig. 3. (A) P700 photooxidation kinetics curves monitored as absorbance changes at 820 nm induced by FR light in isolated thylakoid membranes treated with different concentrations of Al^{3+} in the presence of 100 μM DCMU alone, and **(B)** in the presence of 100 μM DCMU together with 50 μM MV. The numbers adjacent to the curves indicate the concentrations of Al^{3+} . Upward arrow indicates the FR light on. Each curve is the average of 9 different measurements.

Fig. 4. Changes in the fluorescence emission spectra measured at low temperature (77 K) in PSI submembrane fractions submitted to different Al^{3+} concentrations. The slit widths for excitation and emission were set at 5 and 2.5 nm, respectively. Each curve is the average of 9 different measurements and a typical spectrum is presented. See Section 2 for details.

Fig. 5. SDS gel of the polypeptide composition of PSI submembrane fractions treated with various concentrations of Al^{3+} . Lane 1, molecular weight standards; lane 2, control PSI; lane 3, 1 mM Al^{3+} treated PSI; lane 4, 3 mM Al^{3+} treated PSI; lane 5, 5 mM Al^{3+} treated PSI; lane 6, 7 mM Al^{3+} treated PSI; lane 7, 10 mM Al^{3+} treated PSI. Numbers on the left side indicate the molecular markers masses (in KDa). See details in Section 2.

Fig. 6. Curve-fitted amide I band region ($1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) of IR spectra and secondary structure determination of the amide I band in PSI submembrane fractions treated with Al^{3+} at various concentrations. Presented spectra are representative of three separate experiments.

Table 1. Inhibition of oxygen uptake activity (%) in isolated thylakoid membranes under effect of various Al^{3+} concentrations in the presence of different artificial electron donors: DCPIPH₂ (0.1 mM), DQH₂ (1 mM) and TMPD (0.1 mM). 100% oxygen uptake means 0% inhibition. See Section 2 for details.

Al^{3+} (mM)	Oxygen uptake rates (%)		
	DCPIPH ₂ → MV	DQH ₂ → MV	TMPD → MV
0	100 ± 2.1	100 ± 0.7	100 ± 0.7
1	41 ± 1.3	41 ± 2.0	22 ± 0.3
2	31 ± 1.0	38 ± 1.8	6 ± 0.1
3	26 ± 1.8	33 ± 2.0	5 ± 0.2
4	23 ± 0.6	31 ± 1.5	5 ± 0.1

