TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS ..... **iv**

AVANT-PROPOS ..... **v**

RÉSUMÉ ..... **vi**

LISTE DES FIGURES ..... **xiii**

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES ..... **xvi**

CHAPITRE I
INTRODUCTON GÉNÉRALE **1**

1.1 Généralité sur la photostabilité de l'appareil photosynthétique 1

1.2 L'appareil photosynthétique 3

1.2.1 Les chloroplastes 3

1.2.2 Structure de la membrane des thylacoïdes 4

1.3 Le photosystème I 6

1.3.1 Structure du photosystème I 6

1.3.1.1 Le complexe protéique du PSI 6

1.3.1.2 Les antennes du photosystème I 6

1.3.2 Biogenèse du photosystème I 8

1.3.3 Fonction des sous-unités du photosystème I 10

1.4 Le photosystème II 11

1.5 Le cytochrome b_6f 13

1.6 La plastocyanine 14

1.7 Fonctionnement de la membrane des thylacoïdes 15

1.7.1 Absorption de l'énergie lumineuse 15

1.7.2 Séparation de charge et transport des électrons 16

1.7.3 Production du pouvoir réducteur et bilan de la photosynthèse 19

1.7.4 Transport cyclique des électrons 20

1.7.5 Voies de dissipation de l'énergie lumineuse 21

1.7.6 Perturbation de la dissipation de l'énergie lumineuse 22

1.8 La photoinhibition du photosystème I 23
1.8.1 Conditions de la photoinhibition 23
1.8.2 Origine de la photoinhibition 23
1.8.3 Sites et mécanisme de la photoinhibition du photosystème I 25
1.8.3.1 Sites de l'inhibition du photosystème I 25
1.8.3.2 Mécanisme de dégradation de la protéine PsaB 25
1.8.4 Recouvrement de la photoinhibition 26
1.9 La photoprotection du photosystème I 27
1.9.1 Mécanismes préventifs 27
1.9.2 Mécanismes de régulation 28
1.9.2.1 Dissipation de l'excès d'énergie 28
1.9.2.2 Inhibition du photosystème II 29
1.9.2.3 Transport cyclique des électrons 30
1.9.3 Mécanisme antioxydant 30
1.9.4 Rôles des protecteurs osmotiques 32
1.10 Les polyamines biogéniques 32
1.10.1 Métabolisme des polyamines 33
1.10.1.1 Biosynthèse 33
1.10.1.2 Conjugaison 34
1.10.1.3 Catabolisme 35
1.10.1.4 Régulation du métabolisme des polyamines 36
1.10.2 Polyamines et stress environnementaux 36
1.10.2.1 Application exogène 37
1.10.2.2 Stimulation de l'expression des gènes 37
1.10.3 Polyamines et aspects de la réponse aux stress 38
1.10.3.1 Protection de la croissance et de la photosynthèse 38
1.10.3.2 Rôle antioxydant 39
1.10.3.3 Stabilisation des membranes 40
1.10.4 Interaction des polyamines avec les protéines photosynthétiques 41
1.10.4.1 Site d'interaction 41
1.10.4.2 Mode d'interaction 42

1.11 Problématique 42
1.12 Hypothèse 43
1.13 Objectifs spécifiques 43
1.14 Plan de travail 44
1.15 Références 44

CHAPITRE II
PROTECTIVE ACTION OF SPERMINE AND SPERMIDINE AGAINST PHOTOINHIBITION OF PHOTOSYSTEM I IN ISOLATED THYLAKOID MEMBRANES 56

2.1 Résumé 56
2.2 Premier article scientifique 57
Abstract 57
Introduction 58
Materials and methods 60
Thylakoid membranes isolation 60
Photoinhibitory treatment and polyamines addition 61
Oxygen uptake rates 61
Oxygen evolvement rates 62
P700 photooxidation 62
Superoxide anions generation 63
Results 63
Protective effect of polyamines on photo-damage of photosystem I 63
Effect of Spm and Spd on oxygen uptake rates 63
Action of Spm and Spd on P700 photooxidation 65
Inhibition of O_2^- generation by Spm and Spd 66
Correlation between PSI photo-protection, PSII inhibition and O_2^- generation by Spm and Spd 67
Discussion 69
Conclusion 72
References 73
Figure legends 79
Supporting information legend 82

CHAPITRE III
EFFECT OF BIOGENIC POLYAMINE SPERMINE ON THE STRUCTURE AND FUNCTION OF PHOTOSYSTEM I 90

3.1 Résumé 90

3.2 Deuxième article scientifque 92

Abstract 93

Introduction 93

Materials and methods 95

Isolation of PSI sub-membrane fractions 95

Spermine application and photoinhibitory treatment 96

O_2 uptake rates measurement 96

Measurement of P700 photooxidation 96

Analysis of protein conformation 97

Molecular modeling 97

Results 98

Effect of Spm on the absorbance changes at 820 nm in PSI sub-membrane fractions 98

Effect of Spm on O_2 uptake rates in photoinhibited PSI sub-membrane fractions 99

Effect of Spm on absorbance changes at 820 nm in photoinhibited PSI sub-membrane fractions 99

FTIR spectra of Spm-PSI sub-membrane fractions complexes 100

Docking studies 101

Discussion 102

Conclusion 103

References 104

Figure legends 110

CHAPITRE IV
CONCLUSION ET PERSPECTIVES 118

4.1 Conclusion générale 118

4.1.1 Investigation de l'action protectrice de la Spm sur le PSI sous conditions de photoinhibition 119

4.1.1.1 Investigation de l'action protectrice de la Spm et de la Spd 119

4.1.1.2 Caractérisation des mécanismes d'action de la Spm et de la Spd dans la photoprotection du PSI 123

4.1.1.3 Importance du nombre de charges positives dans la photoprotection du PSI 124

4.1.2 Action protectrice de la Spm sur des membranes enrichies en PSI 126

4.1.3 Détermination du site d'action de la Spm dans le complexe PSI 128

4.2 Synthèse sur le phénomène de la photoprotection du PSI par la Spm 131

4.3 Contributions à l'avancement des connaissances 133

4.4 Perspectives 134

4.4.1 Détermination du mode d'action antioxydant de la Spm 134

4.4.2 Influence de la température sur l'efficacité du rôle protecteur de la Spm 135

4.4.3 Utiliser la Spm comme supplément pour améliorer la croissance des plantes en condition de photoinhibition 135

4.5 Références 135

ANNEXE A
MATÉRIELS ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES 138

A.1 Extraction du matériel végétal 138

A.2 Traitement de photoinhibition 139

A.3 Structure des polyamines 140

A.4 Mesure de la consommation d'oxygène 140

A.5 Localisation des sites de fixation des donneurs et accepteur artificiels d'électrons 141

A.6 Photooxydation de P700 142

A.7 Estimation du stress oxydatif 144

A.8 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier 145

A.9 Références bibliographiques 146

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Schéma d'un chloroplaste où se déroule la photosynthèse chez les plantes..	1
1.2	Schéma d'un chloroplaste	3
1.3	Structure et composition d'un chloroplaste	4
1.4	Schéma de l'architecture des constituants de la membrane des thylacoïdes.	5
1.5	Structure cristalline et représentation schématique du photosystème I et de ses principaux cofacteurs	7
1.6	Modèle de biogenèse du PSI et les étapes d'assemblage de ses sous-unités grâce aux protéines auxiliaires	9
1.7	Structure cristalline et représentation schématique du photosystème II et de ses principaux cofacteurs	12
1.8	Structure cristalline d'un dimère symétrique de cytochrome b_6f.....	13
1.9	Le cycle Q d'oxydoréduction de la plastoquinone dans le complexe du cytochrome b_6f.....	14
1.10	Structure de la plastocyanine	15
1.11	Schéma des spectres d'absorption de pigments photosynthétiques.....	16
1.12	Absorption et transfert de l'excitation lumineuse par les chlorophylles au niveau des antennes d'un photosystème	17
1.13	Digramme du schéma Z du transport des électrons dans la membrane des thylacoïdes	18
1.14	Schéma du transport linéaire des électrons dans les membranes des thylacoïdes et production du pouvoir réducteur (NADPH et ATP).....	19
1.15	Schéma du transport cyclique des électrons autour du photosystème I.....	20
1.16	Voies de dissipation de l'énergie d'excitation au niveau d'une molécule de chlorophylle.....	22
1.17	Génération des espèces oxygénées réactives au niveau du photosystème I lors de sa photoinhibition.....	24

1.18 Sites de dégradation de la protéine PsaB au niveau du photosystème I par les protéases 26

1.19 Mécanismes de photoprotection préventifs 27

1.20 Voies de dissipation de l'excès d'énergie absorbée 28

1.21 Mécanisme antioxydant enzymatique au niveau des chloroplastes 31

1.22 Structure des polyamines biogéniques 33

1.23 Voies de biosynthèse des polyamines biogéniques chez les plantes 34

1.24 Voies de dégradation des polyamines. Enzymes et produits de dégradation 36

4.1 Accumulation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et du radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$) durant la photoinhibition des membranes des thylacoïdes, mesuré par fluorescence du dichlorofluoréscine 120

4.2 Comparaison de l'effet protecteur de la spermine (Spm), la spermidine (Spd) et de la putrescine (Put) 122

4.3 Meilleure conformation pour la complexation de la spermine avec la structure cristalline du photosystème I, réalisée par modélisation moléculaire 130

4.4 Schéma du modèle proposé pour l'action de la spermine au niveau du complexe du photosystème I 131

4.5 Schéma récapitulatif expliquant la position du photosystème I par rapport au site d'accumulation de la spermine dans le chloroplaste 133

A.1 Représentation schématique des étapes d'extraction de matériels photosynthétiques 138

A.2 Représentation schématique du dispositif utilisé pour la photoinhibition 139

A.3 Structure des polyamines biogéniques et artificielles 140

A.4 (a) Image de l'électrode à oxygène, type Clark et (b) représentation schématique de ses composantes 141

A.5 Chaîne des transporteurs d'électrons dans les membranes des thylacoïdes et sites de fixation de l'inhibiteur du PSII, des donneurs et accepteur artificiels d'électrons 142