Figure 1

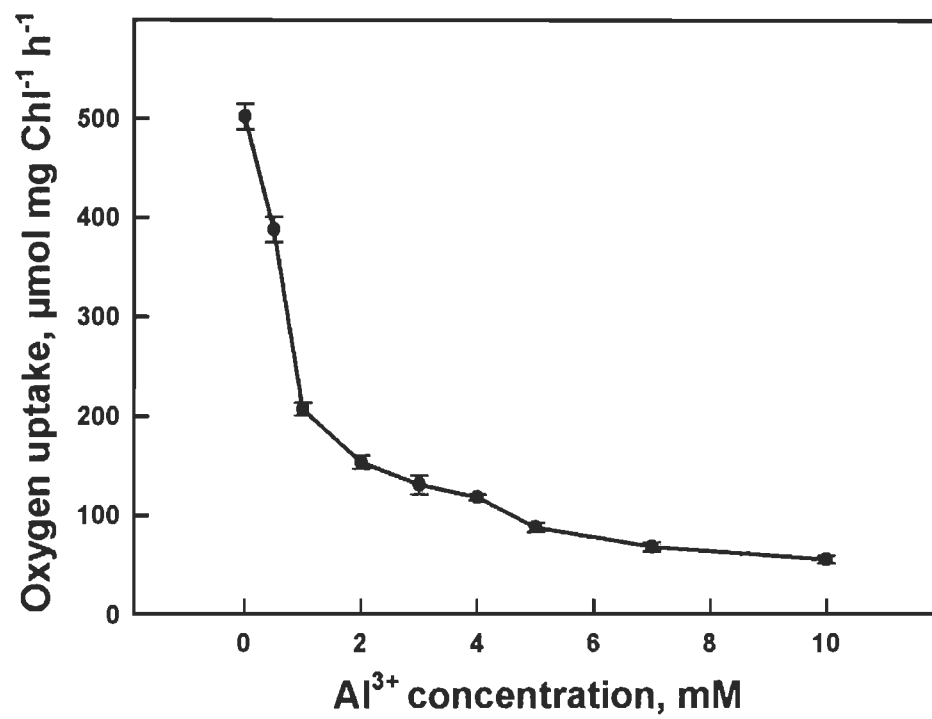


Figure 2

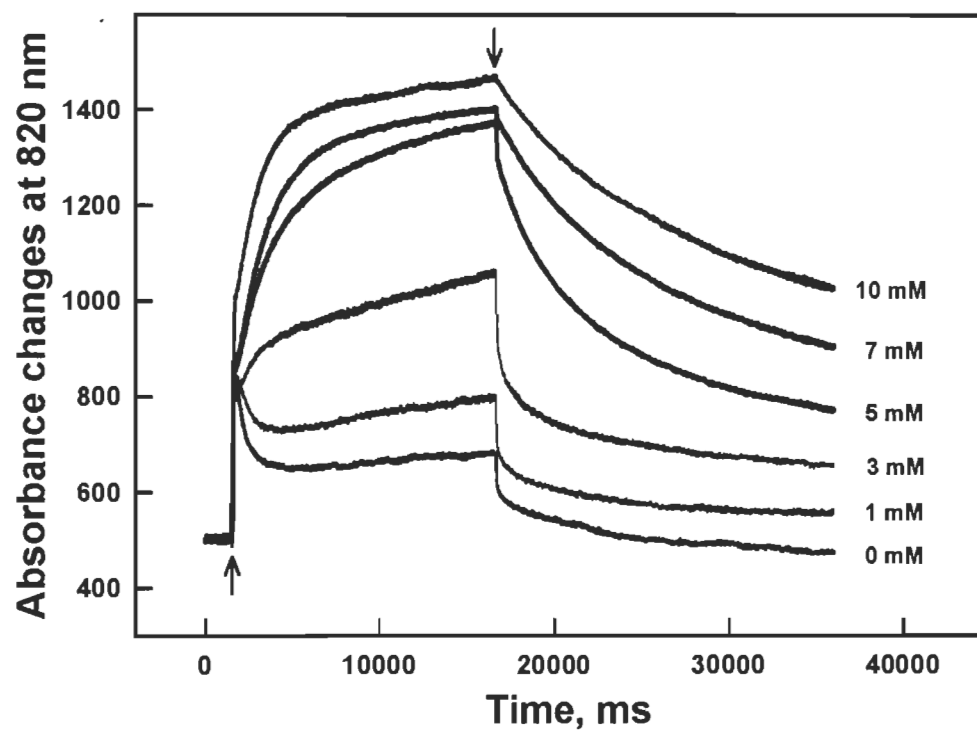


Figure 3

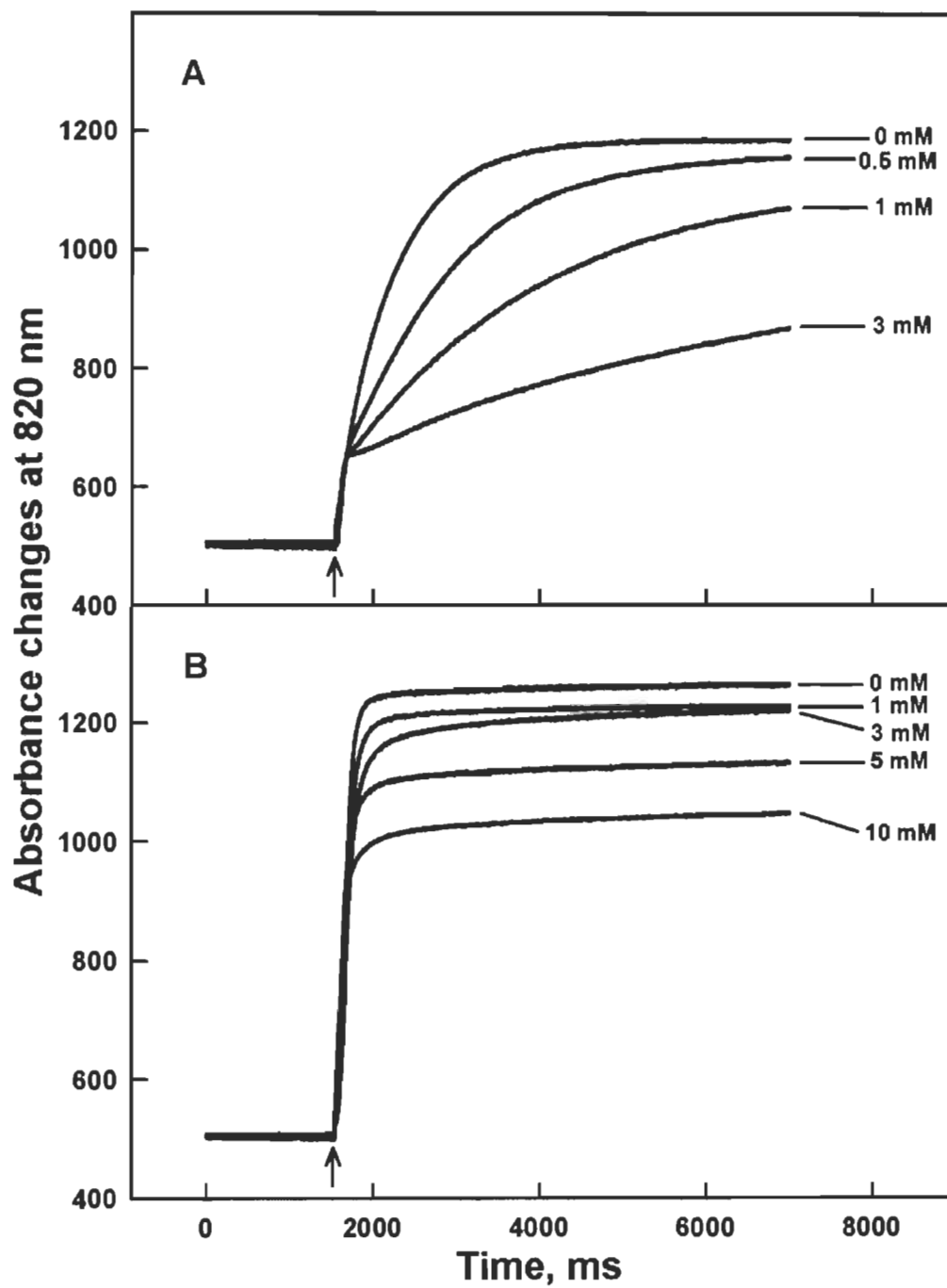


Figure 4

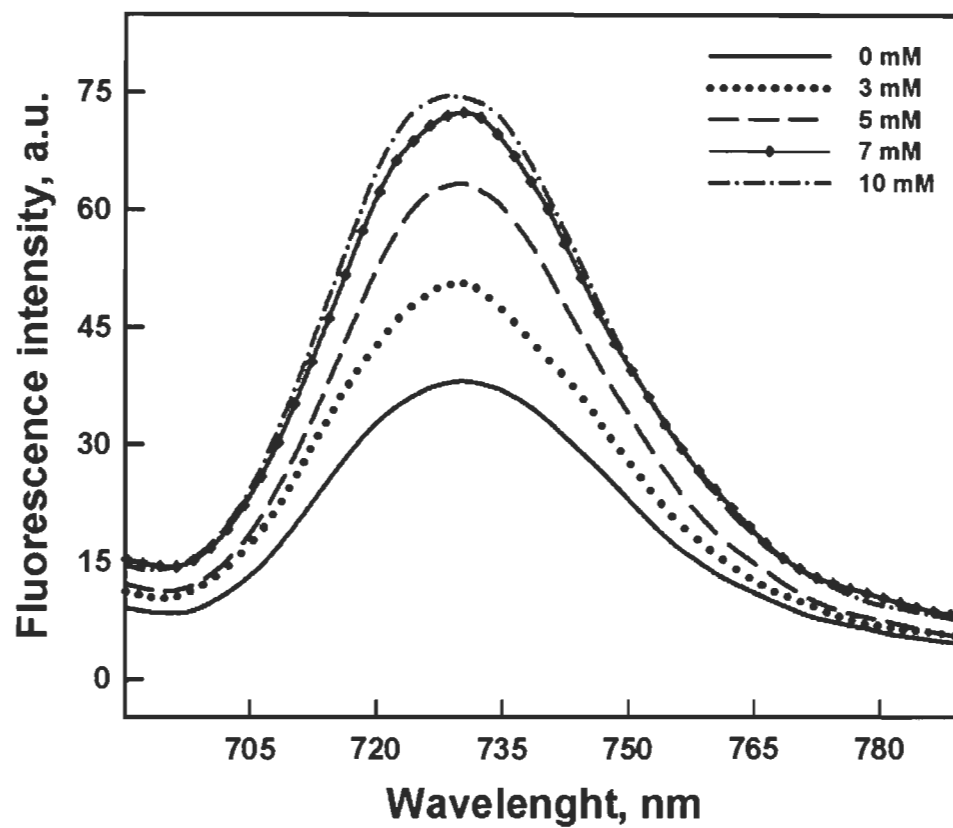


Figure 5

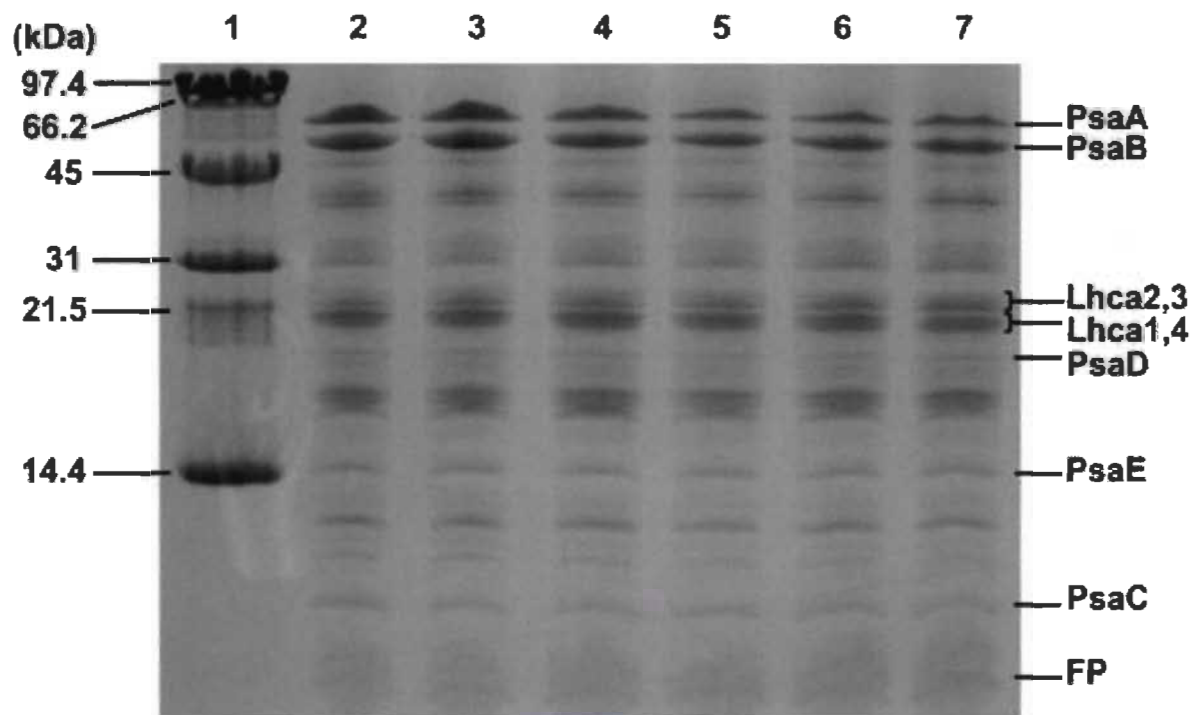
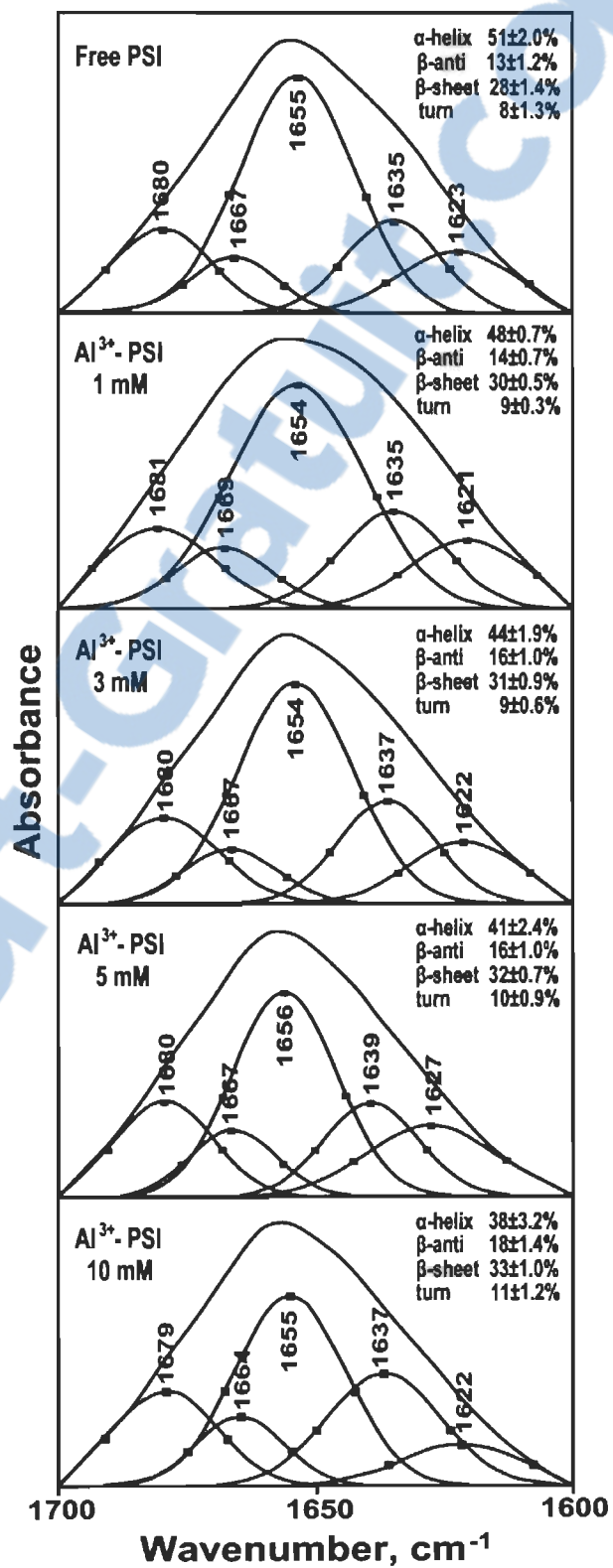


Figure 6



CHAPITRE V

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS

La pollution des sols est un fardeau environnemental qui touche plusieurs pays. Parmi les principaux polluants générés par les activités industrielles et minières ainsi que par les déchets urbains dus aux activités humaines, les métaux posent effectivement des problèmes particulièrement préoccupants. N'étant pas dégradables dans le sol, les métaux peuvent y persister longtemps et constituent un danger potentiel par bioaccumulation le long de la chaîne trophique. À cette catégorie appartiennent différents éléments parmi lesquels l'Al a retenu plus d'attention ces dernières décennies par ses effets toxiques sur l'environnement et la santé humaine. L'Al est connu comme l'un des polluants métalliques n'ayant aucun rôle métabolique connu et ne semble pas biologiquement essentiel ou bénéfique au métabolisme des êtres vivants (Alia et Saradhi, 1991). Dans les sols acides, qui représentent 40 % des terres cultivées dans le monde (Kochian, 1995), l'Al peut être soluble majoritairement sous la forme ionique trivalente Al^{3+} . Cette forme cationique de l'Al (Al^{3+}) présente un potentiel toxique important tant pour les plantes qui sont directement exposées que pour la santé humaine via l'entrée dans la chaîne alimentaire par la production agricole, ainsi que pour le milieu naturel dans son ensemble. Sous ces conditions, Al^{3+} est considéré l'un des stress environnementaux majeurs affectant la croissance des plantes et plus particulièrement la photosynthèse, principal processus à la base de la chaîne trophique. En effet, l'impact toxique de l' Al^{3+} sur la photosynthèse a fait l'objet de nombreuses études qui ont démontré l'inhibition de l'activité photosynthétique à différents niveaux. Cependant, les mécanismes de son action toxique sur l'appareil photosynthétique des plantes supérieures ne sont pas encore bien connus et nécessitent donc d'être précisés.

L'objectif principal de notre projet de recherche portait sur la caractérisation des sites et des mécanismes de toxicité de l' Al^{3+} sur les propriétés fonctionnelles et structurales de l'appareil photosynthétique. Les résultats obtenus ont permis d'élucider

trois principaux aspects. Le premier aspect consistait à déterminer les sites d'action de l' Al^{3+} au niveau du PSII et leurs effets sur l'activité photochimique et le transport d'électrons photosynthétique. Le second aspect consistait à appréhender les mécanismes d'action toxique de l' Al^{3+} au niveau de PSII en se basant sur son interaction avec les différentes sous-unités protéiques composant le PSII afin d'interpréter l'inhibition de l'activité photochimique et d'évaluer les changements des propriétés structurales du PSII induites par l' Al^{3+} . Le troisième aspect comportait sur l'étude des sites et des modes d'action de l' Al^{3+} sur l'activité photochimique et les propriétés structurales du PSI ainsi que sur le transport d'électrons photosynthétique. Les résultats obtenus démontrent l'atteinte des objectifs visés.

5.1 Sites d'action d' Al^{3+} au niveau du PSII et son effet sur l'activité photosynthétique

Dans les travaux du chapitre II, l'interaction entre Al^{3+} et les membranes de thylakoïdes a été caractérisée par la mesure du dégagement d' O_2 , l'induction de la fluorescence chlorophyllienne, le déclin de fluorescence chlorophyllienne induite par flash et la thermoluminescence. Les objectifs spécifiques de cette étude consistaient à identifier les sites d'action potentiels d' Al^{3+} et son effet sur l'activité photosynthétique.

La mesure du dégagement d' O_2 standard a été utilisée afin de vérifier l'effet d' Al^{3+} sur l'activité du CEO. Les résultats ont montré qu'à faible concentration d' Al^{3+} , inférieure à 1 mM, l'inhibition du dégagement d' O_2 a été négligeable, alors qu'elle s'est accentuée avec l'augmentation progressive de la concentration en Al^{3+} . Par contre, environ 80 % de l'activité de dégagement d' O_2 est perdue avec 2 à 3 mM d' Al^{3+} . Au-delà de ces concentrations, le dégagement d' O_2 a diminué légèrement jusqu'à ce qu'il ait atteint une inhibition complète à 10 mM d' Al^{3+} (Fig. 1). Ceci suggère que le CEO est altéré. De même, ces mesures de l'inhibition de l'activité de dégagement d' O_2 reflètent une inhibition du transport d'électrons au sein du PSII avec la présence de DCBQ (2,6-dichlorobenzoquinone) comme accepteur d'électrons.

L'effet inhibiteur d' Al^{3+} sur l'activité de transport d'électrons a été caractérisé plus en détail avec l'analyse des propriétés de la fluorescence chlorophyllienne dans les échantillons des membranes de thylakoïdes isolées. Les paramètres de la fluorescence chlorophyllienne F_m (la fluorescence maximale observée dans des échantillons préadaptés dans le noir et illuminés avec une lumière rouge actinique) et F_0 (le niveau de fluorescence initial) ont été mesurés avec des membranes de thylakoïdes traitées avec différentes concentrations en Al^{3+} (Fig. 2A). La fluorescence initiale F_0 , observée avec les CR dans un état ouvert, a augmenté considérablement en présence d'une forte concentration d' Al^{3+} , au-delà de 3 mM (Fig. 2A). L'augmentation de F_0 est probablement due à la formation des CR inactifs de PSII ou à une réduction de transfert d'énergie des antennes collectrices de lumière vers les CR de PSII en raison de leur dissociation du CR de PSII (Aro *et al.*, 1993; Yamane *et al.*, 1997; Ralph et Burchett, 1998; Ekmekçia *et al.*, 2008; Hamdani et Carpentier, 2009; Zaghdoudi *et al.*, 2011). Cependant, la fluorescence maximale F_m , observée lorsque les CR sont dans un état fermé, a diminué énormément avec la même gamme de concentration en Al^{3+} utilisée pour les mesures de F_0 . Sous l'effet des fortes concentrations en Al^{3+} , supérieures à 3 mM, le déclin de F_m et l'augmentation de F_0 ont entraîné une baisse importante du rendement photochimique maximal du PSII, F_v/F_m (Fig. 2A).

Les propriétés de la fluorescence chlorophyllienne en présence d' Al^{3+} ont été analysées plus en détail au niveau de la cinétique d'induction de fluorescence. Les tracés d'induction de fluorescence (Fig. 3A, chapitre III) illustrent la réduction progressive des quinones localisées du côté accepteur du PSII avec trois phases désignées OJ, JI et IP (Nakatani, 1984; Lazár, 1999, 2006; Zhu *et al.*, 2005; Boisvert *et al.*, 2007). Dans les tracés d'induction de fluorescence des extraits de la membrane thylakoïdale, non traités avec Al^{3+} , le point I n'apparaît pas et par conséquent seulement deux phases sont observées OJ et IP alors que la phase JI est considérée négligeable (Fig. 3A and B, trace 0) (Bukhov *et al.*, 2004; Joly *et al.*, 2005; Boisvert *et al.*, 2006). La première phase (OJ) reflète la réduction de la quinone acceptrice primaire du PSII, Q_A , alors que la seconde phase (IP, ici JP) est attribuée à la réduction du pool de PQ combinée à celle de la quinone acceptrice secondaire Q_B (Boisvert *et al.*, 2006; Joly et Carpentier, 2009; Joly

et al., 2010). Les résultats ont montré que le traitement des échantillons des membranes de thylakoïdes par une faible concentration d' Al^{3+} (inférieure à 3 mM) a provoqué une augmentation de l'intensité relative de la fluorescence chlorophyllienne au niveau de la phase OJ alors qu'au niveau de la phase IP une diminution de l'intensité relative de la fluorescence chlorophyllienne est observée (Fig. 3A), ce qui indique que le taux de réoxydation Q_A par Q_B a été retardé (Beauchemin *et al.*, 2007; Hamdani et Carpentier, 2009; Msilini *et al.*, 2011). Ce fait est davantage illustré dans la Fig. 3B où les tracés d'induction de fluorescence normalisés aux valeurs minimales et maximales (V_t) ont révélé que les faibles concentrations en Al^{3+} ont engendré une augmentation de la phase OJ indiquant clairement que le transfert d'électrons entre Q_A^- et Q_B est retardé. Au-delà de la concentration de 3 mM en Al^{3+} , l'intensité de la fluorescence a diminué progressivement en fonction de l'augmentation de la concentration (Fig. 3A), ce qui suggère que le CEO est devenu incapable de fournir les électrons au PSII pour réduire convenablement les quinones localisées du côté accepteur diminuant ainsi le rendement de la fluorescence maximale.

Afin de confirmer la réduction du taux de réoxydation de Q_A^- et par conséquent le retard de transfert d'électrons entre les deux quinones Q_A et Q_B du côté accepteur du PSII sous l'effet inhibiteur d' Al^{3+} déjà indiqué dans la Fig. 3, nous avons eu recours à la technique de la cinétique de déclin de fluorescence induite suite à l'application d'un flash de lumière saturante. Les cinétiques du déclin de fluorescence des extraits de membranes thylakoïdales en présence d' Al^{3+} , sont montrées sur une échelle logarithmique de temps (Fig. 4). La montée de fluorescence induite par le flash est due à la réduction de Q_A et le déclin subséquent à l'obscurité est relié à la réoxydation de Q_A (Putrenko *et al.*, 1999).

L'analyse quantitative du déclin de la fluorescence à l'obscurité des échantillons de contrôle a été faite selon une équation à trois fonctions exponentielles représentant trois phases exponentielles (Tableau 1). La phase rapide est associée à la réoxydation de Q_A^- par Q_B (Pospišil et Tyystjärvi, 1999; Putrenko *et al.*, 1999; De Wijn et Van Gorkom, 2001). La phase moyenne est attribuée à la réoxydation de Q_A^- dans les CR du PSII dans

le cas où le site Q_B est vide et elle est limitée par le temps de diffusion des molécules de PQ au site de liaison de Q_B vide. La phase lente est attribuée à la réoxydation de Q_A^- par la recombinaison de charges des états S_2 et/ou S_3 du complexe de Mn_4O_5Ca ou bien par le cytochrome b559 dans les CR de PSII inactifs (Putrenko *et al.*, 1999; De Wijn et Van Gorkom, 2001). L'amplitude et le temps de demi-vie de chacune des phases sont démontrés dans le Tableau 1. L'addition des concentrations de 0,5 à 4 mM d' Al^{3+} aux échantillons des membranes de thylakoïdes a entraîné un ralentissement de toutes les phases comme indiqué par l'augmentation du temps de demi-vie comparativement à l'échantillon du contrôle (Tableau 1). De même, l'amplitude relative de la phase rapide de la cinétique de déclin de fluorescence, attribuée à la réoxydation de Q_A^- par Q_B , a diminué avec 3-4 mM d' Al^{3+} ce qui a entraîné un retard de transfert d'électrons entre Q_A et Q_B . Ce retard de transfert d'électrons entre Q_A et Q_B peut indiquer qu'il existe un site de liaison au niveau de Q_B ou à ses environs. De ce fait, un effet électrostatique possible d' Al^{3+} pourrait également avoir une certaine influence sur ce site. Cette diminution de l'amplitude relative de la phase rapide a coïncidé avec une augmentation de l'amplitude relative de la phase lente qui est associée à la recombinaison de charge entre Q_A et l'état S_2 du complexe de Mn_4O_5Ca (Putrenko *et al.*, 1999). Cette proportion élevée de Q_A réduite, qui est réoxydé lentement par le processus de recombinaison de charge, reflète probablement la formation des centres Q_B non réducteurs et indique qu'il reste une petite population de PSII avec les états S_2 intacts du complexe de Mn_4O_5Ca qui sont encore disponible pour la recombinaison de charges à cette concentration de 3 à 4 mM. A fortes concentrations d' Al^{3+} , l'amplitude totale de la fluorescence a été grandement diminuée et le déclin contenait seulement une phase lente (Fig. 4).

Également, l'amplitude totale de la montée de fluorescence induite par flash F_m , et par conséquent F_v , a aussi été diminuée avec l'augmentation des concentrations en Al^{3+} , alors que le déclin de la fluorescence à l'obscurité est visiblement plus lent. La perte apparente de l'amplitude de fluorescence indique un déclin rapide de la fluorescence qui survient bien avant le début des mesures de déclin de fluorescence. Le déclin dans le rendement de fluorescence induite par flash est attribué à une recombinaison entre Q_A^- et $P680^+$ dans une fraction des CR de PSII. Les CR de PSII avec $P680^+$ sont connus pour

avoir un rendement de fluorescence proche de F_0 (Deprez *et al.*, 1983). L'accumulation de $P680^+$ après un seul flash actinique est observée seulement lorsque le transfert d'électrons entre le donneur primaire Tyr Z et le $P680^+$ est retardé ou inhibé (Britt, 1996). Une étude récente de la structure cristalline du CEO indique que la Tyr Z se trouve à proximité du complexe de Mn_4O_5Ca et l'une des quatre molécules d'eau liées au complexe de Mn_4O_5Ca est directement liée à la Tyr Z par un atome d'hydrogène (Kawakami *et al.*, 2011). Par conséquent, la désorganisation du CEO par Al^{3+} , à des concentrations supérieures à 3 mM, peut également affecter l'environnement moléculaire de la Tyr Z conduisant à l'inhibition du transfert d'électrons de la Tyr Z vers $P680^+$.

La thermoluminescence a été utilisée pour caractériser les processus de recombinaison des charges entre les deux côtés donneur et accepteur du PSII dans les membranes de thylakoïdes en présence d' Al^{3+} . Pour initier la séparation de charge, une pré-illumination des échantillons des membranes thylakoïdales, avec un seul flash actinique blanc de 1 μs , a été faite. En appliquant, par la suite, un accroissement linéaire de la température de 2 à 62 °C avec un taux de 0.5 °C/s, l'amplitude du signal de thermoluminescence a augmenté considérablement pour atteindre son maximum à une température moyenne (T_m) de 37 °C dans les échantillons contrôles (Fig. 5A, tracé continu, chapitre II). La bande majeure d'émission observée correspond à la bande B (30 °C - 40 °C) attribuable à la recombinaison entre Q_B^- et l'état S_2 du complexe de Mn_4O_5Ca (Sane, 2004). L'intensité de cette bande B a diminué grandement avec l'augmentation de la concentration en Al^{3+} . Les changements dans l'amplitude de la bande B peuvent être reliés à des changements dans les propriétés de l'état S_2 du complexe de Mn_4O_5Ca . En parallèle avec la baisse de l'intensité de la bande B, un décalage de T_m vers les hautes températures a été observé avec l'augmentation de la concentration en Al^{3+} atteignant 43 °C à 2 mM. Ce décalage de la T_m de la bande B peut être expliqué par un changement dans le potentiel redox de Q_B . Cela est dû probablement aux changements conformationnels des polypeptides transmembranaires du complexe de PSII à savoir D1 et d'autres polypeptides qui sont associés à la fois au CEO et au site de Q_B ce qui peut engendrer par conséquent des modifications dans les

potentiels redox de Q_A et Q_B . Cependant, à fortes concentrations d' Al^{3+} , supérieures à 3 mM, la bande B a été complètement supprimée (Fig. 5A, tracé continu, chapitre II).

Afin d'identifier les effets de l'addition d' Al^{3+} sur la chaîne de transport d'électrons, l'inhibiteur DCMU 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée a été ajouté pour bloquer le transfert d'électrons entre Q_A^- et Q_B . Consécutivement à l'ajout de DCMU, la bande B a été supprimée et une nouvelle bande lumineuse majeure avec une T_m de 15 °C est apparue (Fig. 5B, tracé continu, chapitre II). Cette nouvelle bande majeure d'émission observée est la bande Q qui provient de la recombinaison de charges entre Q_A^- et l'état S_2 du complexe de Mn_4O_5Ca (Homann, 1999). L'amplitude de la bande Q a diminué fortement en fonction de l'augmentation de la concentration en Al^{3+} . Cependant, aucun décalage de T_m de la bande Q n'a été observé suite à l'addition d' Al^{3+} . De même, les pourcentages des intensités des deux bandes B et Q diminuent progressivement de façon similaire lorsque la concentration en Al^{3+} augmente (Fig. 6). Cette baisse simultanée des deux bandes démontre l'effet inhibiteur d' Al^{3+} sur la recombinaison de charges. Cette inhibition est due principalement à la perte des états S_2 du complexe de Mn_4O_5Ca en tant que partenaire commun de recombinaison pour les deux quinones Q_A et Q_B (Fig. 5). En effet, la perte des états S_2 a engendré la désorganisation du complexe de Mn_4O_5Ca et par conséquent la déstabilisation du CEO et l'inhibition de son activité. Cette inhibition a été déjà démontrée par la suppression de la phase IP des courbes de l'induction de fluorescence (Fig. 3) (Pospišil et Dau, 2000). De plus, une bande lumineuse mineure avec une T_m de 52 °C est apparue dans les échantillons contrôles de membranes de thylakoïdes en présence de DCMU (Fig. 5B, tracé continu). La bande mineure d'émission observée est la bande C, attribuée à la recombinaison de charge entre Q_A^- et la forme oxydée de la Tyr D (Vass et Govindjee, 1996). En comparaison avec le contrôle, l'amplitude de cette bande s'est améliorée en augmentant la concentration en Al^{3+} . L'augmentation de l'intensité de la bande C s'est accompagnée par la diminution de l'intensité des deux bandes B et Q en fonction de l'augmentation de la concentration en Al^{3+} , ce qui suggère que l'état S_2 est affecté et par la suite, il n'est plus disponible pour recombiner avec Q_A^- . Cependant, une population de Q_A^- est toujours présente dans ces conditions et encore disponible pour recombiner avec

Tyr D⁺. Ceci indique clairement que la séparation de charge initiale suivant l'excitation avec le flash saturant engendre l'état P680⁺Q_A⁻ qui continue toujours à être le partenaire de recombinaison avec Tyr D⁺.

5.2 Mécanismes d'action d'Al³⁺ sur le PSII

Dans les travaux du chapitre III, les interactions entre Al³⁺ et les fractions membranaires enrichies en PSII ont été caractérisées moyennant différentes techniques spectroscopiques et biochimiques, à savoir la mesure du dégagement d'O₂ standard, la mesure du dégagement d'O₂ après flash, l'induction de la fluorescence, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE, l'électrophorèse sur gel vert, la spectroscopie de fluorescence à basse température (77 K) et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). Les objectifs spécifiques de cette étude consistaient à déterminer les mécanismes d'action d'Al³⁺ au niveau moléculaire et son effet sur l'activité et la structure du PSII.

Afin de vérifier l'activité du CEO suite à l'addition d'Al³⁺, les mesures du dégagement d'O₂ standard ont été effectuées sur des fractions membranaires enrichies en PSII. Les résultats ont montré que l'activité du dégagement d'O₂ diminue significativement avec l'augmentation de la concentration en Al³⁺. En effet, l'addition de 2 mM d'Al³⁺ inhibe le dégagement d'O₂ de 91 % par rapport à l'échantillon de contrôle alors qu'elle a atteint les 99 % à 5 mM (Fig. 1, chapitre III). Notons que l'inhibition de l'activité de dégagement d'O₂ observée dans les fractions membranaires enrichies en PSII en présence d'Al³⁺ a été plus prononcée que celle mesurée avec les membranes thylakoïdales (Boucher et Carpentier, 1999). Cette différence est probablement due à une liaison plus accessible d'Al³⁺ dans les fractions membranaires enrichies en PSII que dans les membranes de thylakoïdes en raison de leurs différences structurales. Toutefois, l'utilisation des fractions membranaires purifiées de PSII représente un système d'étude plus simple et plus spécifique, ne subissant pas d'interférence de la part des autres composantes de la membrane thylakoïdale. Ces résultats suggèrent qu'il y a une interaction possible et directe entre Al³⁺ et le CEO.

Les mesures du dégagement d'O₂ après flash viennent confirmer l'effet inhibiteur d'Al³⁺ sur le CEO (Fig. 2, chapitre III). Le patron d'oscillation du dégagement d'O₂ après flash pour l'échantillon du contrôle montre une période typique de quatre oscillations avec un maximum du dégagement d'O₂ observé au troisième flash (qui correspond à l'état S₄, après une incubation de l'échantillon à la noirceur). Cette périodicité est liée à l'avancement des états S du complexe de Mn₄O₅Ca associé au CEO qui génère une molécule d'O₂ au troisième flash (Joly et Carpentier, 2009). L'addition d'Al³⁺ aux échantillons des membranes de thylakoïdes a induit une inhibition du dégagement d'O₂, démontrée par une diminution dans les amplitudes des rendements d'O₂. Cette diminution est plus prononcée avec l'augmentation de la concentration en Al³⁺. De même, les patrons d'oscillation du dégagement d'O₂ ont été modifiés en fonction du nombre de flashes. À fortes concentrations d'Al³⁺, particulièrement à 5 mM, le rendement de l'O₂ a été complètement aboli. Cet effet a été accompagné d'une baisse drastique dans les amplitudes des rendements d'O₂ induite par flash et une perte des patrons d'oscillation (Fig. 2, chapitre III). Ce changement peut être expliqué par une majeure réduction et/ou destruction du nombre total des centres fonctionnels actifs du CEO, ce qui indique que le CEO a été sévèrement altéré (Mohanty *et al.*, 1989; Joly et Carpentier, 2009). L'analyse quantitative des données expérimentales des patrons d'oscillation du dégagement d'O₂ après flash a permis de déterminer mathématiquement les probabilités de transition des états S (coups simples, coups manqués et coups doubles) du complexe de Mn₄O₅Ca selon un modèle, de résolution d'équations avec matrice, proposé par Messinger *et al.* (1997). Les résultats ont montré que l'addition d'Al³⁺ a entraîné une augmentation du pourcentage des coups manqués (« misses »: pas d'avancement des états S) et de coups doubles (« double hits »: avancement double des états S) ainsi qu'une diminution du pourcentage des coups simples (« hits »: avancement simple des états S) enregistrés lors de la mesure du dégagement d'O₂. Ces modifications sont plus prononcées en fonction de l'augmentation de la concentration en Al³⁺ (Tableau 1, chapitre III). En effet, l'ajout des concentrations de 2-3 mM d'Al³⁺ a affecté légèrement l'avancement des états S du complexe de Mn₄O₅Ca. Cependant, à fortes concentrations d'Al³⁺, l'augmentation considérable des valeurs des coups manqués et des coups doubles suggèrent que l'Al³⁺ peut affecter directement le complexe de

Mn_4O_5Ca causant un ralentissement dans l'avancement de ses états S. Ceci peut être du probablement au détachement de Ca^{2+} et/ou Mn du complexe de Mn_4O_5Ca . Par conséquent, le complexe de Mn_4O_5Ca devient désorganisé et n'est plus fonctionnel.

Pour élucider l'étendue de l'action inhibitrice d' Al^{3+} sur le CEO et plus spécifiquement sur les protéines extrinsèques, des électrophorèses sur gel de polyacrylamide ont été effectuées sur des échantillons des fractions membranaires enrichies en PSII traités avec différentes concentrations d' Al^{3+} . Les résultats ont montré l'absence de deux polypeptides correspondant aux polypeptides extrinsèques PsbQ et PsbP du CEO de poids moléculaire de 17 et 23 kDa respectivement, en présence de faibles concentrations en Al^{3+} . Ceci démontre qu'il existe une corrélation entre le relâchement des deux polypeptides extrinsèques PsbQ et PsbP et l'inhibition de l'activité du dégagement d' O_2 au niveau du PSII sous l'effet d' Al^{3+} (Fig. 3, colonnes 3 et 4, chapitre III). En effet, l'absence de ces deux polypeptides (17 et 23 kDa) est capable de diminuer l'affinité entre les ions Ca^{2+} et Cl^- avec le CEO (Seidler, 1996). Ces cofacteurs (Ca^{2+} et Cl^-) sont essentiels pour le maintien de la conformation du CEO (Vrettos et Brudvig, 2002; Van Gorkom et Yocum, 2005). Cependant, la bande correspondante au troisième polypeptide extrinsèque PsbO de poids moléculaire 33 kDa, connue comme la protéine stabilisatrice du complexe de Mn_4O_5Ca (Bricker et Frankel, 1998), a été affectée partiellement et reste liée au complexe de PSII (Fig. 3, colonnes 3 et 4, chapitre III), ce qui explique la légère altération dans l'avancement des états S du complexe de Mn_4O_5Ca (Tableau 1, chapitre III). À fortes concentrations d' Al^{3+} , les trois polypeptides ont été perdus au niveau des positions apparentes correspondant aux polypeptides extrinsèques associés avec le CEO PsbQ, PsbP et PsbO, respectivement (Fig. 3, colonnes 5 et 6, chapitre III). Les positions apparentes des trois polypeptides extrinsèques ont coïncidé avec les polypeptides arrachés par le traitement de PSII avec le Tris-alkali qui enlève spécifiquement les trois polypeptides extrinsèques du CEO (Fig. 3, colonnes 7 et 8, chapitre III) (Seidler, 1996). Ce résultat est en parfaite concordance avec ceux obtenus par le dégagement d' O_2 après flash à fortes concentrations en Al^{3+} . En effet, l'enlèvement de la protéine extrinsèque PsbO (de 33 kDa) du complexe de PSII est associé à la désorganisation du complexe de Mn_4O_5Ca et l'inhibition de son activité,

ce qui est à l'origine du ralentissement de la transition des états S. D'autres études ont montré qu'en absence du polypeptide 33 kDa (PsbO), deux à quatre atomes de Mn peuvent disparaître provoquant l'inhibition de l'activité du CEO (Wyman et Yocum, 2005). De plus, l'enlèvement de ce polypeptide de 33 kDa (PsbO) ralentit significativement la transition entre les états $S_3 - [S_4] \rightarrow S_0$ (Miyao *et al.*, 1987). Ainsi, l'interaction d' Al^{3+} avec les fractions membranaires enrichies en PSII a causé effectivement le relâchement des polypeptides extrinsèques et la désorganisation du complexe de Mn_4O_5Ca associés au CEO du côté donneur du PSII en affectant la stabilité du CEO et par conséquent, l'inhibition de l'activité du dégagement d' O_2 .

L'effet d' Al^{3+} sur l'activité du transfert d'électrons a été caractérisé avec l'analyse des propriétés de la fluorescence chlorophyllienne dans les échantillons des fractions membranaires enrichies en PSII. Les résultats ont montré que la fluorescence initiale F_0 , observée avec les CR dans un état ouvert, a augmenté considérablement avec l'augmentation de la concentration en Al^{3+} (Fig. 4A, chapitre III). Par ailleurs, la fluorescence maximale F_m , observée lorsque les CR sont dans un état fermé, a diminué énormément après l'addition d'une forte concentration en Al^{3+} (5 mM) (Fig. 4B, chapitre III). Ce déclin a coïncidé simultanément avec la diminution du rendement photochimique maximal du PSII, F_v/F_m et du ratio F_v/F_0 (Fig. 4C et D, chapitre III), un paramètre plus sensible au niveau des variations simultanées de F_m et F_0 pour la détermination du rendement photochimique maximal (Kana *et al.*, 2002; Govindachary *et al.*, 2004). De plus, à fortes concentrations d' Al^{3+} , les diminutions enregistrées au niveau des ratios F_v/F_m et F_v/F_0 ont corrélé parfaitement avec l'inhibition totale du dégagement d' O_2 et l'enlèvement des polypeptides extrinsèques, ce qui suggère que le CEO est la cible principale d' Al^{3+} . En effet, l'interaction d' Al^{3+} avec les polypeptides extrinsèques est capable d'affecter l'activité du CEO et par la suite l'altération du rendement photochimique du PSII.