Rapport-Gratuit.com

A.6 (a) Image du fluorimètre PAM 101, (b) représentation schématique de l'excitation du P700 et du transfert d'électrons dans le PSI, et (c) le spectre typique de la photooxydation du P700 143

A.7 Structure chimique du nitro-bleu de tétrazolium et du formazane 144

A.8 (a) Structure chimique du DCFH et du DCF et (b) augmentation de la fluorescence du DCF après excitation à 490 nm 145

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

[4Fe-4S]	Centre fer soufre
^{1}Chl, ^{3}Chl et Chl*	Chlorophylle à l'état singulet, triplet et excité
$^1O_2^*$	Oxygène singulet
A0	Chlorophylle 0, accepteur primaire d'électron du PSI
A1	Phylloquinone 1, accepteur secondaire d'électron du PSI
ADC	Arginine décarboxylase
APX	Ascorbate peroxydase
ATP	Adénosine triphosphate
ATPase	ATP synthase
CA	Coté accepteur
CAT	Catalase
CD	Coté donneur
CDO	Complexe de dégagement d'oxygène
Chl	Chlorophylle
Cyt b_6	Cytochrome b_6
Cyt b_6f	Cytochrome b_6f
Cyt f	Cytochrome f
DAO	Diamine oxydase
DCFH	Dichlorofluoréscine
DCMU	3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea
DCPIPH_2	2,6-dichlorophenol indophenol
DNP-INT	2′iodo-6-isopropyl-3-methyl-2′,4,4′-trinitrodiphenylether

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

F_A	Accepteur d'électron final A du PSI
F_B	Accepteur d'électron final B du PSI
Fd	Ferrédoxine
FNR	Ferrédoxine NADP réductase
FTIR	Transformée de Fourier à infrarouge
Fx	Accepteur d'électron x du PSI
GPX	Gaiacol peroxydase
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène
LHCI et LHCII	Complexe collecteur de lumière (Light Harvesting Complexes) du PSI et du PSII
MV	Methyl viologen
$NADP^+$, NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme oxydée, sous forme réduite
NBT	Nitro-bleu de tétrazolium
NPQ	Quenching non photochimique
O_2	Oxygène moléculaire
O_2^-	Ion superoxyde
ODC	Ornithine décarboxylase
OH	Radical hydroxyle
P680	Chlorophylle spéciale du photosystème II
P700	Chlorophylle spéciale du photosystème I
PAO	Polyamine oxydase
PAs	Polyamines
PC	Plastocyanine
Phé	Phéophytine
PQ	Plastoquinone

PQH_2	Plastoquinole
PSI	Photosystème I
PSII	Photosystème II
Put	Putrescine
Q_A	Quinone A, accepteur primaire d'électron du PSII
Q_B	Quinone B, accepteur secondaire d'électron du PSII
ROSs	Espèces oxygénées réactives
SAMDC	S-adénosyl-méthionine décarboxylase
SOD	Superoxyde dismutase
Spd	Spermidine
SPDS	Spermidine synthase
Spm	Spermine
SPMS	Spermine synthase
TCE	Transport cyclique d'électrons
TGase	Transglutaminase
TLE	Tansport linéaire d'électrons
TMPD	N,N,N,N'-tetramethylphenylenediamine

CHAPITRE I

INTRODUCTON GÉNÉRALE

1.1 Généralité sur la photostabilité de l'appareil photosynthétique

Il est bien établi que la productivité végétale (la matière organique sur terre) dépend de l'efficacité de l'utilisation de l'énergie solaire par les organismes photosynthétiques tels que les plantes, les algues vertes et les cyanobactéries. C'est l'appareil photosynthétique (chloroplaste) qui assure la conversion de l'énergie lumineuse en énergie biochimique sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) et de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH). Ces deux molécules riches en énergie seront utilisées dans la fixation du CO_2 dans le cycle de Calvin pour produire les sucres (Figure 1.1). L'ensemble de ces réactions constitue le processus de la photosynthèse. Pour assurer un fonctionnement optimal, l'appareil photosynthétique est doté d'une organisation structurale adéquate. Il comporte deux complexes protéiques photo-actifs nommés photosystème I (PSI) et photosystème II (PSII) ainsi que d'autres facteurs intermédiaires, le tout est présent dans une membrane lipidique.

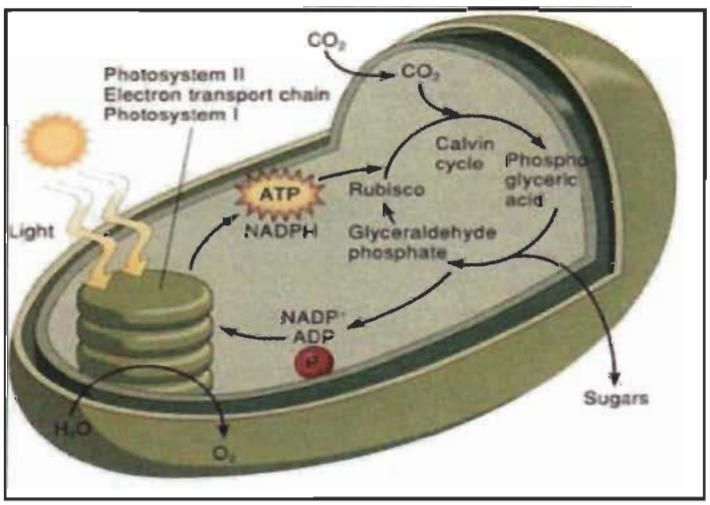


Figure 1.1 Schéma d'un chloroplaste où se déroule la photosynthèse chez les plantes [1].

Cependant, de nombreux facteurs environnementaux peuvent affecter la stabilité et le fonctionnement de la machinerie photosynthétique. Parmi ces facteurs, la lumière qui constitue elle-même le déclencheur de la photosynthèse peut lui être nuisible lorsqu'elle est fournie en excès. En effet, il est actuellement admis que l'exposition de plantes à de longues journées d'ensoleillement, associées ou non à d'autres facteurs climatiques, réduit l'activité photosynthétique et par conséquent la productivité des plantes.

L'inhibition de la photosynthèse dans des conditions pareilles est connue sous le nom de la photoinhibition. La compréhension des processus de photosynthèse, de l'origine et des mécanismes de sa photoinhibition ont été largement étudiés durant les dernières décennies. Cependant, la compréhension des mécanismes de photoprotection qui lui sont associées reste encore ambiguë. Alors que leurs répercussions sur plusieurs domaines, y compris le développement de plantes photorésistantes, sont d'un intérêt économique et écologique majeur. En effet, l'efficacité de la photosynthèse, responsable de la production de biomasse, résulte de l'adaptation de la plante aux variations de son environnement. Cette adaptation lui permet une interception optimale des radiations lumineuses, accompagnée d'une utilisation hautement efficace de leur énergie. D'autre part, l'émergence de nouvelles approches pour la production de bioénergie (énergie propre telle que l'hydrogène) basée sur le matériel photosynthétique (le PSI et le PSII) ne cesse de se développer. Ces techniques récentes peuvent nécessiter elles aussi la stabilité du matériel biologique extrait de son environnement naturel.

Mon sujet de thèse s'inscrit dans le contexte de recherche sur les mécanismes de photoprotection des composantes de la membrane photosynthétique, où les avancées des connaissances sont limitées. Pendant mon doctorat, j'ai étudié l'action protectrice des polyamines biogéniques (spermine, spermidine et putrescine) sur le PSI contre le stress lumineux dans des conditions *in vitro*. Mon travail de thèse a permis d'apporter des connaissances sur les mécanismes impliqués dans la photoprotection par la spermine, ainsi que la détermination de son site d'action et du mode de son interaction avec les protéines du complexe du PSI.

1.2 L'appareil photosynthétique

1.2.1 Les chloroplastes

Les chloroplastes des plantes supérieures sont des organites de diamètre ≈ 5 µm, chaque chloroplaste est défini par deux membranes qui renferment une matrice aqueuse appelée stroma et des membranes photosynthétiques appelées thylacoïdes (Figure 1.2). Différentes composantes baignent dans le stroma des chloroplastes, tels que les enzymes de fixation du CO_2, et un génome chloroplastique.

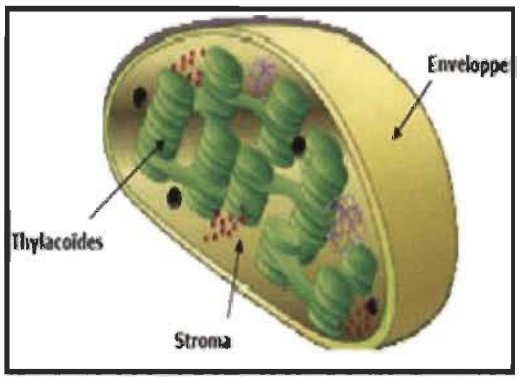


Figure 1.2 Schéma d'un chloroplaste.

Les premières connaissances de l'organisation structurale du chloroplaste ont été basées sur la microscopie électronique (Figure 1.3.a). L'analyse des structures des thylakoïdes révèlent qu'elles sont formées des vésicules aplaties qui s'empilent dans certaines régions du chloroplaste pour former les thylacoïdes granaires ou grana. Ces granas sont reliés les uns aux autres par des vésicules simples qui s'appellent thylacoïdes inter-granaires ou lamelles stromatiques [2]. Il a été rapporté que l'empilement permet la séparation physique des différents constituants de la membrane pour mieux réguler l'absorption de la lumière et assurer l'efficacité de la photosynthèse (Figure 1.3.b).