Les tracés d'induction de fluorescence chlorophyllienne ont été analysés afin d'élucider l'effet d' Al^{3+} sur l'activité du transport d'électrons des deux côtés donneur et accepteur du PSII. Ces tracés illustrent la réduction progressive des quinones localisées

du côté accepteur du PSII avec trois phases désignées OJ, JI et IP (Fig. 5A, chapitre III) (Zhu *et al.*, 2005; Lazár, 2006). La première phase (OJ) reflète la réduction de la quinone acceptrice primaire du PSII, Q_A , alors que les phases (JI) et (IP) peuvent être attribuées à la réduction de la quinone acceptrice secondaire Q_B et du pool de PQ respectivement. La phase JI est considérée négligeable dans les fractions membranaires enrichies en PSII (Joly et Carpentier, 2009). L'addition d' Al^{3+} aux échantillons des fractions membranaires enrichies en PSII a provoqué une atténuation de l'induction de fluorescence. Cette atténuation est plus prononcée avec l'augmentation de la concentration en Al^{3+} (Fig. 5A, chapitre III).

Pour expliquer l'effet inhibiteur d' Al^{3+} sur les différentes phases de réduction des quinones sur le côté accepteur du PSII, les tracés d'induction de fluorescence ont été normalisés simultanément aux valeurs minimales et maximales (tracés V_t). Ces tracés ont montré qu'à faibles concentrations d' Al^{3+} (inférieure à 3 mM) une augmentation de la phase OJ s'est produite reflétant ainsi que la réoxydation de Q_A^- par Q_B dans les fractions membranaires enrichies en PSII est retardée (Fig. 5B, chapitre III). Dans ce contexte, il a été démontré que le détachement des deux polypeptides extrinsèques de poids moléculaires 17 et 23 kDa et/ou Ca^{2+} a induit la modification du potentiel redox de Q_A , ce qui a augmenté la durée de vie de la réoxydation de Q_A^- (Krieger *et al.*, 1993; Putrenko *et al.*, 1999). À fortes concentrations d' Al^{3+} , une forte inhibition de l'induction de fluorescence, observée au niveau des phases OJ et IP (Fig. 5A et B, chapitre III), témoigne d'une incapacité du CEO à fournir des électrons pour réduire les quinones acceptrices du côté accepteur du PSII. Par conséquent, le transfert d'électrons du côté donneur vers le côté accepteur du PSII est affecté causant ainsi l'altération de l'activité photochimique du PSII. Ces résultats sont en parfaite concordance avec les diminutions enregistrées au niveau des ratios F_v/F_m et F_v/F_0 , l'inhibition totale du dégagement d' O_2 et l'enlèvement des polypeptides extrinsèques. Hasni *et al.* (2013) ont démontré que la déstabilisation du CEO par les fortes concentrations en Al^{3+} (supérieure à 3 mM) provoque une altération de l'environnement moléculaire de la Tyr Z causant l'inhibition du transfert d'électrons entre la Tyr Z et $P680^+$ dans les CR de PSII. Par conséquent, cette inhibition de transfert d'électrons entre le donneur primaire Tyr Z et le $P680^+$ a

favorisé une accumulation des espèces $P680^+$, ce qui explique l'atténuation de l'intensité du pic de la fluorescence chlorophyllienne de PSII à 684 nm observée suite à l'ajout d' Al^{3+} (S1 Fig., chapitre III). Plusieurs études suggèrent que l'inhibition de l'activité du CEO simultanément avec l'atténuation de l'induction de fluorescence chlorophyllienne peut être due à la réduction du nombre de CR de PSII actifs (Ait Ali *et al.*, 2006; Hamdani et Carpentier, 2009; Msilini *et al.*, 2011).

La fluorescence chlorophyllienne à basse température (77 K) a été utilisée pour déterminer l'effet d' Al^{3+} sur le transfert d'excitation des antennes LHCII au CR de PSII et par conséquent évaluer l'état de connexion des antennes LHCII avec le CR du PSII. À température cryogénique, deux bandes principales caractérisant le spectre d'émission de la fluorescence chlorophyllienne de l'échantillon du contrôle: une première bande apparaît à 684 nm avec un petit épaulement à 692 nm, attribuable à la Chl *a* du PSII, alors que la deuxième bande apparaît à 732 nm et elle est caractéristique de la Chl *a* du PSI. L'addition d' Al^{3+} aux échantillons des membranes de thylakoïdes a diminué considérablement l'amplitude de la bande de 684 nm. Cet effet est plus prononcé avec l'augmentation de la concentration en Al^{3+} (Fig. 6, chapitre III). Ce résultat indique qu'il y a une altération des antennes LHCII et par conséquent une diminution du transfert de l'énergie d'excitation des antennes LHCII au CR de PSII. Cette diminution du transfert de l'énergie d'excitation est corrélée parfaitement avec l'augmentation de F_0 et du pourcentage des coups manqués suite à l'ajout des concentrations élevées d' Al^{3+} . Cela suggère que le détachement des polypeptides extrinsèques facilite l'interaction d' Al^{3+} avec les antennes du côté du lumen du PSII. Cette interaction peut induire des altérations structurales des antennes et par la suite l'inhibition du transfert de l'énergie d'excitation.

Pour élucider l'action d' Al^{3+} sur la structure des complexes pigments protéines, des électrophorèses sur gel vert ont été effectuées avec des échantillons des membranes de thylakoïdes traités avec différentes concentrations d' Al^{3+} . Les résultats ont montré que le profil électrophorétique de ces complexes pigments protéines, et plus particulièrement celui de LHCII, a changé graduellement en fonction de l'augmentation de la concentration ajoutée en Al^{3+} . En effet, à fortes concentrations d' Al^{3+} l'absence des

Chls de la bande de LHCII a été observée (Fig. 7, colonnes 5 et 6, chapitre III). Ceci est dû probablement à la perte ou la dégradation de la Chl sous l'effet d' Al^{3+} . Ces résultats ont coïncidé avec ceux obtenus avec l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE qui ont démontré que les polypeptides correspondant à LHCII restent liés au CR du PSII ce qui élimine la possibilité de leur dégradation. Tous ces résultats ont montré que l' Al^{3+} a engendré des changements dans la structure de LHCII. Ces changements sont attribués probablement à la dénaturation des protéines de LHCII accompagnée par une perte ou une dégradation des pigments chlorophylliens.

La spectroscopie FTIR a été utilisée pour déterminer l'effet d' Al^{3+} sur la structure secondaire protéique des fractions membranaires enrichies en PSII. Le spectre FTIR des fractions membranaires enrichies en PSII est composé principalement d'une bande large de forte intensité à 1658 cm^{-1} , appelée la bande amide I, attribuable à l'étirement de la liaison C=O (Krimm et Bandekar, 1986; He *et al.*, 1991). Cette bande amide I, objet de notre étude, est largement utilisée vu sa sensibilité aux changements de conformation dans les structures secondaires des polypeptides suite à la complexation des protéines (Surewicz et Mantsch, 1988; De Las Rivas et Barber, 1997). L'analyse quantitative de la structure secondaire des fractions membranaires enrichies en PSII et de ses complexes avec les différentes concentrations en Al^{3+} a été réalisée afin d'estimer le degré de modification structurale des polypeptides. La structure secondaire des polypeptides du PSII libre est composée de 54 % d'hélices α ($1654\text{-}1660 \text{ cm}^{-1}$), 9 % de feuillets β ($1614\text{-}1637 \text{ cm}^{-1}$), 15 % de coudes β ($1670\text{-}1678 \text{ cm}^{-1}$), 18 % de pelotes statiques ($1638\text{-}1648 \text{ cm}^{-1}$) et 4 % de feuillets β -antiparallèles ($1680\text{-}1691 \text{ cm}^{-1}$). L'addition d' Al^{3+} a induit des changements dans la structure secondaire des polypeptides des complexes PSII- Al^{3+} . À fortes concentrations d' Al^{3+} (5 mM), une altération majeure dans la structure secondaire des polypeptides du complexe PSII- Al^{3+} a été observée. En effet, les hélices α ont diminué drastiquement de 54 à 29 %. Simultanément, les structures des feuillets β et des pelotes statiques ont augmenté considérablement de 9 à 24 % et de 18 à 29 %, respectivement pour le même complexe PSII- Al^{3+} à 5 mM. Cependant, les structures coudes β et feuillets β -antiparallèles restent stables (Figs. 8 et 9, chapitre III). Ces résultats indiquent que l' Al^{3+} a induit des changements

conformationnels importants des structures secondaires des polypeptides du PSII de façon simultanée. Ces changements simultanés témoignent qu'une composante majeure du complexe de PSII a été dénaturée affectant ainsi sa fonction (Fig. 9, chapitre III). Ceci peut être dû probablement à une interaction électrostatique des charges positives d' Al^{3+} avec les groupements fonctionnels des polypeptides de PSII.

Mécanisme d'action proposé

Il est important de noter que l'inhibition de l'activité fonctionnelle du PSII par Al^{3+} est en étroite liaison avec les changements structuraux du complexe de PSII. En effet, en présence de fortes concentrations d' Al^{3+} , une parfaite corrélation a été observée entre l'inhibition de l'activité du dégagement d' O_2 , la réduction du transfert d'énergie d'excitation à partir des antennes LHCI au CR de PSII et les changements conformationnels importants des structures secondaires des polypeptides du complexe de PSII. Nous proposons qu'à la suite de son addition à l'échantillon du PSII à fortes concentrations, Al^{3+} est capable d'altérer la structure secondaire des polypeptides du PSII entraînant des changements conformationnels des polypeptides intrinsèques transmembranaires riches en hélices α , tels que D1, D2, CP43, CP47, LHCI et d'autres polypeptides intrinsèques associés à la fois au CEO et au site du Q_B (Liu *et al.*, 2004; Dekker et Boekema, 2005; Lucinski et Jackowski, 2006). Cette modification a conduit à la réduction du pourcentage des structures hélices α . En outre, nous suggérons que le détachement des trois polypeptides extrinsèques PsbQ, PsbP et PsbO, de poids moléculaires de 17, 23 et 33 kDa respectivement, peut favoriser l'augmentation du pourcentage des structures pelotes statiques du côté du lumen du complexe de PSII. Cette modification est accompagnée d'une inhibition totale de l'activité de dégagement d' O_2 . De même, les fortes concentrations d' Al^{3+} sont capables de changer la structure secondaire des polypeptides de LHCI, en affectant leur stabilité par la diminution du pourcentage des structures hélices α et l'augmentation du pourcentage des structures feuillets β causant ainsi l'inhibition du transfert de l'énergie d'excitation du LHCI vers le CR du PSII. Cette inhibition est démontrée par l'augmentation du F_0 , du pourcentage des coups manqués ainsi que par la diminution de la bande d'émission de la fluorescence chlorophyllienne à 684 nm mesurée à basse température (77 K). Tous ces changements

conformationnels transmembranaires modifient probablement le potentiel redox des deux quinones Q_A et Q_B ce qui provoque une altération au niveau de leurs réductions sur le côté accepteur de PSII, entraînant l'inhibition de transfert d'électrons et par conséquent l'inhibition de l'activité de PSII. Dans ce contexte, Roose *et al.* (2010) ont suggéré que le détachement des deux polypeptides extrinsèques PsbP et PsbQ, e poids moléculaires 23 et 17 kDa respectivement, peut induire des altérations transmembranaires dans la structure du complexe de PSII entraînant la perturbation des sites de Q_A et/ou Q_B ou la modification du canal d'échange plastoquinone-plastoquinol. Par ailleurs, le détachement du troisième polypeptide extrinsèque, PsbO (de 33 kDa), peut induire des changements dans les positions des protéines des antennes périphériques et provoque une déstabilisation de la structure dimérique du PSII entraînant ainsi des changements conformationnels (Boekema *et al.*, 2000; Roose *et al.*, 2007).

Finalement, l'ensemble de ces résultats démontre que l'inhibition de l'activité fonctionnelle du PSII est en étroite liaison avec les changements structuraux du complexe de PSII induits par Al^{3+} .

5.3 Effets de l' Al^{3+} sur l'activité photochimique et les propriétés structurales du PSI

Dans les travaux du chapitre IV, l'interaction d' Al^{3+} avec les membranes thylakoïdales et des fragments membranaires enrichis en PSI a été caractérisée par des approches spectroscopiques et biochimiques à savoir la mesure de la consommation d' O_2 , la photooxydation du P700, la spectroscopie de fluorescence des pigments chlorophylliens à basse température (77 K), l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE et la FTIR. Les objectifs spécifiques de cette étude consistaient à étudier l'effet d' Al^{3+} sur l'activité photochimique et les propriétés structurales du PSI ainsi que sur l'activité de transport d'électrons photosynthétique tout en déterminant ses sites et ses modes d'action.

L'effet inhibiteur d' Al^{3+} sur l'activité du transport d'électrons a été caractérisé par les mesures de la consommation d' O_2 dans les membranes de thylakoïdes traitées avec différentes concentrations d' Al^{3+} . Les résultats ont montré que l' Al^{3+} a inhibé le transport d'électrons tout au long de la chaîne de transfert d'électrons au niveau du PSI. Cette inhibition est plus prononcée avec l'augmentation de la concentration en Al^{3+} (Fig. 1, chapitre IV).

Afin d'identifier les sites d'action potentiels d' Al^{3+} au niveau de la chaîne de transfert d'électrons du PSI on a mesuré le taux de consommation d' O_2 en utilisant différents donneurs d'électrons artificiels à savoir DQH_2 , DCPIP_2 et TMPD dont les sites d'action sont différents. DQH_2 et DCPIP_2 sont deux donneurs d'électrons au niveau du pool de PQ et du Cyt b_6/f respectivement, alors que le TMPD est un donneur d'électrons au niveau de la PC (White *et al.*, 1978; Izawa, 1980). Les résultats obtenus ont montré que l' Al^{3+} a inhibé le taux de consommation d' O_2 avec tous les donneurs d'électrons, mais avec des degrés d'inhibition différents (Tableau 1, chapitre IV). Ces effets indiquent qu'il existe une inhibition du transport d'électrons, mais de façon différente d'un donneur à l'autre. Cette inhibition est plus prononcée avec TMPD comparée aux deux autres donneurs (DQH_2 et DCPIP_2). Ceci peut être expliqué par l'interaction d' Al^{3+} avec les PC libres qui sont accessibles à l'action du TMPD . Cette interaction témoigne d'une incapacité du PC à fournir des électrons pour réduire adéquatement les P700^+ et par conséquent, une inhibition du transport d'électrons au niveau du côté donneur du PSI.

Pour valider l'interprétation de l'effet inhibiteur d' Al^{3+} sur le côté donneur du PSI et plus particulièrement au niveau du PC, les cinétiques de photooxydation et la re-réduction de P700 ont été caractérisées par la mesure du changement d'absorbance à 820 nm sur des échantillons de thylakoïdes traités avec différentes concentrations d' Al^{3+} . Les résultats ont montré que l'amplitude de la phase de la photooxydation de P700 à l'état stationnaire a augmenté considérablement en fonction de l'augmentation de la concentration en Al^{3+} . Ceci indique que le transfert d'électrons a été inhibé sur le côté donneur du PSI. La phase de réduction sombre de P700^+ , attribuée à la réduction de

P700⁺ par les électrons provenant du Cyt b₆/f via la PC, est caractérisée par une phase de déclin rapide démontrant une réduction rapide de P700⁺ pour l'échantillon du contrôle. L'addition d'Al³⁺ a entraîné une diminution du taux de réduction de P700⁺ caractérisée par une phase de déclin plus lente. Cet effet est plus clair avec l'ajout de 10 mM d'Al³⁺ (Fig. 2, chapitre IV). Ce résultat confirme que l'Al³⁺ affecte le côté donneur du PSI, plus particulièrement au niveau du PC causant ainsi une inhibition du transfert d'électrons entre le côté donneur du PSI et le P700. Par conséquent, la réduction de P700⁺ est retardée ou même inhibée. Nos résultats sont en parfaite concordance avec ceux obtenus avec d'autres types de cations métalliques divalents comme Hg²⁺ et Pb²⁺. En effet, Hg²⁺ et Pb²⁺ affectent le côté donneur du PSI en se liant avec la PC, qui devient par la suite inactive, causant ainsi l'inhibition du transport d'électrons entre la PC et le P700 (Wong et Govindjee, 1976; Hermans *et al.*, 2004; Belatik *et al.*, 2013).

Afin d'élucider d'autres sites d'action d'Al³⁺ au niveau du PSI et leurs effets sur l'activité photochimique du PSI, la photooxydation du P700 des échantillons des membranes de thylakoïdes traités avec différentes concentrations d'Al³⁺ en présence de DCMU a été analysée par la mesure du changement d'absorbance à 820 nm. Le DCMU est utilisé pour bloquer le flux d'électrons provenant du PSII. Les résultats ont montré qu'en présence de DCMU seule, l'addition d'Al³⁺ a entraîné un retard considérable dans la vitesse de la photooxydation de P700 à atteindre son état stationnaire ainsi qu'une diminution du niveau de l'amplitude des P700 photooxydées (Fig. 3A, chapitre IV). L'ajout du MV, un accepteur artificiel d'électrons très efficace qui a pour effet de favoriser le transport linéaire d'électrons en évitant la recombinaison de charge, a accéléré la photooxydation du P700 et par conséquent l'état stationnaire est rapidement atteint. De plus, le niveau de l'amplitude du P700 a augmenté (Fig. 3B, chapitre IV). Le ralentissement de la vitesse de photooxydation du P700 à atteindre l'état stationnaire sous l'effet d'Al³⁺ suggère que l'Al³⁺ a affecté le taux de séparation de charges entre P700 et A₀, le premier accepteur d'électrons, entraînant une inhibition du transfert d'électrons au niveau des transporteurs d'électrons sur le côté accepteur du PSI.

Afin d'estimer la quantité de la population active de P700, les mesures du taux de photooxydation du P700 ont été effectuées en se basant sur le paramètre du changement d'absorbance à 820 nm mesuré sur des échantillons des membranes de thylakoïdes traités avec différentes concentrations en Al^{3+} en présence de MV et de DCMU. Les résultats ont montré que l'amplitude de la photooxydation du P700 a diminué progressivement avec l'augmentation de la concentration en Al^{3+} affectant ainsi la quantité totale de P700 photooxydé à l'état stationnaire (Fig. 3B, chapitre IV). Cela indique que l' Al^{3+} est capable d'affecter une fraction de la population active de P700 dans le CR du PSI, en diminuant sa quantité, causant ainsi un dommage partiel du centre photochimique de PSI et par conséquent la diminution de l'activité photochimique du PSI. Cependant, il est important de noter qu'à fortes concentrations en Al^{3+} une grande proportion de P700 reste active comparée à la population de P700 affectée par Al^{3+} (Fig. 3B, chapitre IV).

La fluorescence chlorophyllienne à basse température (77 K) a été mesurée sur des échantillons des fractions membranaires enrichies en PSI afin d'étudier l'effet d' Al^{3+} sur le transfert de l'énergie d'excitation du LHCI vers le CR du PSI et d'examiner ainsi l'état de connexion des antennes LHCI avec le CR du PSI. À température cryogénique, on obtient une bande caractéristique à 730 nm provenant de l'émission des Chls rouges contenues dans les deux hétérodimères, Lhca2,3 et Lhca1,4, qui constituent les antennes LHCI. Les résultats ont montré que l'amplitude relative du spectre d'émission de la fluorescence à 730 nm a augmenté en parallèle avec l'augmentation de la concentration en Al^{3+} (Fig. 4, chapitre IV). Ce résultat est dû à une réduction dans le transfert de l'énergie d'excitation depuis les antennes LHCI vers le CR du PSI, ce qui témoigne probablement d'un détachement des antennes LHCI du CR.

Pour élucider l'effet d' Al^{3+} sur la composition polypeptidique du complexe de PSI, des électrophorèses sur gel de polyacrylamide ont été effectuées avec des fractions membranaires enrichies en PSI traitées avec différentes concentrations en Al^{3+} . Les résultats ont montré que les deux polypeptides du CR de PSI, PsaA et PsaB de poids moléculaire approximative de 60 kDa ont diminué d'intensité progressivement en

fonction de l'augmentation de la concentration en Al^{3+} (Fig. 5, chapitre IV). Ceci laisse suggérer qu'il existe une corrélation entre la diminution de l'activité photochimique du CR de PSI et le changement de l'intégrité de ces polypeptides (PsaA et PsaB) ainsi que la réduction de la population de P700 active. Cependant, les polypeptides Lhca2,3 et Lhca1,4, avec des poids moléculaires apparents de 21 à 25 kDa, n'ont présenté aucun changement avec l'ajout d' Al^{3+} . Ceci suggère que les antennes LHCI, avec ses deux hétérodimères Lhca2,3 et Lhca1,4, n'ont pas été dégradées, mais elles ont été probablement dénaturées suite à des changements de conformation dans leurs structures causant ainsi leur détachement du CR (Fig. 5, chapitre IV).

La FTIR a été utilisée pour caractériser l'effet d' Al^{3+} sur les structures secondaires des polypeptides du complexe de PSI. Dans notre étude, on s'est basé sur la bande protéique amide I du spectre FTIR des fractions membranaires enrichies en PSI. Cette bande amide I, attribuable à l'étirement de la liaison C=O, est une bande large de forte intensité à 1655 cm^{-1} énormément utilisée vu sa sensibilité aux changements de conformation dans les structures secondaires des polypeptides suite à la complexation des protéines (Surewicz et Mantsch, 1988; De Las Rivas et Barber, 1997). L'analyse quantitative de la structure secondaire des fractions membranaires enrichies en PSI et de ses complexes avec les différentes concentrations en Al^{3+} a été réalisée afin d'estimer le degré de modification structurale des polypeptides du PSI (Fig. 6, chapitre IV). La structure secondaire des polypeptides du PSI libre est composée de 51 % d'hélices α ($1650\text{-}1658 \text{ cm}^{-1}$), 28 % de feuillets β ($1613\text{-}1640 \text{ cm}^{-1}$), 8 % de coudes β ($1663\text{-}1678 \text{ cm}^{-1}$) et 13 % de feuillets β -antiparallèles ($1679\text{-}1685 \text{ cm}^{-1}$). Suite à l'addition d'une forte concentration d' Al^{3+} (10 mM), une altération majeure dans la structure secondaire des polypeptides du PSI a été observée. En effet, les hélices α ont diminué de 51 à 38 % alors que les structures des feuillets β ont augmenté de 28 à 33 % pour le complexe PSI- Al^{3+} (10 mM). En parallèle avec cette augmentation, les structures coudes β et feuillets β -antiparallèles ont augmenté aussi de 8 à 11 % et de 13 à 18 % respectivement, pour le même complexe PSI- Al^{3+} (10 mM) (Fig. 6, chapitre IV). Ces résultats témoignent que l' Al^{3+} a induit des changements conformationnels des différentes structures secondaires des polypeptides du PSI. En effet, la conversion des

hélices α en feuillets β , coudes β et feuillets β -antiparallèles suggère que, plus particulièrement, les polypeptides intrinsèques transmembranaires riches en hélices α à savoir PsaA, PsaB, LHCI et autres polypeptides, sont les plus affectés par les modifications structurales induites par Al^{3+} . Ces altérations observées au niveau des structures secondaires des polypeptides du PSI en présence d' Al^{3+} ont mis en évidence une réorganisation du complexe de PSI causant ainsi la dénaturation de sa structure protéique. Ceci est probablement dû à une interaction électrostatique d' Al^{3+} avec les polypeptides du PSI et plus précisément au niveau du groupe fonctionnel C=O. Ainsi, toutes ces modifications sont à l'origine d'une inhibition mesurable de l'activité photochimique du PSI associée à une réduction du transfert d'énergie d'excitation et de l'activité du transport d'électrons photosynthétique du PSI.

5.4 Perspectives de recherche

Les mécanismes de toxicité d' Al^{3+} chez les plantes supérieures et plus précisément au niveau de la machinerie photosynthétique restent très peu explorés et rarement discutés dans la littérature jusqu'à présent. C'est dans ce contexte que notre étude a été faite en contribuant à l'avancement des connaissances dans le domaine de la photosynthèse tout en se servant d'une panoplie de techniques biophysiques et biochimiques sophistiquées et répondant à nos objectifs. À notre connaissance, notre étude est la première qui a permis d'élaborer un modèle sur les sites d'action des effets toxiques d' Al^{3+} et d'interpréter ses mécanismes d'inhibition sur l'activité photochimique des photosystèmes I et II et le taux de transport d'électrons photosynthétique. De plus, la comparaison de la sensibilité des deux photosystèmes vis-à-vis les effets toxiques d' Al^{3+} , tant du point de vue structural que fonctionnel, nous a permis de constater que le PSI est moins sensible à l'effet d' Al^{3+} que le PSII puisqu'il nécessite une concentration plus importante pour être inhibé.

Ainsi, les travaux de notre étude présentés aux chapitres II, III et IV, discutés précédemment et qui révèlent un aspect relativement original, ouvrent de nombreuses perspectives :

Dans les deux premières parties de notre étude (chapitre II et III), nous avons montré que l' Al^{3+} est capable d'inhiber l'activité du PSII en se fixant sur différents sites. Cette inhibition est due principalement à la déstabilisation du CEO suite à son interaction avec Al^{3+} causant ainsi la désorganisation du complexe de Mn_4O_5Ca et le détachement des polypeptides extrinsèques. Cependant, les sites de fixation d' Al^{3+} ainsi que son mode d'interaction au niveau des différentes structures du CEO demeurent ambigus, ce qui soulève également plusieurs points qu'il serait nécessaire de clarifier. À cet effet, il serait intéressant d'étudier la structure cristalline du CEO en présence d' Al^{3+} , en se basant sur des expériences de cristallographie aux rayons X, afin de mieux élucider les mécanismes d'action d' Al^{3+} sur le plan moléculaire. De même, il pourrait également être intéressant d'étudier l'interaction entre Al^{3+} et les polypeptides extrinsèques isolés par différentes techniques spectroscopiques à savoir, la spectroscopie FTIR et le dichroïsme circulaire (CD), afin de mieux éclaircir les modes d'interaction d' Al^{3+} avec ces structures. Il est important de noter que cette étude est faisable uniquement avec les polypeptides extrinsèques déjà commercialisés dont les structures restent natives après leur isolation.

Dans la troisième partie de notre étude (chapitre IV), on a mis en évidence l'effet inhibiteur d' Al^{3+} sur l'activité du PSI tout en précisant les différents sites d'action d' Al^{3+} . Parmi les sites potentiels d' Al^{3+} , nous avons identifié la PC comme site d'inhibition, mais le mécanisme d'interaction moléculaire reste encore indéterminé. À cet effet, il serait intéressant de clarifier ce point avec des expériences de cristallographie aux rayons X, de FTIR et de CD qui seront faites sur la molécule de PC isolée.

De plus, le marquage isotopique d' Al^{3+} dans les extraits de PSI et PSII pourrait être envisagé comme une étude complémentaire afin de préciser les sites de liaison d' Al^{3+} avec les différentes composantes des deux photosystèmes.

Sur le plan de la pratique sanitaire, environnementale et économique, il pourrait être intéressant d'extrapoler cette étude sur les plantes à incidence économique à savoir le riz, le blé et le maïs *in vivo*.

Dans le même contexte, Chen *et al.* (2008) ont démontré que les polyamines et plus particulièrement les putrescines sont capables de protéger les plantes soumises au stress de l'Al dans des conditions *in vitro*. Il serait donc important de s'intéresser au développement de diverses approches concernant l'utilisation de ce genre de molécules biologiques, telle la putrescine, pour protéger l'appareil photosynthétique contre la toxicité de l'Al³⁺ *in vivo*.

Enfin, le dernier point qui me semble nécessaire d'être élucidé puisqu'il constitue un problème toxicologique émergent, sur le plan environnemental et sanitaire, au cours de ces dernières années et qui est très peu documenté, est la détermination des effets des nanoparticules d'Al et leurs mécanismes de toxicité au niveau de l'appareil photosynthétique et les comparer aux mécanismes d'action d'Al³⁺.

BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE

- Abdalla, M. M. (2008) Physiological aspects of aluminum toxicity on some metabolic and hormonal contents of *Hordeum vulgare* seedlings, *Aust. J. Basic App. Sci.* 2: 549-560.
- AFNOR (2003) Qualité de l'eau, Détermination de l'indice biologique macrophytique en rivière (IBMR), Norme NF T90-354.
- AFNOR (2007) Qualité de l'eau, Détermination de l'Indice Biologique Diatomées (IBD), Norme NF T90-354.
- Ait Ali, N., Dewez, D., Didur, O., Popovic, R. (2006) Inhibition of photosystem II photochemistry by Cr is caused by the alteration of both D1 protein and oxygen evolving complex, *Photosynth. Res.* 89: 81-87.
- Akaya, M., Takenaka, C. (2001) Effects of aluminum stress on photosynthesis of *Quercus glauca* Thumb, *Plant Soil* 237: 137-146.
- Alia, P., Saradhi, P. P. (1991) Proline accumulation under heavy metal stress, *J. Plant Physiol.* 138: 554-558.
- Allen, J. F. (1992) Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta* 1098: 275-335.
- Allen, J. F., Forsberg, J. (2001) Molecular recognition in thylakoid structure and function, *Trends Plant Sci.* 6: 317-320.
- Allen, J. F., de Paula, W. B. M., Puthiyaveetil, S., Nield, J. (2011) A structural phylogenetic map for chloroplast photosynthesis, *Trends Plant Sci.* 16: 645-655.
- Alves, P., Magalhaes, A. C. N., Barja, P. R. (2002) The phenomenon of photoinhibition of photosynthesis and its importance in reforestation, *Bot. Rev.* 68: 193-208.
- Amunts, A., Drory, O., Nelson, N. (2007) The structure of a plant photosystem I supercomplex at 3.4 Å resolution, *Nature* 447: 58-63.
- Amunts, A., Toporik, A., Borovikova, N. N. (2010) Structure determination and improved model of plant photosystem I, *J. Biol. Chem.* 285: 3478-3486.