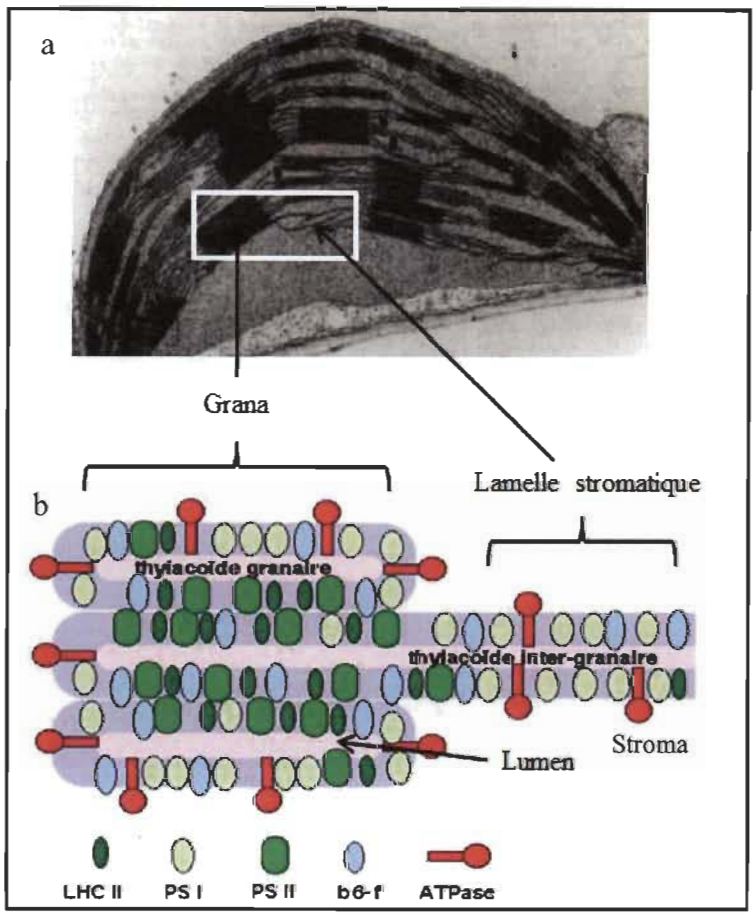


Figure 1.3 **Structure et composition d'un chloroplaste.**
La figure (a) montre la structure électronique d'un chloroplaste formé de granas et de lamelles stromatiques [2]. La figure (b) montre une représentation schématique de l'organisation des membranes de thylacoïdes et la répartition de certains de ses constituants : PSI: photosystème I; PSII : photosystème II; b_6f : cytochrome b_6f; ATPase : ATP synthase et LHCII : antennes collectrices de lumière du PSII [3].

1.2.2 Structure de la membrane des thylacoïdes

L'analyse de la structure des membranes thylacoïdales montre qu'elles sont formées d'une bicouche lipidique parsemée de plusieurs constituants impliqués dans le fonctionnement de l'appareil photosynthétique (Figure 1.4). Parmi ces constituants, on distingue trois complexes pigment-protéines majeurs : le PSI, le PSII et le complexe du cytochrome b_6f (Cyt b_6f), en plus d'un complexe enzymatique : l'ATP synthase (ATPase). La distribution spatiale de tous ces composants dans les différentes structures des thylacoïdes montre que le complexe du PSII est situé en grande partie à l'intérieur

des granas, et les Cyt b_6f sont repartis sur toute la structure des thylacoïdes [4]. Toutefois, le PSI et l'ATPase sont présents dans les thylacoïdes inter-granaires et dans les membranes externes des granas (Figure 1.3.b). L'emplacement des PSI et des ATPase est favorable pour un fonctionnement adéquat de ces deux composantes qui ont besoin d'exposer l'une de leurs extrémités au stroma.

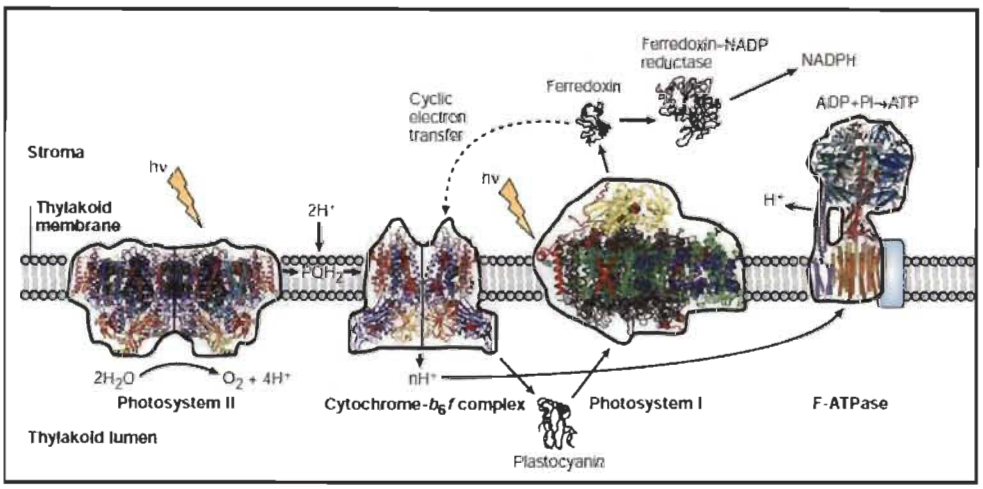


Figure 1.4 **Schéma de l'architecture des constituants de la membrane des thylacoïdes.**
La figure montre la structure du photosystème I, du photosystème II et du cytochrome b_6f qui sont des complexes pigement-protéiques ainsi que les protéines solubles telles que la ferrédoxine; la ferrédoxine NADP réductase et la plastocyanine. La F-ATPase est l'adénosine tri-phosphate synthase, hυ; énergie lumineuse [5].

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Les complexes de PSI et de PSII sont formés par un cœur multi-protéique, appelé le centre réactionnel, dans lequel se déroulent les réactions photochimiques. Les protéines des cœurs sont entourées par des antennes collectrices de lumière « light harvesting complexes : LHC » appelées LHCI et LHCII respectivement pour le PSI et le PSII. La membrane des thylacoïdes renferme aussi deux transporteurs mobiles qui sont la plastoquinone (PQ) et la plastocyanine (PC), qui assurent le transfert des électrons, en synergie avec le complexe Cyt b_6f, entre les deux photosystèmes. Alors que la ferrédoxine (Fd) et la ferrédoxine NADP réductase assurent le transfert d'électrons du PSI vers le $NADP^+$ dans le stroma [5].

1.3 Le photosystème I

Le PSI est un complexe pigment-protéique d'une masse moléculaire de 525 kDa qui assure une étape essentielle de la photosynthèse. Le PSI est capable de convertir l'énergie lumineuse en transport d'électrons pour réduire le $NADP^+$. La plus récente structure cristalline du PSI des plantes réalisée à une résolution de 3.3 Å est présentée dans la figure 1.5.a [5]. Le PSI chez les eucaryotes, est formé de deux unités fonctionnelles majeures; le complexe protéique du cœur du PSI et les antennes collectrices de lumière.

1.3.1 Structure du photosystème I

1.3.1.1 Le complexe protéique du PSI

L'analyse de la composition du complexe PSI, chez les plantes, montre qu'il comporte 18 sous-unités protéiques, 191 cofacteurs photochimiques, 173 chlorophylles (Chls), 15 β-carotènes, 3 centres [4Fe-4S] et 2 phylloquinones [6]. Le cœur du PSI comporte 12 sous-unités protéiques (PsaA, PsaB, PsaC, PsaD, PsaE, PsaF, PsaG, PsaH, PsaI, PsaJ, PsaK, and PsaL) fixant les cofacteurs de transport d'électrons. Ces cofacteurs sont la Chl spéciale du centre réactionnel : P700, deux accepteurs d'électrons primaire et secondaire : Chl A_0 et phylloquinone A_1 respectivement, et les accepteurs d'électrons finaux Fx, F_A et F_B porteurs des centres fer-soufre [4Fe-4S] (Figure 1.5.b) [7].

1.3.1.2 Les antennes du photosystème I

Les antennes collectrices de lumière du PSI sont constituées essentiellement des antennes périphériques LHCIs. Les LHCIs sont formées de protéines transmembranaires qui fixent les pigments photocollecteurs : Chls et caroténoïdes [8]. Les LHCIs sont composés de 4 sous-unités nommées Lhca1-4 et assemblées en croissant lunaire qui entoure le cœur du PSI. Elles sont les seules antennes qui existent sous forme dimérique et sont groupées en deux hétérodimères : Lhca1- Lhca4 et Lhca2-Lhca3. La composition de ces antennes montre que Lhca1 et Lhca4 fixent chacune 15 Chls, alors que Lhca2 fixe

Rapport-Gratuit.com

14 Chls, et Lhca3 fixe 17 Chls [6]. Aussi, elles peuvent absorber fortement dans le rouge grâce à certaines de leurs Chls qui captent les photons à des longueurs d'onde de 690 nm. Le système antennaire LHCI est attaché et stabilisé sur le cœur du PSI grâce aux sous-unités protéiques PsaB, PsaF, PsaG et PsaJ. Toutefois, les surfaces de contact entre les LHCIs et ces protéines sont petites, ce qui rend l'interaction des antennes avec le cœur du PSI faible et sensible aux variations de leur environnement.

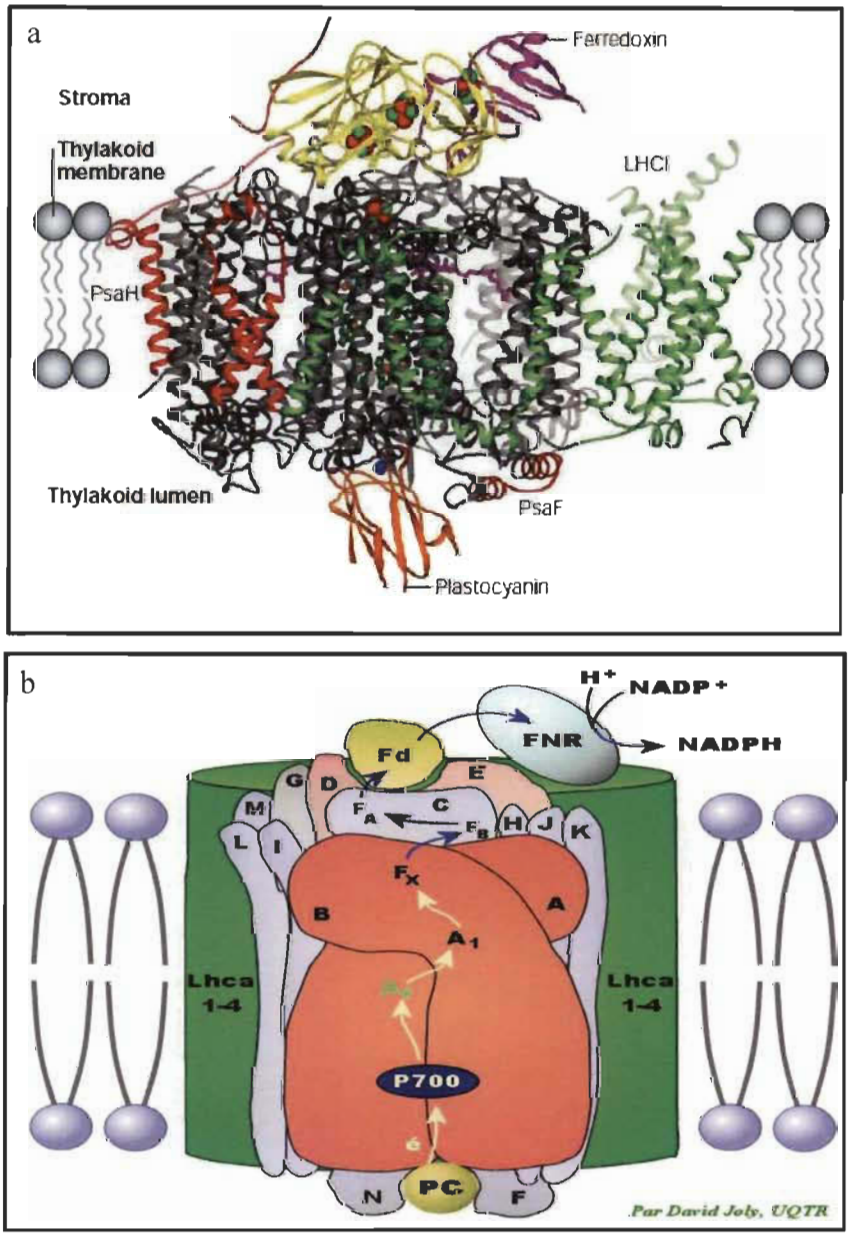


Figure 1.5 Structure cristalline et représentation schématique du photosystème I et de ses principaux cofacteurs.

La figure (a) montre la structure cristalline d'un photosystème I (PSI) de plante réalisée à une résolution de 3.3 Å. Le complexe protéique du cœur du PSI (gris) en interaction avec les antennes LHCI (vert), les protéines stromatiques (jaune), la ferrédoxine (violet) et la plastocyanine (orange) [5]. La figure (b) montre la composition protéique du PSI (PsaA-N) entouré des antennes Lhca1-4 et le transport d'électrons (é) à travers les cofacteurs d'oxydoréduction (P700, A_0, A_1, F_X, F_A, F_B). PC : plastocyanine, Fd: ferrédoxine et FNR: ferrédoxine NADP réductase [7].

Le cœur du PSI fixe, aussi, des Chls et β-carotènes directement sur les protéines du cœur PsaA et PsaB. Ces pigments sont étroitement liés au centre réactionnel et permettent le transfert de l'excitation au P700 [9]. À la différence des plantes, les antennes photocollectrices des cyanobactéries incluent des phycobiliprotéines [10].

1.3.2 Biogenèse du photosystème I

L'étude des étapes de biogenèse du complexe PSI chez les plantes montre que ses constituants protéiques sont codés aussi bien dans le génome nucléaire que dans le génome chloroplastique [9]. La biogenèse de PSI implique de nombreuses protéines auxiliaires et cofacteurs d'attache indépendants des constituants du complexe PSI. Ces éléments sont impliqués dans la synthèse de certaines sous-unités du PSI et dans la liaison des uns aux autres pour former une structure fonctionnelle dite super-complexe PSI-LHCI mature. Toutefois, ces cofacteurs indispensables à la biogenèse du PSI ne font pas partie de sa structure finale [11].

La première étape de biosynthèse du super-complexe PSI consiste à synthétiser et lier les protéines du centre réactionnel PsaA et PsaB pour former un dimère PsaA-B. La deuxième étape consiste à synthétiser les cofacteurs impliqués dans les réactions d'oxydoréduction (P700, A0 et A1) et de les assembler sur les protéines du centre réactionnel grâce au cofacteur d'attache Alb3. Ces deux étapes aboutissent à la formation de l'hétérodimère PsaA-B d'une masse moléculaire de 165 kDa (Figure 1.6.a) qui constitue le cœur du PSI [12]. Dans les étapes suivantes, de nouveaux cofacteurs de synthèse et d'attache assurent la fixation de nouvelles petites sous-unités sur l'hétérodimère PsaA-B. Les cofacteurs d'assemblement Hcf101, Apo1 et RubA assurent

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

l'insertion des transporteurs d'électrons Fx sur l'hétérodimère PsaA-B, et la F_A et F_B sur la protéine PsaC [13,14].

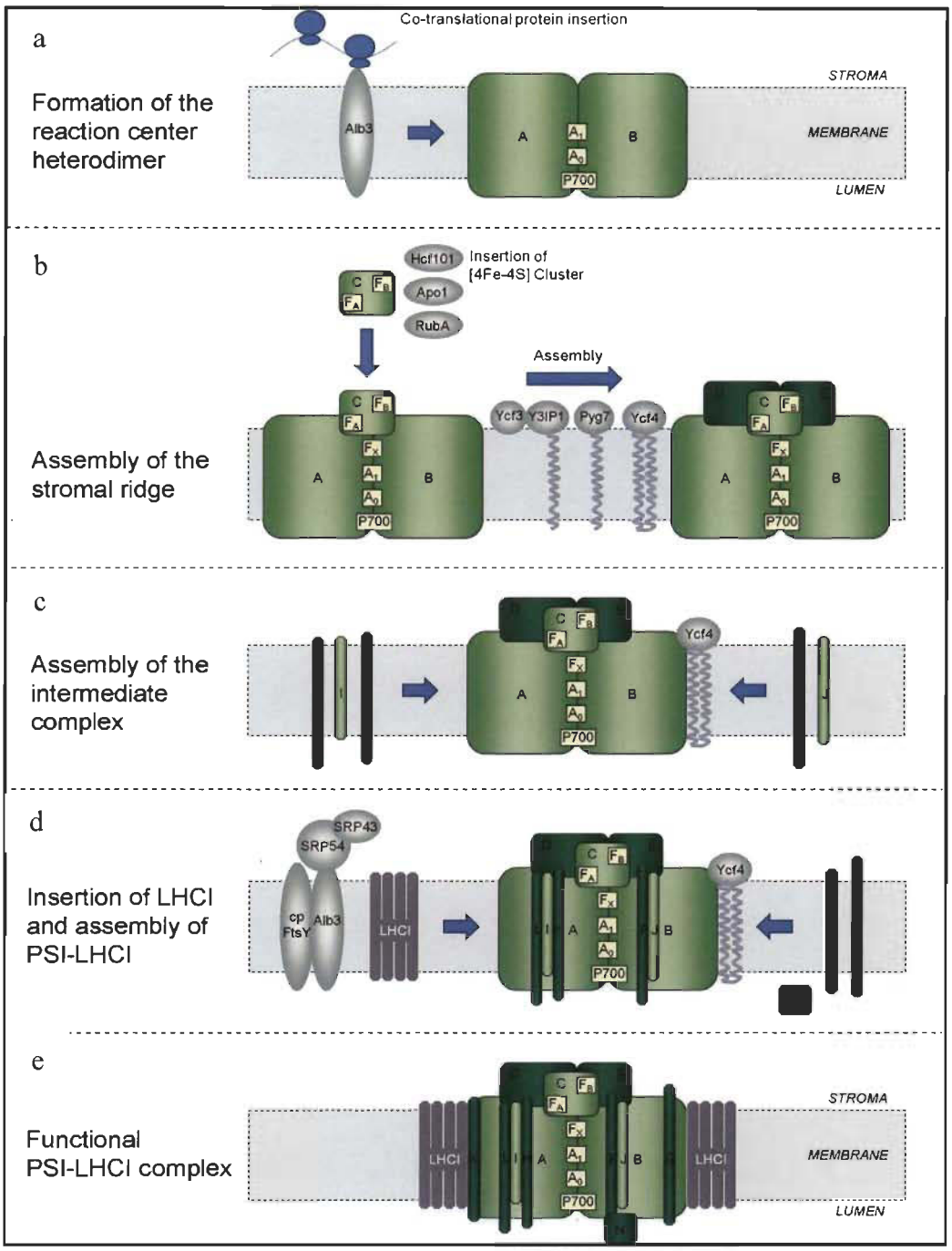


Figure 1.6 Modèle de biogenèse du PSI et les étapes d'assemblage de ses sous-unités grâce aux protéines auxiliaires.
Les sous-unités chloroplastiques de PSI sont présentées en vert clair (PsaA, B, C, I et J), les sous-unités nucléaires en vert foncé (PsaD, E, F, G, H, K, L et N) et les sous-unités LHCI (codées aussi par des gènes

nucléaires) en gris foncé. Les cofacteurs du PSI actif dans l'oxydoréduction (P700, A_0, A_1, Fx, F_A, F_B) sont indiqués par des cases jaunes et les facteurs d'assemblage sont représentés en gris clair (Alb3, Hcf101, Ycf4 ect.) [11].

L'insertion de ces transporteurs d'électrons est indispensable pour la fixation de la sous-unité PsaC sur l'hétérodimère [15,16]. Ensuite, l'assemblage des sous-unités PsaD et PsaE (Figure 1.6.b) stabilise la protéine PsaC et complète la formation des protéines stromatiques du PSI [17,18]. Le cofacteur d'attache Ycf4 assure la fixation des sous-unités intermédiaires comme PsaF, PsaJ, PsaI, PsaH et PsaL de part et d'autre de l'hétérodimère PsaA-B (Figure 1.6.c) pour compléter la synthèse du complexe protéique du PSI. Les constituants de ce complexe sont étroitement tenus ensemble et connectés via une vaste série de contacts inter-faciaux. La dernière étape de la biogenèse du super-complexe PSI consiste à insérer les antennes LHCI et à assembler les sous-unités PsaG et PsaN (Figure 1.6.d) pour aboutir au PSI-LHCI mature (Figure 1.6.e) [11].