- Anderson, J. M., Anderson, B. (1988) The dynamic photosynthetic membrane and regulation of solar energy conversion, *Trends Biochem. Sci.* 13: 351-355.
- Aro, E. M., Virgin, I., Andersson, B. (1993) Photoinhibition of photosystem II, Inactivation, protein damage and turnover, *Biochim. Biophys. Acta* 1143:113-134.
- Atkins, P. W., Jones, L. (1998) *Chimie: molécules, matière, métamorphoses* DeBoeck, Bruxelles, Belgique, pp. 881.
- Azmat, R., Hasan, S. (2008) Photochemistry of light harvesting pigments and some biochemical changes under aluminum stress, *Pak. J. Bot.* 40: 779-784.
- Ballottari, M., Girardon, J., Dall'Osto, L., Bassi, R. (2012) Evolution and functional properties of photosystem II light harvesting complexes in eukaryotes, *Biochim. Biophys. Acta*, 1817: 143-157.
- Barber, J., Kuhlbrandt, W. (1999) Photosystem II, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9: 469-475.
- Barber, J., Nield, J., Morris, E. P., Hankamer, B. (1999) Subunit positioning in photosystem II revisited, *Trends Biochem. Sci.* 24: 43-45.
- Barber, J. (2006) Photosystem II: an enzyme of global significance, *Biochem. Soc. Trans.* 34: 619-631.
- Barra, M., Haumann, M., Dau, H. (2005) Specific loss of the extrinsic 18 kDa protein from photosystem II upon heating to 47 degrees C causes inactivation of oxygen evolution likely due to Ca release from the Mn-complex, *Photosynth. Res.* 84: 231-237.
- Bassi, R., Sandona, D., Croce, R. (1997) Novel aspect of chlorophyll a/b binding proteins, *Physiol. Plant.* 100: 769-779.
- Beauchemin, R., Gauthier, A., Harnois, J., Boisvert, S., Govindachary, S. Carpentier, R. (2007) Spermine and spermidine inhibition of photosystem II: Disassembly of the oxygen evolving complex and consequent perturbation in electron donation from TyrZ to P680⁺ and the quinone acceptors Q_A⁻ to Q_B⁻, *Biochim. Biophys. Acta* 1767: 905-912.
- Belatik, A., Hotchandani, S., Tajmir-Riahi, H. A., Carpentier, R. (2013) Alteration of the structure and function of photosystem I by Pb²⁺, *J. Photochem. Photobiol. B* 123: 41-47.
- Ben-Shem, A., Frolov, F., Nelson, N. (2003) Crystal structure of plant photosystem I, *Nature* 426: 630-635.

- Bertrand, M., Poirier, I. (2005) Photosynthetic organisms and excess of metals, *Photosynthetica* 43: 345-353.
- Biesiadka, J., Loll, B., Kern, J., Irrgang, K. D., Zouni, A. (2004) Crystal structure of cyanobacterial photosystem II at 3.2 Å resolution: a closer look at the Mn-cluster, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6: 4733-4736.
- Blankenship, R. E. (2002) *Molecular mechanisms of Photosynthesis*, Blackwell Science Ltd., Oxford, UK, pp. 321.
- Boekema, E. J., Van Breemen, J. F. L., Van Roon, H., Dekker, J. P. (2000) Conformational Changes in Photosystem II Supercomplexes upon Removal of Extrinsic Subunits, *Biochemistry* 39: 12907-12915.
- 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.
- Boisvert, S., Joly, D., Leclerc, S., Govindachary, S., Harnois, J., Carpentier, R. (2007) Inhibition of the oxygen evolving complex of photosystem II and depletion of extrinsic polypeptides by nickel, *Biomaterials* 20: 879-889.
- Boucher, N., Carpentier, R. (1999) Hg²⁺, Cu²⁺, and Pb²⁺ induced changes in Photosystem II photochemical yield and energy storage in isolated thylakoïd membranes: A study using simultaneous fluorescence and photoacoustic Measurements, *Photosynth. Res.* 59: 167-174.
- Bricker, T. M. (1992) Oxygen evolution in the absence of the 33 kDa manganese-stabilizing protein, *Biochemistry* 31: 4623-4628.
- Bricker, T. M., Ghanotakis, D. F. (1996) Introduction to oxygen evolution, in: Ort, D. F., Yocum, C. F., (Eds.), *Oxygenic photosynthesis: the light reactions*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherland, pp. 113-136
- Bricker, T. M., Frankel, L. V. (1998) The structure and function of the 33 kDa extrinsic protein of photosystem II: a critical assessment, *Photosynth. Res.* 56: 157-173.
- Bricker, T. M., Burnap, R. L., (2005) The extrinsic proteins of Photosystem II, in: Wydrzynski, T., Satoh, K., (Eds.), *Photosystem II: The light driven water: Plastoquinone oxidoreductase*, Springer, Dordrecht, The Netherland, pp. 95-120.
- Bricker, T. M., Roose, J. L., Fagerlund, R. D., Frankel, L. K., Eaton-Rye, J. J. (2012) The extrinsic proteins of photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta* 1817: 121-142.

- Britt, R. D. (1996) Oxygen evolution, in: Ort, D. R., Yocum, C., (Eds.), Oxygenic photosynthesis: the light reactions, Kluwer academic publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 137-164.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. (2000) Biochemistry and molecular biology of plants, American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, USA, pp. 1367.
- Bukhov, N. G., Egorova, E. A., 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 thylakoïds, Biochim. Biophys. Acta 1657: 121-130.
- Campbell, P. G. C., Couillard. Y. (2004) Prise en charge et détoxification des métaux chez les organismes aquatiques, Dans: Pelletier, E., Campbell P. G. C., Denizeau, F., (Eds.), Écotoxicologie Moléculaire, Presses de l'Université du Québec, Québec, Canada, pp. 10-61.
- Carpentier, R., (2002) The negative action of toxic divalent cations on the photosynthetic apparatus, in: Pessaraki, M., (Ed.), Handbook of plant and crop physiology, Marcel Dekker, New York, USA, pp. 764-772.
- Castelletti, S., Morosinotto, T., Robert, B., Caffarri, S., Bassi, R., Croce, R. (2003) Recombinant Lhca2 and Lhca3 subunits of the photosystem I antenna system, Biochemistry 42: 4226-4234.
- Chen, L. S., Qi, Y. P., Liu, X. H. (2005a) Effects of aluminum on light energy utilization and photoprotective systems in citrus leaves, Ann. Bot. 96: 35-41.
- Chen, L. S., Qi, Y. P., Smith, B. R., Liu, X. H. (2005b) Aluminum-induced decrease in CO₂ assimilation in citrus seedlings is unaccompanied by decreased activities of key enzymes involved in CO₂ assimilation, Tree Physiol. 25: 317-324.
- Chen, W., Xu, C., Zhao, E. B., Wang, E. X., Wang, E. Y. (2008) Improved Al tolerance of saffron (*Crocus sativus* L.) by exogenous polyamines, Acta Physiol. Plant. 30: 121-127.
- De Las Rivas, J., Barber, J. (1997) Structure and thermal stability of photosystem II reaction centres studied by infrared spectroscopy, Biochemistry 36: 8897-8903.
- De Las Rivas, J., Balsera, M., Barber, J. (2004) Evolution of oxygenic photosynthesis: Genome-wide analysis of the OEC extrinsic proteins, Trends Plant Sci. 9: 18-25.

- De Las Rivas, J., Roman, A. (2005) Structure and evolution of the extrinsic proteins that stabilize the oxygen-evolving engine, *Photochem. Photobiol. Sci.* 4:1003-1010.
- De Wijn, R., Van Gorkom, J. (2001) Kinetics of electron transfer from Q_A to Q_B in photosystem II, *Biochemistry* 40: 11912-11922.
- Debus, R. J. (1992) The manganese and the calcium-ions of photosynthetic oxygen evolution, *Biochim. Biophys. Acta* 1102: 269-352.
- Dekker, J. P., Van Grondelle, R. (2000) Primary charge separation in photosysteme II, *Photosynth. Res.* 63: 195-208.
- Dekker, J. P., Boekema, E. J. (2005) Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants, *Biochim. Biophys. Acta* 1706: 12-39.
- Delhaize, E., Craig, S., Beaton, C. D., Bennet, R. J., Jagdish', V. C., Randall, P. I. (1993) Aluminum Tolerance in Wheat (*Triticum aestivum* L.) 1. Uptake and Distribution of Aluminum in Root Apices, *Plant Physiol.* 103: 685-693.
- Delhaize, E., Ryan, P. R. (1995) Aluminum toxicity and tolerance in plants, *Plant Physiol.* 107: 315-321.
- Deng, C. N., Zhang, D. Y., Pan, X. L., Chang, F. Q., Wang, S. Z. (2013) Toxic effect of mercury on PSI and PSII activities, membrane potential and trans-thylakoid proton gradient in *Microsorium pteropus*, *J. Photochem. Photobiol. B* 127: 1-7.
- Deprez, G., Dobek, A., Geacintov, N. F., Paillotin, G., Breton, J. (1983) Probing fluorescence induction in chloroplasts on a nanosecond time scale utilizing picosecond laser pulse pairs, *Biochim. Biophys. Acta* 725: 444-454.
- Dewez, D., Geoffroy, L., Vernet, G., Popovic. R. (2005) Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*, *Aquat. Toxicol.* 74: 150-159.
- Driscoll, C. T., Schecher, W. D. (1990) The chemistry of aluminum in the environment, *J. Environ. Perspect. Health.* 12: 28-49.
- Driscoll, C. T., Otton, J. K., Inverfeldt, A. (1994) Trace metals speciation and cycling, in: Moldan, B., Cerny, J., (Eds.), *Biogeochemistry of small catchments: a tool for environmental research*, Wiley and Sons, New York, USA, pp. 299-322.

- Ekmekçia, Y., Tanyolaçb, D., Ayhana, B. (2008) Effects of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars, *J. Plant Physiol.* 165: 600-611.
- Enami, I., Okumura, A., Nagao, R., Suzuki, T., Iwai, M., Shen, J. R. (2008) Structures and Functions of the extrinsic proteins of photo system II form different species, *Photosynth. Res.* 98: 349-363.
- Environnement Canada (1999) Loi canadienne sur la protection de l'environnement [LCPE (1999)], <http://www.ec.gc.ca/lcpe-cepa/default.asp?lang=Fr&n=26A03BFA-1>
- Facey, R. M., Smith, D. W. (1993) Northwest Territories water quality study 1990-1993. Summary report, Produced by Smith D. W. and Associates Ltd., Edmonton, Alberta, for the Department of Municipal and Community Affairs, Government of Northwest Territories.
- Falier, P., Kienzler, K., Krieger-Liszkay, A. (2005) Mechanism of Cd²⁺ toxicity: Cd²⁺ inhibits photoactivation of Photosystem II by competitive binding to the essential Ca²⁺ site, *Biochim. Biophys. Acta* 1706: 158-164.
- Ferreira, K. N., Iverson, T. M., Maghlaoui, K., Barber, J., Iwata, S. (2004) Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center, *Science* 303: 1831-1838.
- Fletcher, J. (1991) Keynote speech: a brief overview of plant toxicity testing, in: Gorsuch, J. W., Lower, W. R., Wang, W., Lewis, M. A., (Eds.), *Plants for Toxicity Assessment*, ASTM STP 1115, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA, pp. 5-11.
- Foy, C. D. (1984) Physiological effects of hydrogen, aluminum, and manganese toxicities in acid soil. in: Adams, F., (Ed.), *Soil Acidity and Liming*, American Society of Agronomy, Madison, WI, USA, pp.57-97.
- Foy, C. D. (1988) Plant adaptation to acid, aluminum-toxic soils, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 19: 959-987.
- Foyer, C. H., Lelandais, M., Harbinson, J. (1992) Control of the quantum efficiencies of photosystems I and II, electron flow, and enzyme activation following dark-to-light transitions in pea leaves, *Plant Physiol.* 99: 979-986.
- Fromme, P., Jordan, P., Krauß, N. (2001) Structure of photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta* 1507: 5-31.

- Garrels, R. M., Mackenzie, F.T., Hunt, C. (1975) Chemical cycles and the global environment, William Kaufmann Inc., Los Altos, California, USA, pp. 206.
- Germain, A., Gagnon, C., Lind, C. B. (1999) Entry and exposure characterization for aluminum chloride, aluminum nitrate, and aluminum sulphate, Document à l'appui du Programme d'évaluation des substances d'intérêt prioritaire, Loi canadienne sur la protection de l'environnement, ébauche préliminaire, pp.109.
- Gilmore, A. M. (1997) Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves, *Physiol. Plant.* 99: 197-209.
- Gobets, B., van Stokkum, I. H., Rögner, M., Kruij, J., Schlodder, E., Karapetyan, N. V., Dekker, J. P., Van Grondelle, R. (2001) Time-resolved fluorescence emission measurements of photosystem I particles of various cyanobacteria: a unified compartmental model, *Biophys. J.* 81:407-424.
- Govindachary, S., Bukhov, N. G., Joly, D., Carpentier, R. (2004) Photosystem II inhibition by moderate light under low temperature in intact leaves of chilling sensitive and-tolerant plants, *Physiol. Plant.* 121: 322-333.
- Govindjee, Coleman, W. J. (1990) How plants make oxygen, *Sci. Am.* 262: 50-58.
- Govindjee (2004) Chlorophyll a Fluorescence: A Bit of Basics and History, in: Papageorgiou, G., Govindjee, (Eds.), *Chlorophyll a Fluorescence: A Probe of Photosynthesis*, Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands, pp. 2-42.
- Green, B. R., Dumford, D. G. (1996) The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 685-714.
- Gregor, W., Cinco, R. M., Yu, H., Yachandra, V. K., Britt, D. (2005) Influence of the 33 kDa manganese-stabilizing protein on the structure and substrate accessibility of the oxygen-evolving complex of photosystem II, *Biochemistry* 44: 8817-8825.
- Hamdani, S., Carpentier, R. (2009) Interaction of methylamine with extrinsic and intrinsic subunits of photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta* 1787: 1223-1229.
- Hankamer, B., Nield, J., Zheleva, D., Boekema, E., Jansson, S., Barber, J. (1997) Isolation and biochemical characterisation of monomeric and dimeric photosystem II complexes from spinach and their relevance to the organisation of photosystem II in vivo, *Eur. J. Biochem.* 243: 422-429.
- Hasni, I., Hamdani, S., Carpentier, R. (2013) Destabilization of the oxygen evolving complex of Photosystem II by Al^{3+} , *Photochem. Photobiol.* 89: 1135-1142.