Les informations rapportées dans la littérature révèlent la complexité des étapes de biosynthèse du PSI. Cette complexité découle de la nécessité de coordination entre les génomes nucléaire et chloroplastique dans la production des constituants du PSI. En effet, le génome nucléaire synthétise les sous-unités PsaD, PsaE, PsaF, PsaH, PsaL, PsaN et LHCI, alors que le génome chloroplastique synthétise les sous-unités PsaA, PsaB, PsaC, PsaI et PsaJ. La coordination entre les deux génomes est rendue difficile par l'existence de plusieurs chloroplastes dans une même cellule, ce qui constitue une étape limitante pour la biogenèse du PSI dans certains cas [11].

1.3.3 Fonction des sous-unités du photosystème I

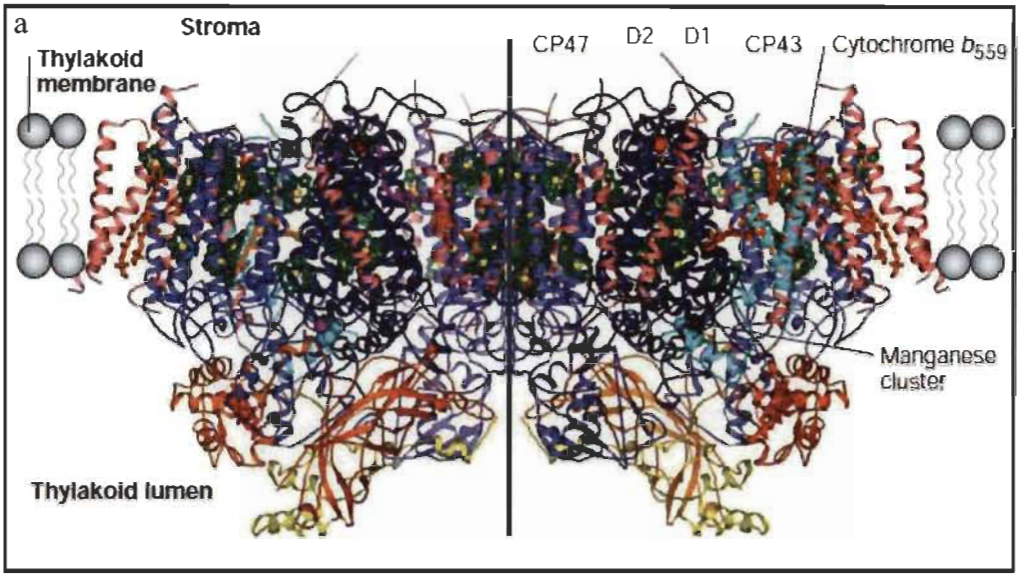
L'utilisation de mutants knock-out a permis de déterminer la fonction spécifique de certaines sous-unités du PSI. Il a été rapporté que les protéines du cœur du PSI, PsaA et PsaB fixent les cofacteurs d'oxydoréduction et assurent la collecte de la lumière grâce aux Chls qu'elles fixent. C'est au niveau de la Chl P700 que portent ces protéines que la séparation de charge se produit alors que les cofacteurs A_0, A_1, Fx, F_A et F_B dirigent les réactions d'oxydoréduction et de transfert d'électrons. En ce qui concerne les protéines

PsaD et PsaE, elles sont impliquées dans la stabilisation de la protéine PsaC, porteuse des accepteurs finaux d'électrons (F_A et F_B), et dans la fixation de la ferrédoxine (Fd). La fonction des antennes périphériques LHCIs est la collecte de la lumière et le transfert de son énergie à la Chl spéciale du PSI : P700. Cependant, la fonction précise des constituants restants n'est pas encore élucidée, mais ils sont considérés comme des fixateurs ou stabilisateurs d'autres sous-unités ou de Chl [9].

1.4 Le photosystème II

Le PSII est un complexe protéique de masse moléculaire de 320 kDa qui fonctionne en synergie avec le PSI. Le PSII fonctionnel existe généralement sous forme dimérique ou trimérique (Figure 1.7.a) [5]. La structure du PSII montre qu'il est formé d'un cœur qui renferme deux protéines principales (D1 et D2) et de nombreux cofacteurs impliqués dans la collecte de la lumière et le transfert des électrons. Parmi ces cofacteurs on cite les Chls, la phéophytine (Phe), les quinones A et B (Q_A et Q_B), les caroténoïdes, la tyrozine Z (Yz) et une paire de Chl spéciale (P680) dans le centre réactionnel du PSII. Le complexe de PSII comporte aussi une composante située du côté luminal de la membrane thylacoïdale qui est le complexe de dégagement d'oxygène (CDO). Le CDO comporte un cluster de quatre atomes de manganèse entourés par des sous-unités de 17, 23 et 33 kDa. Ce complexe joue un rôle central dans le fonctionnement du PSII grâce aux électrons qu'il libère suite à l'oxydation de l'eau.

Le cœur du PSII est entouré par trois couches des complexes pigment-protéine appelées les antennes LHCII [7]. Ces antennes collectrices de lumière sont ornées de Chl et de caroténoïdes et se divisent en trois catégories : (i) les antennes internes formées par les protéines CP43 et CP47, en contact direct avec les protéines du cœur du PSII; (ii) les antennes intermédiaires formées par les Lhcb4-6 et (iii) les antennes périphériques formées de trois sous-unités nommées Lhcb1-3 (Figure 1.7.b). La structure du PSII comporte aussi de nombreuses sous-unités (Cytochrome b559, PsbO, PsbQ, etc.), qui stabilisent le PSII et régulent son fonctionnement.



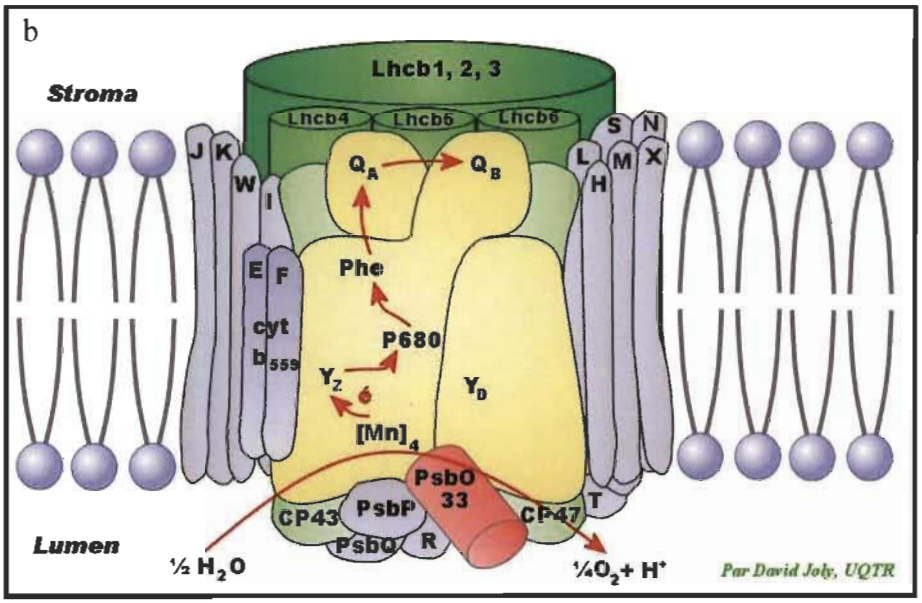


Figure 1.7 Structure cristalline et représentation schématique du photosystème II et de ses principaux cofacteurs.

La figure (a) montre la structure cristalline d'un dimère de photosystème II (PSII) de cyanobactéries réalisée à une résolution de 3 Å avec les positions des polypeptides extrinsèques (dans le lumen thylacoïdal) et les sous-unités intrinsèques D1, D2, CP43 et CP47 [5]. La figure (b) montre la composition protéique du PSII entouré par les antennes Lhcb1-6, CP43 et CP47. Le transport d'électrons (é) à travers les cofacteurs d'oxydoréduction (Yz, P680, Phe, Q_A et Q_B) est représenté par les flèches rouges. Le cluster manganèse (Mn) au niveau du complexe de dégagement d'oxygène hydrolyse l'eau du côté luminal du PSII pour réduire la tyrosine Z (Yz) [7].

1.5 Le cytochrome b_6f

Le complexe du Cyt b_6f est une composante de la membrane thylacoïdale (217 kDa) qui assure le transport d'électrons entre le PSII et le PSI, plus précisément entre la PQ et la molécule de PC. Ce transfert d'électrons à travers le Cyt b_6f amène une translocation de protons du stroma vers le lumen. La structure cristalline à 3 Å, réalisée grâce au complexe isolé d'une cyanobactérie, révèle que le Cyt b_6f est constitué d'un dimère transmembranaire renfermant deux cavités appelées Qo et Qr. Chaque monomère comporte quatre grandes sous-unités, notamment le cytochrome b_6 (Cyt b_6), le cytochrome f (Cyt f), le Rieske [2Fe2S] (ISP) et la sous-unité IV. Mais aussi, quatre autres petites sous-unités hydrophobes dont la masse moléculaire est de 3.3-4.1 kDa, nommées PetG, PetL, PetM et PetN, sont logées dans chaque monomère (Figure 1.8) [19,20].

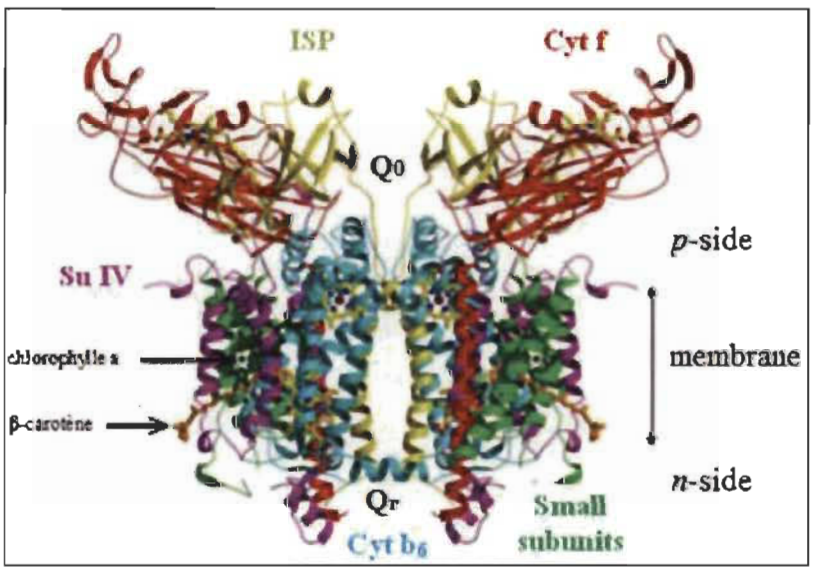


Figure 1.8 **Structure cristalline d'un dimère symétrique de cytochrome b_6f.** La structure du cytochrome b_6f est déterminée sur des cyanobactéries à une résolution de 3 Å. Les grandes sous-unités sont représentées par Cyt f : le cytochrome f (rouge), Cyt b_6 : le cytochrome Cyt b_6 (bleu), ISP : le Rieske [2Fe2S] (vert olive) et SU IV : la sous-unité IV (rose indien). Les petites sous-unités sont représentées par small subunits (vert) [20]. Qo et Qr sont les sites d'oxydation de la plastoquinole et de réduction de la plastoquinone respectivement.

Chez les plantes, le complexe Cyt b_6f présente une structure similaire à celle des cyanobactéries, avec une sous-unité additionnelle qui est la ferrédoxine NADP réductase (FNR) [21]. Il renferme aussi une Chl a et un β-carotène inactifs [22]. En ce qui concerne le fonctionnement du complexe Cyt b_6f, la cavité Qo du côté du lumen (chimiquement électropositive : *p*) sert pour l'oxydation du PQH_2. En effet, l'oxydation du PQH_2, permet de libérer deux électrons : un électron sera dirigé vers le Rieske [2Fe2S] puis au Cyt f pour réduire la PC et finalement le PSI. Tandis que l'autre électron sera dirigé vers le site Qr du côté du stroma (chimiquement électronégative : *n*) via le Cyt b_6 pour la réduction PQ [23]. Le mouvement des quinones entre les deux sites (Q_0 et Q_r) au niveau du Cyt b_6f constitue ce qu'on appelle le cycle Q (Figure 1.9). Ce cycle implique, en plus des protéines du complexe Cyt b_6f, des hèmes (b*n*, b*p* et c*n*) qui interviennent probablement dans le transfert cyclique des électrons [22].

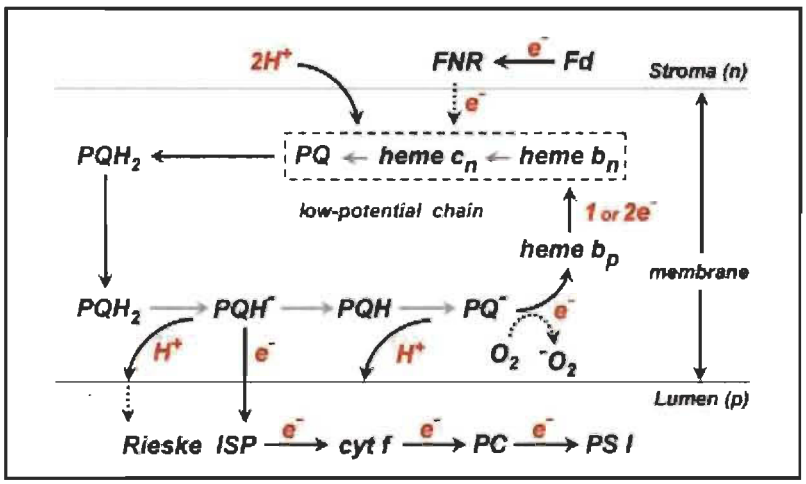


Figure 1.9 Le cycle Q d'oxydoréduction de la plastoquinone dans le complexe du cytochrome b_6f [22].

1.6 La plastocyanine

La PC est une protéine de masse moléculaire de 10 kDa portant dans son centre un atome de cuivre comme il est révélé par la structure présentée dans la figure 1.10. L'atome de cuivre est entouré par quatre acides aminés : deux histidines, une méthionine et une cystéine [24]. La PC est située dans le lumen des thylacoïdes où elle fonctionne comme un transporteur d'électrons mobile entre le Cyt f, au niveau du complexe b_6f, et

le P700 dans le complexe du PSI [25]. La PC dispose de deux sites de fixation qui lui permettent d'assurer la connexion avec le Cyt b_6f et le PSI. Le site 1 est formé de résidus à caractère hydrophobe qui permettent l'interaction de la PC au P700. Cette interaction est favorisée par les sous-unités PsaF et PsaN du PSI. Alors que le site 2 est formé de résidus chargés négatifs facilitant l'interaction électrostatique avec les résidus chargés positifs du Cyt f.

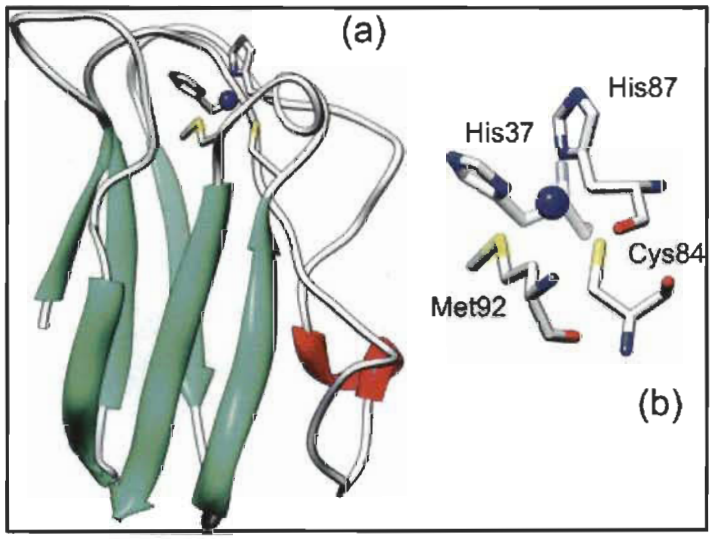


Figure 1.10 Structure de la plastocyanine.
(a) Structure cristalline de la plastocyanine et (b) les acides aminés qui entourent l'atome de cuivre représenté par la sphère bleue [24].

Dans ce dernier cas, l'interaction se déroule en deux étapes successives : la première réside dans le rapprochement de la PC du Cyt f grâce à l'effet de charge, alors que la deuxième consiste au docking pour la formation du complexe de transfert d'électrons [26].

1.7 Fonctionnement de la membrane des thylacoïdes

1.7.1 Absorption de l'énergie lumineuse

Trois pigments photosynthétiques essentiels absorbent la lumière au niveau des antennes des PSI et PSII dans la membrane thylacoïdale des plantes supérieures. Ces pigments sont la Chl *a*, la Chl *b* et les caroténoïdes. La Chl constitue le principal

pigment photosynthétique présent presque chez tous les organismes photosynthétiques. Ces pigments absorbent certaines radiations, dans la gamme de longueurs d'onde visibles comprises entre 400 et 700 nm, dites actives pour la photosynthèse (Figure 1.11). L'énergie lumineuse captée est ensuite transformée en énergie chimique nécessaire pour initier le transport des électrons au sein des deux photosystèmes.

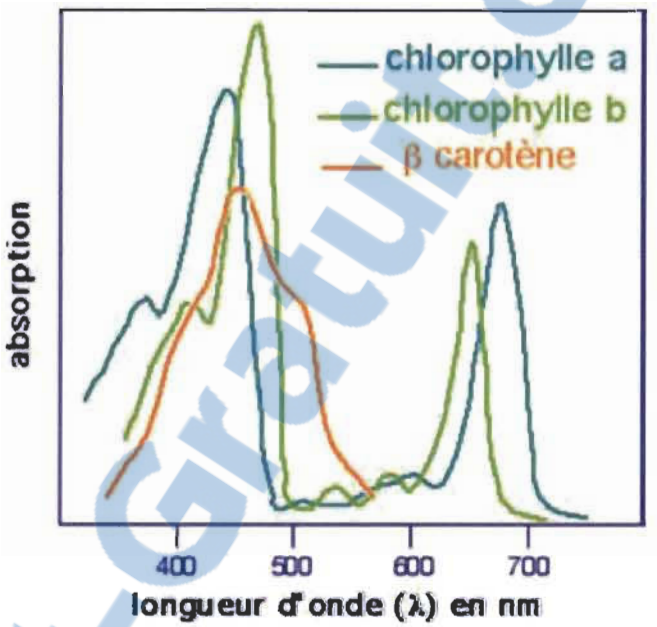


Figure 1.11 Schéma des spectres d'absorption de pigments photosynthétiques.

Les caroténoïdes associés aux photosystèmes sont nombreux, dont on cite le β-carotène, les lutéines, les neoxanthines, les violaxanthines et les zeaxanthines [8]. Ils sont impliqués dans l'absorption et la régulation du transfert de l'énergie des antennes aux cœurs des photosystèmes.

1.7.2 Séparation de charge et transport des électrons

Lorsque les photosystèmes sont exposés à la lumière, les Chls des antennes LHCs captent des photons et passent de leur état fondamental à l'état excité (Chl*). L'énergie d'excitation est transférée d'une molécule pigmentaire à l'autre par phénomène de résonance jusqu'à atteindre les Chls spéciales, P700 dans le PSI et le P680 dans le PSII qui passent à l'état excité P700* et P680*, respectivement (Figure 1.12.a et b).