- He, W. Z., Newell, W. R., Haris, P. I., Chapman, D., Barber, J. (1991) Protein secondary structure of the isolated photosystem II reaction centre and conformational changes studied by Fourier transformation infrared spectroscopy, *Biochemistry* 30: 4552-4559.
- Heber, U., Neimanis, S., Dietz, K. J., Viil, J. (1986) Assimilatory power as a driving force in photosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta* 852: 144-155.
- Heller, R., Esnault, R., Lance, C. (1998) *Physiologie végétale. 1. Nutrition*, Dunod, Paris, France, pp. 323.
- Heredia, P., De Las Rivas. J. (2003) Calcium dependant conformational change and thermal stability of the isolated PsbO protein detected by FTIR spectroscopy, *Biochemistry* 42: 11831-11838.
- Hermans, C., Johnson, G. N., Strasser, R. J., Verbruggen, N. (2004) Physiological characterization of magnesium deficiency in sugar beet: acclimation to low magnesium differentially affects photosystems I and II, *Planta* 220: 344-355.
- Homann, P. H., (1999) Reliability of photosystem II thennoluminescence measurements after sample freezing: few artifacts with photosystem II membranes but gross distortions with certain leaves, *Photosynth. Res.* 62: 219-229.
- Honeycutt, R. C., Krogmann, D. W. (1972) Inhibition of chloroplast reactions with phenylmercuric acetate, *Plant Physiol.* 49: 376-380.
- Hopkins, W. (1999) *Introduction to Plant Physiology*, John Wiley and Sons Inc., New York, USA, pp. 464.
- Horton, H. R., Moran, L. A., Ochs, R. S., Rawn, D. J., Scrimgeour, K. G. (2002) *Principles of Biochemistry* (3rd edition) Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, USA.
- Izawa, S. (1980) Acceptors and donors for chloroplast electron transport, *Methods Enzymol.* 69: 413-434.
- Jensen, P., Bassi, R., Boekema, E., Dekker, J., Jansson, S., Leister, D., Robinson, C., Scheller, H. (2007) Structure, function and regulation of plant photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta* 1767: 335-352.
- Jiang, H. X., Chen, L. S., Zheng, J. G., Han, S., Tang, N., Smith, B. R. (2008) Aluminum induced effects on photosystem II photochemistry in *citrus* leaves assessed by the chlorophyll a fluorescence transient, *Tree Physiol.* 28: 1863-1871.

- Jin, S. H., Li, X. Q., Jia, X. L. (2011) Genotypic differences in the responses of gas exchange, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzymes to aluminum stress in *Festuca arundinacea*. *Russ. J. Plant Physiol.* 58: 560-566.
- Joliot, P., Barbieri, G., Chabaud, R. (1969) A new model of photochemical centers in system 2, *Photochem. Photobiol.* 10: 309-329.
- Joly, D., Bigras, C., Harnois, J., Govindachary, S., Carpentier, R. (2005) Kinetic analyses of the OJIP chlorophyll fluorescence rise in thylakoid membranes, *Photosynth. Res.* 84: 107-112.
- Joly, D., Carpentier, R., (2009) Sigmoidal reduction kinetics of the photosystem II acceptor side in intact photosynthetic materials during fluorescence induction, *Photochem. Photobiol. Sci.* 8: 167-173.
- Joly, D., Essemine J., Carpentier, R. (2010) Redox state of the photosynthetic electron transport chain in wild-type and mutants leaves of *Arabidopsis thaliana*: Impact on photosystem fluorescence, *J. Photochem. Photobiol. B* 98: 180-187.
- Jordan, P., Fromme, P., Witt, H., Klukas, O., Saenger, W., Krauss, N. (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution, *Nature* 411: 909-917.
- Juneau, P., Dewez, D., Matsumi S., Kim, S. G., Popovic, R. (2001) Evaluation of different algal species sensitivity to mercury and metachlor by PAM-fluorometry, *Chemosphere* 45: 589-598.
- Kamiya, N., Shen, J. R. (2003) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7 Å resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 98-103.
- Kana, R., Lazar, D., Prasil, O., Naus, J. (2002) Experimental and theoretical studies on the excess capacity of Photosystem II, *Photosynth. Res.* 72: 271-284.
- Karapetyan, N., Schlodder, E., Van Grondelle, R., Dekker, J. P. (2006) The long wavelength chlorophylls of photosystem I, in: Golbeck, J. H., (Ed.), *Photosystem I: The Light-Driven Plastocyanin: Ferredoxin Oxidoreductase*, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp.177-192.
- Kautsky, H., Hirsch, A. (1931). Neue versuche zur kohlensaure assimilation, *Die Naturwissenschaften*, 19: 964-964.

- Kawakami, K., Umena, Y., Kamiya, N., Shen, J. R. (2011) Structure of the catalytic, inorganic core of oxygen-evolving photosystem II at 1.9 Å resolution, *J. Photochem. Photobiol. B.* 104: 9-18.
- Ke, B. (2001) *Photosynthesis: Photobiochemistry and Photobiophysics*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 763.
- Khrouchtchova, A., Hansson, M., Paakkanen, V., Vainonen, J. P., Zhang, S., Jensen, P. E., Scheller, H. V., Vener, A. V., Aro, E. M., Haldrup, A. (2005) A previously found thylakoïd membrane protein of 14 kDa (TMP14) is a novel subunit of plant photosystem I and is designated PSI-P, *FEBS Lett.* 579: 4808-4812.
- Kinraide, T. B. (1991) Identity of the rhizotoxic aluminum species, *Plant Soil* 134: 167-178.
- Kirkwood, D. E., Nesbitt, H. W. (1991) Formation and evolution of soils from an acidified watershed: Plastic Lake, Ontario, Canada, *Geochim. Cosmochim. Acta* 55: 1295-1308.
- Knoetzel, J., Mant, A., Haldrup, A., Jensen, P. E., Scheller, H. V. (2002) A new 10 kDa subunit of eukaryotic photosystem I, *FEBS Lett.* 510: 145-148.
- Kochian, L. V. (1995) Cellular Mechanisms of Aluminum Toxicity and Resistance in Plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 237-260.
- Kochian, L. V., Hoekenga, O. A., Piñeros, M. A. (2004) How do crop plants tolerate acid soil? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency, *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:459-493.
- Kochian, L. V., Pineros, M. A., Hoekenga O. A. (2005) The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity, *Plant Soil* 274: 175-195.
- Kok, B., Forbush, B., Mcgloin, M. (1970) Cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution .1. A linear 4 step mechanism, *Photochem. Photobiol.* 11: 457-475.
- Kramer, D. M., Johnson, G., Kiirats, O., Edwards, G. E. (2004) New fluorescence parameters for the determination of Q_A redox state and excitation energy fluxes, *Photosynth. Res.* 79: 209-218.
- Krause, G. H., Weis, E. (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basis, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 313-349.

- Krieger, A., Weis, E., Demeter, S. (1993) Low pH-induced Ca^{2+} ion release in the water-splitting system is accompanied by a shift in the midpoint redox potential of the primary quinone acceptor Q_A , *Biochim. Biophys. Acta* 1144: 411-418.
- Krimm, S., Bandekar, J. (1986) Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides and proteins, *Adv. Protein Chem.* 38: 181-364.
- Landry, B., Mercier, M., (1992) *Notions de géologie*, 3e édition, Modulo, Mont-Royal Québec, Canada, pp. 565.
- Lavoie, M., Fortin, C., Campbell, P. G. C. (2012) Influence of essential elements on cadmium uptake and toxicity in a unicellular green alga: The protective effect of trace zinc and cobalt concentrations, *Environ. Toxicol. Chem.* 31: 1445-1452.
- Lazár, D. (1999) Chlorophyll fluorescence induction, *Biochim. Biophys. Acta* 1412: 1-28.
- Lazár, D. (2006) The polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. *Funct. Plant Biol.* 33:9-30.
- Li, Z., Xing, F., Xing, D. (2012) Characterization of target site of aluminum phytotoxicity in photosynthetic electron transport by fluorescence techniques in Tobacco leaves, *Plant Cell Physiol.* 53: 1295-1309.
- Lidon, F. C., Barreiro, M. G. (2002) An overview into aluminum toxicity in maize, *Bulg. J. Plant Physiol.* 28: 96-112.
- Lindsay, W. L. (1979) *Chemical Equilibria in Soils*, John Wiley and Sons, New York, USA, pp. 449.
- Liu, Z., Yan, K., Wang, K., Kuang, T., Zhang, L., Gui, L., An, X., Chang, W. (2004) Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution, *Nature* 428: 287-292.
- Loll, B., Kern, J., Saenger, W., Zouni, A., Biesiadka, J. (2005) Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II, *Nature* 438: 1040-1044.
- Lucinski, R., Jackowski, G. (2006) The structure, functions and degradation of pigment-binding proteins of photosystem II, *Acta Biochim. Pol.* 53: 693-708.
- Malkin, R., Niyogi, K. (2000) Photosynthesis, in: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R., (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, USA, pp. 568-628.

- Martin, R.B. (1991) Aluminum in biological systems, in: Nicolini, M., Zatta, P.F., Corain, B., (Eds.), Aluminum in chemistry, biology and medicine, Raven Press, New York, USA, pp. 3-20.
- Martins, N., Osório, M. L., Gonçalves, S., Osório, J., Palma, T., Romano, A. (2013) Physiological responses of *Plantago algarbiensis* and *P. almogravensis* shoots and plantlets to low pH and aluminum stress, *Acta Physiol. Plant.* 35: 615-625.
- Matsumoto, H. (2000) Cell biology of Al tolerance and toxicity in higher plants, *Int. Rev. Cytol.* 200: 1-46.
- Messinger, J., Seaton, G., Wydrzynski, T., Wacker, U., Renger, G. (1997) S3 state of the water oxidase in photosystem II, *Biochemistry* 36: 6862-6873.
- Mihailovic, N., Drazic, G., Vucinic, Z. (2008) Effects of aluminum on photosynthetic performance in Al-sensitive and Al-tolerant maize inbred lines, *Photosynthetica* 46: 476-480.
- Milivojevic, D. B., Stojanovi, D. D., Drini, S. D. (2000) Effects of aluminum on pigments and pigment-protein complexes of soybean, *Biol. Plant.* 43: 595-597.
- Ministre du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques du Québec, Projet de loi n° 72 (2002, chapitre 11) : Loi modifiant la Loi sur la qualité de l'environnement et d'autres dispositions législatives relativement à la protection et à la réhabilitation des terrains, <http://www.mdelcc.gouv.qc.ca/sol/terrains/loi-reg.htm>
- Miqyass, M., Van Gorkom, H. J., Yocum, C. F. (2007) The PSII calcium site revisited, *Photosynth. Res.* 92: 275-287.
- Miyao, M., Murata, N. (1984) Role of the 33 kDa polypeptide in preserving Mn in photosynthetic oxygen-evolution, *FEBS Lett.* 170: 350-354.
- Miyao, M., Murata, N., Lavorel, J., Maissonpeteri, B., Boussac, A., Etienne, A. L. (1987) Effect of the 33 kDa protein on the S-state transitions in photosynthetic oxygen evolution, *Biochim. Biophys. Acta* 890: 151-159.
- 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.
- Moustakas, M., Ouzounidou, G. (1994) Increased non-photochemical quenching in leaves of aluminum-stressed wheat plants is due to Al³⁺ induced elemental loss, *Plant Physiol. Biochem.* 32: 527-532.

- Moustakas, M., Ouzounidou, G., Lannoye, R. (1995) Aluminum effects on photosynthesis and elemental uptake in an aluminum tolerant and non-tolerant wheat cultivars, *J. Plant Nutr.* 18: 669-683.
- Moustakas, M., Ouzounidou, G., Eleftheriou, E. P., Lannoye, R. (1996) Indirect effects of aluminum stress on the function of the photosynthetic apparatus, *Plant Physiol. Biochem.* 34: 553-560.
- Moustakas, M., Eleftheriou, E. P., Ouzounidou, G. (1997) Short-term effects of aluminum at alkaline pH on the structure and function of the photosynthetic apparatus, *Photosynthetica* 34: 169-177.
- Msilini, N., Zaghoudi, M., Govindachary, S., Lachaâl, M., Ouerghi, Z., Carpentier, R. (2011) Inhibition of photosynthetic oxygen evolution and electron transfer from the quinone acceptor Q_A^- to Q_B by iron deficiency, *Photosynth. Res.* 107: 247-256.
- Müller, P., Li, X. P., Niyogi, K. K. (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy, *Plant Physiol.* 125: 1558-1566.
- Murata, N., Mijao, M., Omata, T., Matsunami, H., Kuwabara, T. (1984) Stoichiometry of components in the photosynthetic oxygen evolution system of photosystem II particles prepared with Triton X-100 from spinach chloroplast, *Biochim. Biophys. Acta* 765: 363-369.
- Murray, J. W., Barber, J. (2007) Structural characteristics of channels and pathways in photosystem II including the identification of an oxygen channel, *J. Struct. Biol.* 159: 228-237.
- Mustardy, L., Garab, G. (2003) Granum revisited, A three dimensional model where things fall into place, *Trends Plant Sci.* 8: 117-122.
- Nahar, S., Carpentier, R., Tajmir-Riahi, H. A. (1997) Interaction of trivalent Al and Ga cations with proteins of PSII. Cation binding mode and protein conformation by FTIR spectroscopy, *J. Inorg. Biochem.* 65: 245-250.
- Najafpour, M. M., Govindjee (2011) Oxygen evolving complex in photosystem II: better than excellent, *Dalton Trans.* 40: 9076-9084.
- Najafpour, M. M., Allakhverdiev, S. I. (2012) Manganese compounds as water oxidizing catalysts for hydrogen production via water splitting: from manganese complexes to nano-sized manganese oxides, *Int. J. Hydrogen Energy* 37: 8753-8764.

- Najafpour, M. M., Nemati Moghaddam, A. S., Allakhverdiev, I., Govindjee (2012) Biological water oxidation: lessons from nature, *Biochim. Biophys. Acta* 1817: 1110-1121.
- Nakatani, H. Y. (1984) Photosynthetic oxygen evolution does not require the participation of polypeptides of 16 and 24 kilodaltons, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120: 299-304.
- Nelson, N., Yocum, C. F. (2006) Structure and function of photosystems I and II, *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 521-565.
- Ohki, K. (1986) Photosynthesis, chlorophyll, and transpiration responses in aluminum stressed wheat and sorghum, *Crop Sci.* 26: 572-575.
- Peixoto, H. P., Da Matta, F. M., Da Matta, J. C. (2002) Responses of the photosynthetic apparatus to aluminum stress in two sorghum cultivars, *J. Plant Nutr.* 25: 821-832.
- Pereira, W. E., Siqueira, D. L., Martínez, C. A., Puiatti, M. (2000) Gas exchange and chlorophyll fluorescence in four citrus root stocks under aluminum stress, *J. Plant Physiol.* 157: 513-520.
- Pereira, L. B., Tabaldi, L. A., Goncalves, J. F., Juckeoski, G. O., Pauletto, M. M., Weis, S. N., Nicoloso, F. T., Bocher, D., Rocha, J. B. T., Schetinger, M. R. C. (2006) Effect of aluminum on aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) and the development of cucumber (*Cucumis sativus* L.), *Environ. Exp. Bot.* 57: 106-115.
- Perreault, F., Dewez, D., Fortin, C., Juneau, P., Diallo, A., Popovic, R. (2010) Effect of aluminum on cellular division and photosynthetic electron transport in *Euglena gracilis* and *Chlamydomonas acidophila*, *Environ. Toxicol. Chem.* 29: 887-92.
- Pinto, E., Sigaud-Kutner, T. C. S., Leitao, M. A. S., Okamoto, O. K., Morse, D., Colepicolo, P. (2003) Heavy Metal Induced Oxidative Stress in Algae, *J. Phycol.* 39: 1008-1018.
- Plekhanov, S. E., Chemeris Yu, K. (2003) Early Toxic Effects of Zinc, Cobalt, and Cadmium on Photosynthetic Activity of the Green Alga *Chlorella pyrenoidosa* Chick S-39, *Biology Bull.* 30: 506-511.
- Popelková, H., Betts, S. D., Lydakis-Symantiris, N., Im, M. M., Swenson E., Yocum, C. F. (2006) Mutagenesis of basic residues R151 and R161 in manganese-stabilizing protein of photosystem II causes inefficient binding of chloride to the oxygen evolving complex, *Biochemistry* 45: 3107-3115.