Rapport-Gratuit.com

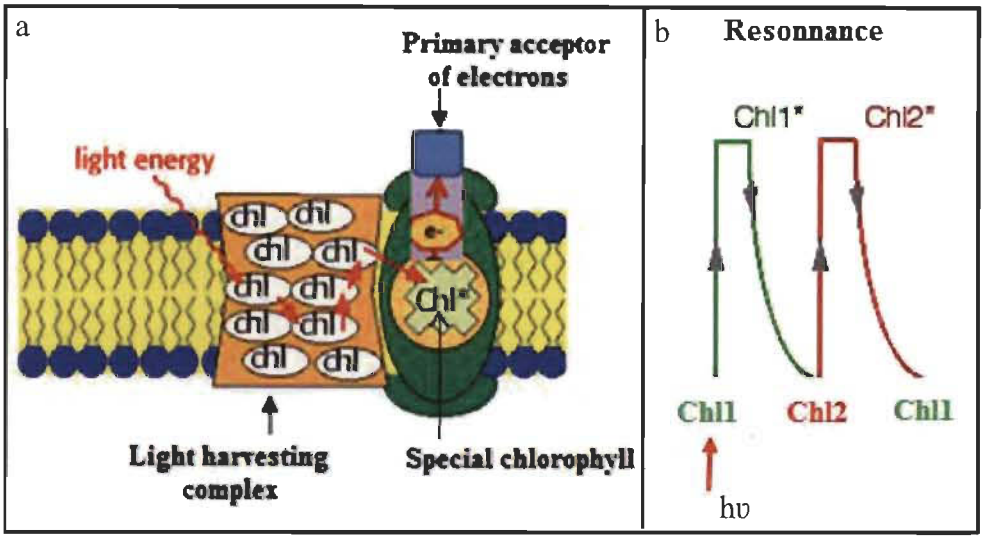


Figure 1.12 Absorption et transfert de l'excitation lumineuse par les chlorophylles au niveau des antennes d'un photosystème.
(a) Schéma du transfert de l'énergie lumineuse d'une molécule de chlorophylle (Chl) à l'autre jusqu'à la chlorophylle spéciale où se fait la séparation de charge (é) qui sera transférée à l'accepteur primaire du photosystème [27]. (b) excitation (hυ) et retour à l'état fondamental d'une molécule de chlorophylle (Chl1-> Chl1* -> Chl1) et transfert de l'énergie par phénomène de résonnance (Chl1* -> Chl2 -> Chl2*).

Dans le cas du PSI, le niveau énergétique élevé de la Chl excitée (P700*) lui permet de libérer un électron qui passe à l'accepteur primaire (A_0). Ce processus s'appelle la séparation de charge, et constitue l'élément déclencheur du transport des électrons dans la membrane photosynthétique (Figure 1.12.a). Ensuite, l'électron transite à travers les protéines du côté accepteur du PSI (CA) : l'accepteur secondaire A_1, le transporteur F_X et les accepteurs finaux F_A et F_B respectivement, pour atteindre la Fd du côté stromatique des thylacoïdes. À ce niveau-là, l'enzyme FNR catalyse le transfert de l'électron de la Fd au $NADP^+$ pour former le NADPH (Figure 1.13). Le P700 oxydé retourne à son état réduit, grâce à un électron en provenance de la PC situé du côté donneur du PSI (CD). Parallèlement à l'oxydation du P700, le centre réactionnel du PSII (P680) subit aussi une séparation de charge, après absorption de la lumière par les Chls, et libère un électron [5].

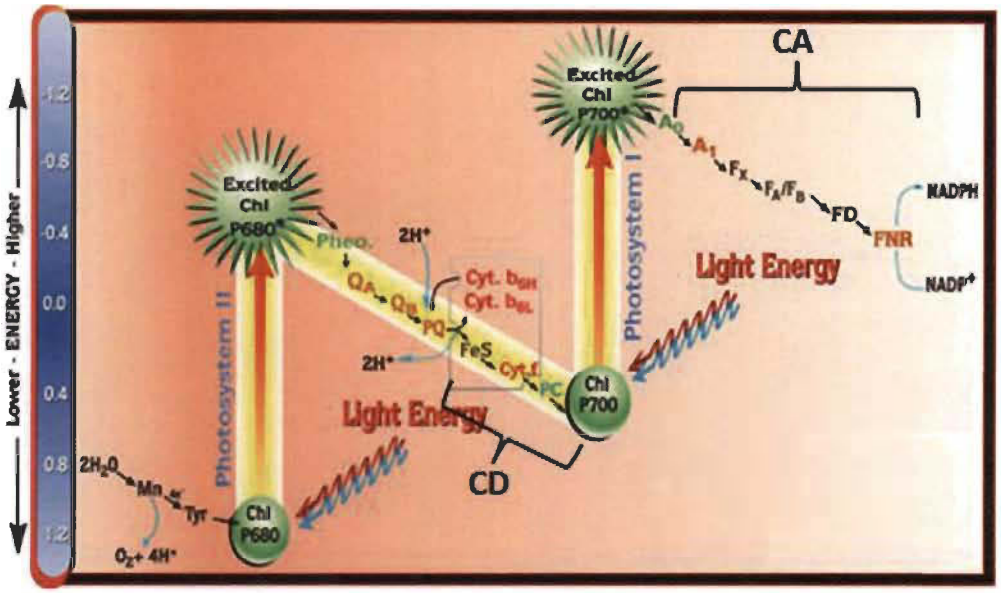


Figure 1.13 Digramme du schéma Z du transport des électrons dans la membrane des thylacoïdes.
La figure montre la séquence des transporteurs d'électrons dans la membrane des thylacoïdes et leurs niveaux d'énergie. CD : côté donneur, CA : côté accepteur [28].

Au niveau du PSII, l'électron libéré est transféré à l'accepteur primaire Phé, puis il est transmis aux quinones Q_A et Q_B successivement pour enfin être acheminé à la PQ. Ensuite, le Cyt b_6f sert d'intermédiaire pour transférer l'électron du PQ réduit à la PC oxydée (au côté donneur du PSI). Suite à cette perte d'électron, le $P680^+$ reçoit un électron du résidu tyrosine Z (donneur primaire du PSII) situé sur la protéine D1. Une fois oxydé, le PSII accepte un nouvel électron du complexe de dégagement d'oxygène (CDO) suite à l'hydrolyse l'eau. Cette séquence du transfert des électrons photosynthétiques, dans la membrane des thylacoïdes, est appelée le transport linéaire des électrons (TLE). Le TLE est dépendant des différences de potentiel d'oxydoréduction entre les donneurs et les accepteurs d'électrons, résumé dans le schéma Z (Figure 1.13) [28]. Ce transfert d'électrons de l'eau vers le PSI, par l'intermédiaire du PSII, assure la production du NADPH. Dans certaines conditions particulières, les électrons destinés pour la réduction du $NADP^+$, au niveau du côté accepteur du PSI, peuvent emprunter d'autres voies ce qui diminue la production du NADPH.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

1.7.3 Production du pouvoir réducteur et bilan de la photosynthèse

L'hydrolyse de l'eau par le CDO au niveau du PSII libère, en plus des électrons, des protons dans le lumen des thylacoïdes et dégage de l'oxygène moléculaire (O_2). Le gradient de proton formé à travers la membrane thylacoïdale active le fonctionnement de l'enzyme ATPase qui synthétise l'ATP dans le stroma (Figure 1.14), à partir d'adénosine diphosphate (ADP) et de phosphate inorganique (Pi) [4, 29]. Le NADPH et l'ATP formés lors de transfert d'électrons constituent le pouvoir réducteur nécessaire pour incorporer le gaz carbonique (CO_2) de l'air à la voie de synthèse des hexoses, cycle de Calvin, selon la réaction suivante :

$$6CO_2 + 6H_2O \text{ ---------- } > C_6H_{12}O_6 + 6O_2$$

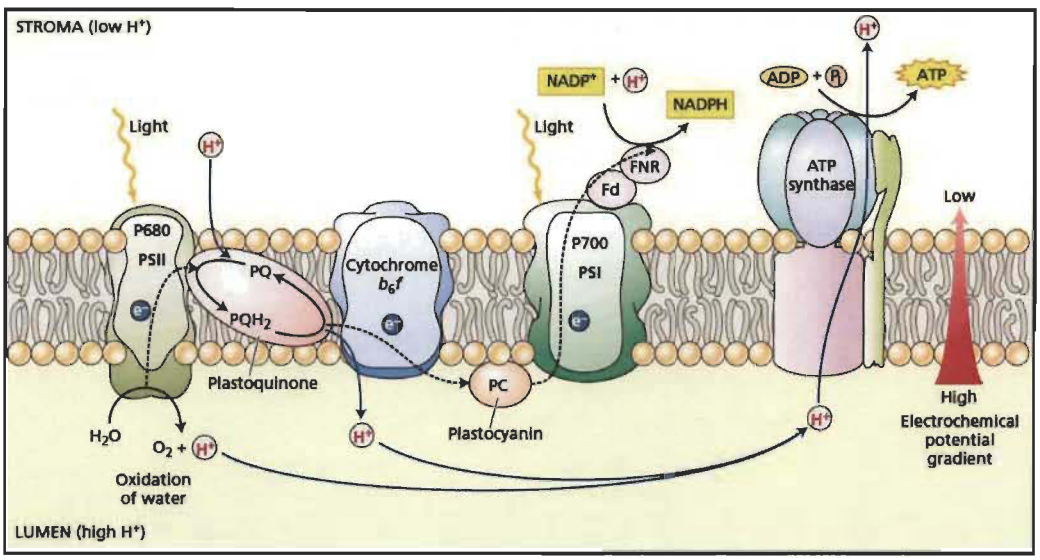


Figure 1.14 Schéma du transport linéaire des électrons dans les membranes des thylacoïdes et production du pouvoir réducteur (NADPH et ATP). L'oxydation de l'eau par le PSII libère des électrons (é) qui vont transiter à travers la plastoquinone, le cytochrome b_6f et la plastocyanine pour atteindre le PSI qui réduit la $NADP^+$ par l'intermédiaire de la ferrédoxine et la ferrédoxine NADP réductase (FNR). Les protons libérés dans le lumen forment un gradient de potentiel électrochimique qui sera dissipé par l'ATP synthase pour former l'ATP [29].

L'assimilation du CO_2 dans le cycle de Calvin nécessite l'apport d'énergie biochimique dans un ratio 3:2 pour l'ATP et le NADPH. Cette stœchiométrie ne peut pas

être atteinte par le TLE seul et nécessite donc un apport supplémentaire d'ATP. Effectivement, il est bien connu qu'il existe des voies de transport cyclique d'électrons (TCE) qui participent activement à la photosynthèse [30].