- Popelková, H., Boswell, N., Yocum, C. F. (2011) Probing the topography of the photosystem II oxygen evolving complex: PsbO is required for efficient calcium protection of the manganese cluster against dark-inhibition by an artificial reductant, *Photosynth. Res.* 110: 111-121.
- Poschenrieder, C., Gunsé, B., Corrales, I., Barceló, J. (2008) A glance into aluminum toxicity and resistance in plants, *Sci. Total Environ.* 400: 356-368.
- Pospišil, P., Tyystjärvi, E. (1999) Molecular mechanism of high temperature-induced inhibition of acceptor side of photosystem II, *Photosynth. Res.* 62: 55-66.
- Pospišil, 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.
- Prasad, M. N., Strzalka, K. (2002) Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 432.
- Putrenko, I. I., Vasil'ev, S., Bruce, D. (1999) Modulation of flash induced photosystem II fluorescence by events occurring at the water oxidizing complex, *Biochemistry* 38: 10632-10641.
- Rafia, A., Sehrish, H. (2008) Photochemistry of light harvesting pigments and some biochemical changes under aluminum stress, *Pak. J. Bot.* 4: 779-784.
- Rai, L. C., Singh, A. K., Mallick, N. (1991) Studies on photosynthesis, the associated electron transport system and some physiological variables of *Chlorella vulgaris* under heavy metal stress, *J. Plant Physiol.* 137: 419-424.
- Rai, L. C., Husaini, Y., Mallick, N. (1996) Physiological and biochemical responses of *Nostoc linckia* to combined effects of aluminum, fluoride and acidification, *Environ. Exp. Bot.* 36: 1-12.
- Rai, L. C., Husaini, Y., Mallick, N. (1998) pH-altered interaction of aluminum and fluoride on nutrient uptake, photosynthesis and other variables of *Chlorella vulgaris*, *Aquat. Toxicol.* 42: 67-84.
- Raines, C. (2003) The Calvin cycle revisited, *Photosynth. Res.* 75: 1-10.
- Ralph, P. J., Burchett, M. D. (1998) Photosynthetic response of *Halophila ovalis* to heavy metal stress, *Environ. Pollut.* 103: 91-101.

- Raven, J. A., Evans, M. C. W., Korb, R. E. (1999) The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂-evolving organisms, *Photosynth. Res.* 60: 111-149.
- Raven, P. H., Evert R. F., Eichhorn, S. E. (2000) Photosynthèse, lumière et vie, In *Biologie végétale*. De Boeck Université, Paris, France, pp. 126-152.
- Raynal, D. J., Joslin, J. D., Thornton, F. C., Schaedle, M., Henderson, G. S. (1990) Sensitivity of tree seedlings to aluminum: III. Red spruce and loblolly pine, *J. Environ. Qual.* 19: 180-187.
- Reich, P. B., Oleksyn, J., Tjoelker, M. G. (1994) Relationship of aluminum and calcium to net CO₂ exchange among diverse scots pine provenances under pollution stress in Poland, *Oecologia* 97: 82-92.
- Reichl, F. X. (2002) *Atlas de poche de médecine de l'environnement*, Maloine, Paris, France, pp. 366.
- Rengel, Z., Zhang, W. H. (2003) Role of dynamics of intracellular calcium in aluminum-toxicity syndrome, *New Phytol.* 159: 295-314.
- Renger, G., Renger, T. (2008) Photosystem II: The machinery of photosynthetic water splitting, *Photosynth. Res.* 98: 53-80.
- Reyes-Diaz, M., Inostroza-Blancheteau, C., Millaleo, R., Cruces, E., Wulff-Zottele, C., Alberdi, M., Mora, M. D. (2010) Long-term aluminum exposure effects on physiological and biochemical features of Highbush Blueberry cultivars, *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 135: 212-222.
- Roose, J. L., Wegenef, K. M., Pakrasi, H. B. (2007) The extrinsic proteins of Photosystem II, *Photosynth. Res.* 92: 369-387.
- Roose, J. L., Yocum, C. F., Popelkova, H. (2010) Function of PsbO, the photosystem II manganese-stabilizing protein: probing the role of aspartic acid 157, *Biochemistry* 49: 6042-6051.
- Roy, A. K., Sharma, A., Talukder, G. (1988) Some aspects of aluminum toxicity in plants, *Bot. Rev.* 54: 145-178.
- Roy, R. L., Campbell, P. G. C., Prémont, S., Labrie, J. (2000) Geochemistry and toxicity of aluminum in the Saguenay river, Québec, Canada, in relation to discharges from aluminum smelter, *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 2457-2466.

- Rutherford, A. W. (1989) Photosystem II, the water-splitting enzyme, *Trends Biochem Sci.* 14: 227-232.
- Ryan, A. C., Tomasso, J. R., Klaine, S. J. (2009) Influence of pH, hardness, dissolved organic carbon concentration, and dissolved organic matter source on the acute toxicity of copper to *Daphnia magna* in soft waters: implications for the biotic ligand model, *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1663-1678.
- Sane, P. V. (2004) Thermoluminescence: A technique for probing photosystem II, in: Carpentier, R., (Ed.), *Photosynthesis Research Protocols*, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, pp. 229-248.
- Santé Canada (1998) Aluminium, in: *Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada, partie II, documentation à l'appui*, Direction de l'hygiène du milieu, Ottawa, Ontario, Canada, <http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/water-eau/aluminum/index-fra.php>
- Sárvári, É., Fodor, F., Cseh, E., Varga, A., Zárny, G., Zolla, L. (1999) Relationship between changes in ion content of leaves and chlorophyll-protein composition in cucumber under Cd and Pb stress, *Z. Naturforsch.* 54c: 746-753.
- Seidler, A. (1996) The extrinsic polypeptides of photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta.* 1277: 35-60.
- Shen, J. R., Henmi, T. Kamiya, N., (2008) Structure and Function of Photosystem II, in: Fromme, P., (Ed.), *Structure of Photosynthetic Proteins*, Wiley, Weinheim, Germany, pp. 83-106.
- Shi, G. Y. (2004) Effect of aluminum on growth and some physiological function of rice seedlings, *Guihaia* 24: 77-80.
- Sigfridsson, K. G. V., Bernat, G., Mamedov, F., Styring, S. (2004) Molecular interference of Cd²⁺ with photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta* 1659: 19-31.
- Silva, S., Pinto, G., Dias, M. C., Correia, C. M., Moutinho-Pereira, J., Pinto-Carnide, O., Santos, C. (2012) Aluminum long-term stress differently affects photosynthesis in rye genotypes, *Plant Physiol. Biochem.* 54: 105-112.
- Sproviero, E. M., Gascon, J. A., McEvoy, J. P., Brudvig, G. W., Batista, V. S. (2008) Quantum mechanics/molecular mechanics study of the catalytic cycle of water splitting in photosystem II, *J. Am. Chem. Soc.* 130: 3428-3442.

- Strasser, R. J., Butler, W. L. (1977) Energy transfer and distribution of excitation energy in the photosynthetic apparatus of spinach chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta* 460: 230-238.
- Summerfield, T. C., Shand, J. A., Bentley, F. K., Eaton-Rye, J. J. (2005) PsbQ (Sl11638) in *Synechocystis* sp. PCC 6803 is required for photosystem II activity in specific mutants and in nutrient-limiting conditions, *Biochemistry* 44: 805-815.
- Suorsa, M., Aro, E. M. (2007) Expression, assembly and auxiliary functions of photosystem II oxygen-evolving proteins in higher plants, *Photosynth. Res.* 93: 89-100.
- Surewicz, W. K., Mantsch, H. H. (1988) New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra, *Biochim. Biophys. Acta* 952: 115-130.
- Szabo, I., Bergantino, E., Giacometti, G. M. (2005) Light and oxygenic photosynthesis: energy dissipation as a protection mechanism against photo-oxidation, *EMBO Rep.* 6: 629-634.
- Thake, B., Herfort, L., Randone, M., Hill, G. (2003) Susceptibility of the invasive seaweed *Caulerpa taxifolia* to ionic aluminum, *Bot. Mar.* 46: 17-23.
- Thornber, J. P., Morishige, D. T., Anandan, S., Peter, G. F. (1991) Chlorophyll-carotenoid proteins of higher plant thylakoïds, in: Scheer, H., (Ed.), *Chlorophylls*, CRC Press, Louisiana, USA, pp. 549-585.
- Thornton, F. C., Schaedle, M., Raynal, D. J. (1987) Effects of aluminum on red spruce seedlings in solution culture, *Environ. Exp. Bot.* 27: 489-498.
- Thornton, L. E., Ohkawa, H., Roose, J. L., Kashino, Y., Keren, N., Pakrasi, H. B. (2004) Homologs of plant PsbP and PsbQ proteins are necessary for regulation of photosystem II activity in cyanobacterium *Synechocystis* 6803, *Plant Cell* 16: 2164-2175.
- Tikkanen, M., Piippo, M., Suorsa, M., Sirpio, S., Mulo, P., Vainonen, J., Vener, A., Allahverdiyeva, Y., Aro, E. M. (2006) State transitions revisited a buffering system for dynamic low light acclimation of *Arabidopsis*, *Plant Mol. Biol.* 62: 779-793.
- Tripathy, B. C., Bhatia, B., Mohanty, P. (1981) Inactivation of chloroplast photosynthetic electron-transport activity by Ni^{2+} , *Biochim. Biophys. Acta* 638: 217-224.

- Tripathy, B. C., Bhatia, B. Mohanty, P. (1983) Cobalt ions inhibits electron-transport activity of photosystem II without affecting Photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta* 722: 88-93.
- Trissel, H. W., Wilhelm, C. (1993) Why do thylakoïd membranes from higher plants from grana stacks?, *Trends Biochem. Sci.* 18: 415-419.
- Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J. R., Kamiya, N. (2011) Crystal structure of oxygen evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å, *Nature* 473: 55-60.
- Van Gorkom, H. J., Yocum, C. F. (2005) The calcium and chloride cofactors, in: Wydrzynski, T. J., Satoh, K., (Eds.), *Photosystem II: The light-driven water: plastoquinone oxidoreductase*, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 307-328.
- Vass, I., Govindjee (1996) Thennoluminescence from the photosynthetic apparatus, *Photosynth. Res.* 48: 117-126.
- Vrettos, J. S., Brudvig, G. W. (2002) Water oxidation chemistry of photosystem II, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 357: 1395-1405.
- Walker, C. H., Hopkin, S. P., Sibly, R. M., Peakall, D. B. (1996) *Principles of ecotoxicology*, Taylor and Francis Inc., Bristol, USA, pp. 321.
- Wang, J. P., Harsh, R., Guo-Ping, Z., Neville, M., Zhou, M. X. (2006) Aluminium tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.): physiological mechanisms, genetics and screening methods. *J Zhejiang Univ. Sci. B.* 7: 769-787.
- White, C., Chain, C. R. K., Malkin, R. (1978) Duroquinol as an electron donor for chloroplast electron transfer reaction, *Biochim. Biophys. Acta* 502: 127-137.
- Whitmarsh, J., Govindjee (1999) The photosynthetic process, in: Singhal, G. S., Renger, G., Sopory, S. K., Irragang K. D., Govindjee, (Eds.), *Concept in Photobiology: Photosynthesis and Photomorphogenesis*, Narosa Publishing House, New Delhi, India, pp. 11-51.
- Wientjes, E., Croce, R. (2011) The light-harvesting complexes of higher plant Photosystem I: Lhca1/4 and Lhca2/3 form two red-emitting heterodimers, *Biochem. J.*, 433: 447-485.
- Wilbert, V., Govindjee (2000) The Z-Scheme Diagram of Photosynthesis, <http://www.life.illinois.edu/govindjee/ZSchemeG.html>

- Witters, H. E., Van Puymbroeck, S., Stouthart, A. J. H. X., Bonga, S. E. W. (1996) Physicochemical changes of aluminum in mixing zones: mortality and physiological disturbances in brown trout (*Salmo trutta* L.), Environ. Toxicol. Chem. 15: 986-996.
- Wodala, B., Eitel, G., Gyula, T. N., Ördög, A., Horváth, F. (2012) Monitoring moderate Cu and Cd toxicity by chlorophyll fluorescence and P700 absorbance in pea leaves, Photosynthetica 50: 380-386.
- Wollman, F. (2001) State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus, EMBO J., 20, 3623-3630.
- Wong, D., Govindjee (1976) Effects of lead ions on photosystem I in isolated chloroplasts: studies on the reaction center P700, Photosynthetica 10: 241-254.
- Worms, I., Simon, D. F., Hassler, C. S., Wilkinson, K. J. (2006) Bioavailability of trace metals to aquatic microorganisms: importance of chemical, biological and physical processes on biouptake, Biochimie 88: 1721-1731.
- Wyman, A. J., Yocum, C. F. (2005) Structure and activity of the photosystem II manganese-stabilizing protein: role of the conserved disulfide bond, Photosynth. Res. 85: 359-372.
- Xiao, X. X., (2002) The physiological and biochemical response of Longan (*Dimocarpus Longana* Lour.) to aluminum stress and rectification of aluminum toxicity, Fujian J. Agr. Sci. 17: 182-185.
- Xiao, X. X., Chen, L. S., Cai, Y. H., Huang, Y., Xie, Y. Q. (2005) The effect of aluminum stress on the absorption of nutrient elements in longan seedling, Acta Agric. Univ. Jiangxiensis (in Chinese) 27: 230-233.
- Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Devi, S. R., Rikiishi, S., Matsumoto, H. (2002) Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells, Plant Physiol. 128: 63-72.
- Yamane, Y., Kashino, Y., Koike, H., Satoh, K. (1997) Increases in the fluorescence F_0 level and reversible inhibition of Photosystem II reaction center by high-temperature treatments in higher plants, Photosynth. Res. 52: 57-64.
- Yi, X., McChargue, M., Laborde, S., Frankel, L. K., Bricker, T. M. (2005) The manganese stabilizing protein is required for photosystem II assembly/stability and photoautotrophy in higher plants, J. Biol. Chem. 280: 16170-16174.

- Ying, X. F, Liu, P. (2005). Effects of aluminum stress on photosynthetic characters of soybean, *Chin. J. Appl. Ecol.* 16: 166-170.
- Zaghdoudi, M., Msilini, N., Govindachary, S., Lachaâl, M., Ouerghi Z., Carpentier, R. (2011) Inhibition of photosystems I and II activities in salt stress-exposed Fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.), *J. Photochem. Photobiol. B* 105: 14-20.
- Zarco-Tejada, P. J., Miller, J. R., Mohammed, G. H., Noland, T. L., Sampson, P. H. (2002) Vegetation stress detection through chlorophyll a+b estimation and fluorescence effects on hyperspectral imagery, *J. Environ. Qual.* 31: 1433-1441.
- Zhang, X. B., Liu, P., Yang, Y. S., Xu, G. D. (2007) Effect of Al in soil on photosynthesis and related morphological and physiological characteristics of two soybean genotypes, *Bot. Stud.* 48: 435-444.
- Zheleva, D., Sharma, J., Panico, M., Morris, H. R., Barber, J. (1998) Isolation and characterization of monomeric and dimeric CP47 reaction center photosystem II complexes, *J. Biol. Chem.* 273: 16122-16127.
- Zhou, W., Juneau, P., Qiu, B. (2006) Growth and photosynthetic responses of the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to elevated levels of cadmium, *Chemosphere* 65: 1738-1746.
- Zhu, X. G., Govindjee, Baker, N. R., DeSturler, E., Ort, D. R., Long, S. P. (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 Å resolution, *Nature* 409: 739-743.