1.7.4 Transport cyclique des électrons

Le TCE effectué autour du PSI joue un rôle important chez les plantes sous conditions de croissance standards. Cette voie alternative de transfert d'électrons, qui implique le PSI en synergie avec le Cyt b_6f, assure la production d'ATP sans réduire le $NADP^+$. En effet, le TCE redirige les électrons du côté accepteur du PSI vers la PQ, pour la réduire selon deux voies impliquant soit la Fd réduite, soit le NADPH. Ces deux voies sont catalysées par les enzymes FNR (voie dépendante PGR5) et NADPH déshydrogénase (NDH) respectivement (Figure 1.15), et peuvent être menées en parallèle [31-33].

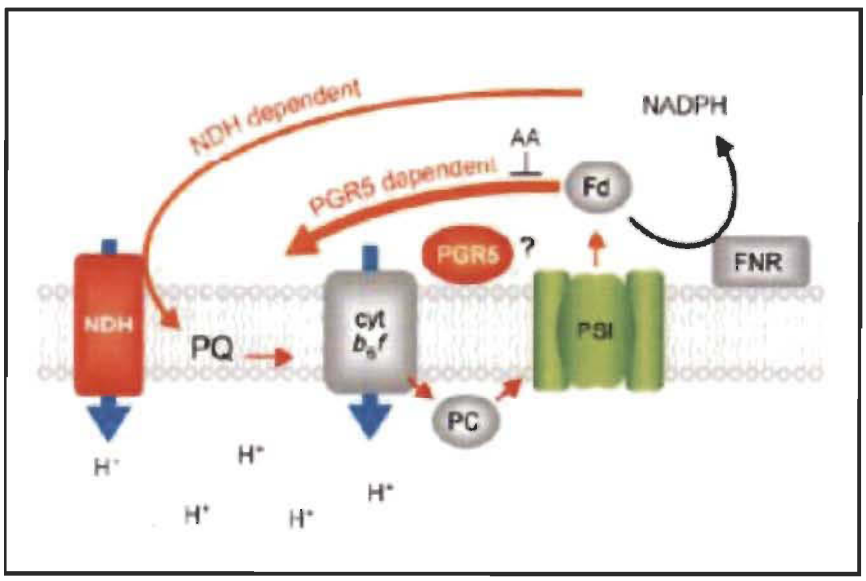


Figure 1.15 Schéma du transport cyclique des électrons autour du photosystème I.
La figure montre les voies du transport cyclique des électrons dans la membrane des thylacoïdes des plantes : une voie dépendante de la NADPH déshydrogénase (NDH), une autre dépendante de la protéine PGR5 (attribuée probablement à la FNR). PGR5 : protein growth regulation 5; Cyt b_6f: cytochrome b_6f; Fd : ferrédoxine; FNR: ferrédoxine NADP réductase; PC: plastocyanine; PQ: plastoquinone [31].

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

La chaîne de transport cyclique fonctionne dans des supercomplexes comprenant le PSI, le Cyt b_6f, la PC et la Fd [34]. Elle permet le retour des électrons de la PQH_2 au PSI à travers le Cyt b_6f à la manière du transport linéaire d'électrons. Ce retour est accompagné de la translocation des protons vers le lumen ce qui augmente le gradient de pH à travers la membrane thylacoïdale et active l'ATPase. Cette action assure un apport supplémentaire d'ATP nécessaire pour la fixation du CO_2, mais aussi pour le déroulement de plusieurs autres réactions au niveau du chloroplaste.

Dans les conditions de croissance optimale, le transport d'électrons linéaire est favorisé par rapport au transport cyclique qui ne représente que près de 3 % de la totalité des électrons transférés [35]. Cette dernière intervient généralement durant la période de l'induction des processus photosynthétiques par la lumière. En effet, chez les plantes adaptées à l'obscurité, la totalité des électrons induits par l'excitation lumineuse, qui atteignent le côté accepteur du PSI, est redirigée vers le transport cyclique (100 % des PSI sont impliqués). Ce n'est qu'au fur et à mesure de l'illumination que les électrons seront acheminés vers le $NADP^+$, et l'équilibre est établi [36].

1.7.5 Voies de dissipation de l'énergie lumineuse

Lorsque les Chls au niveau des antennes LHCs absorbent l'énergie lumineuse, elles passent d'un état fondamental stable à un état excité (niveau d'énergie plus élevé). Pour qu'elles retournent à leur état stable, les Chls libèrent cette énergie qui emprunte trois voies majeures (Figure 1.16). Dans les conditions de croissance optimale, une fraction de 78-80 % de l'énergie absorbée est destinée à la photochimie au niveau des photosystèmes (conversion de l'excitation en transport d'électrons). Une autre fraction de 20-22 % va être perdue sous forme de chaleur (quenching non photochimique : NPQ) ou émise comme fluorescence chlorophyllienne [37]. Toutefois, une fine proportion de Chls reste excitée plus longtemps pour se transformer en Chls excitées à l'état triplet ($^3Chl^*$). Ces Chls interagissent avec l'O_2 pour former l'oxygène singulet ($^1O_2^*$) qui est une espèce oxygénée, généralement, éliminée par les caroténoïdes pour préserver le fonctionnement du PSII.

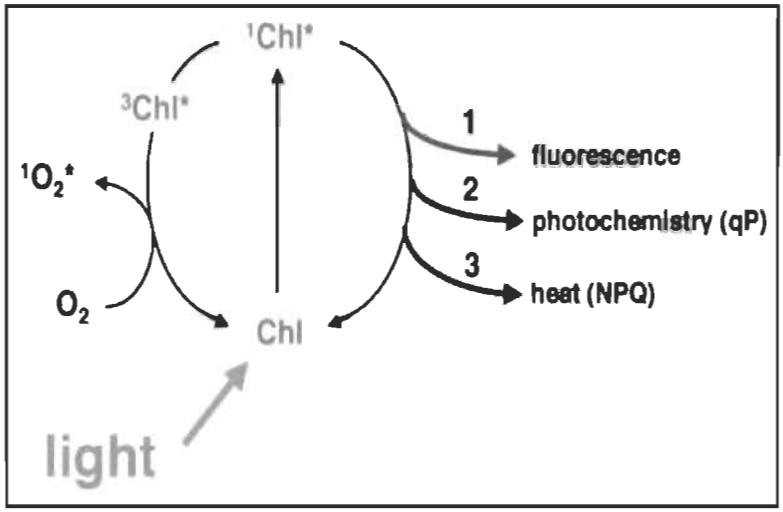


Figure 1.16 Voies de dissipation de l'énergie d'excitation au niveau d'une molécule de chlorophylle.
États d'excitation de la chlorophylle : Chl (fondamental), ^{1}Chl* (excité singulet), ^{3}Chl*(excité triplet) et voies de dissipation de l'énergie sous forme de fluorescence, photochimie (qP), chaleur (NPQ) ou formation d'oxygène singulet ($^{1}O_2^{*}$) [37].

1.7.6 Perturbation de la dissipation de l'énergie lumineuse

La proportion de l'énergie utilisée pour la photochimie peut être affectée par plusieurs facteurs environnementaux, dont l'excès d'irradiation. En effet, l'intensité lumineuse sursaturante, comme celui du plein soleil du midi, peut réduire l'efficacité photosynthétique chez les plantes. Cette perturbation est due à l'augmentation de la fraction de l'énergie perdue par les voies non photochimiques (chaleur et fluorescence). Elle peut être aussi due aux dommages induits par la génération des espèces oxygénées réactives (ROSs). En effet, lorsque l'excès d'irradiation dépasse la capacité d'utilisation l'énergie lumineuse par les photosystèmes, la proportion des Chls qui demeureront excitées plus longtemps deviennent plus importantes, augmentant ainsi la probabilité de formation de $^{1}O_2^{*}$. De plus, sous l'effet de la pression de réduction des accepteurs finaux du PSI (F_A et F_B), une fuite des électrons vers l'O_2 se produit générant ainsi la production d'autres ROSs [38]. L'accumulation de ces espèces nocives induit des dommages pour les deux photosystèmes et la perturbation de leur fonctionnement. Ce phénomène appelé photoinhibition peut être aggravé lorsque le stress lumineux est associé à d'autres facteurs climatiques tels que la sècheresse, le stress thermique, etc.

1.8 La photoinhibition du photosystème I

Le PSI est plus stable que le PSII face aux conditions de stress *in vivo* à température ambiante, plus particulièrement pour ce qui est de la photoinhibition. Ce n'est qu'à partir de 1994 que l'inhibition du PSI a été rapportée par Terashima et ses collaborateurs [39]. Depuis cette découverte, de nombreux travaux de recherche se sont intéressés à énumérer les conditions de photoinhibition du PSI et de comprendre les mécanismes de son endommagement.

1.8.1 Conditions de la photoinhibition

Actuellement, il est bien clair que la photoinhibition du PSI survient dans des conditions de croissance particulières, combinant des basses températures et des intensités de lumière variées (faible, modéré ou forte). Des conditions typiques de l'hiver et du printemps des régions tempérées. Aussi, cette photoinhibition n'affecte que certaines espèces sensibles aux basses températures telles que le concombre, l'orge, la patate, etc. [39-42]. Cependant, la photoinhibition du PSI à température ambiante n'est observée que dans des expériences *in vitro* sur des extraits de membranes thylacoïdales ou des fractions membranaires enrichies en PSI [43,44]. Ceci montre que le mécanisme de résistance des PSI dans les conditions ambiantes est perdu avec l'isolation du matériel photosynthétique de son environnement naturel.

1.8.2 Origine de la photoinhibition

Lorsque les plantes sensibles aux basses températures sont exposées à la lumière, les électrons en provenance du PSII et l'O_2 constituent des facteurs indispensables à la photoinhibition du PSI [39]. En effet, sous une forte pression de réduction du PSI, il se produit une fuite des électrons de la Fd vers l'O_2 (Figure 1.17), au lieu de l'accepteur $NADP^+$. Ceci aboutit à la formation de l'ion superoxyde (O_2^-) qui se transforme en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) [38]. Le H_2O_2 peut interagir avec les centres [4Fe4S] réduits, au niveau des protéines Fx, F_A et F_B, pour produire le radical hydroxyle ($OH^·$) [45], une espèce oxygénée hautement réactive et nocive pour les molécules biologiques

[46]. L'accumulation excessive des ROSs induit la génération d'un état de stress oxydatif, dans le matériel photosynthétique, qui cause la photoinhibition au niveau de PSI.

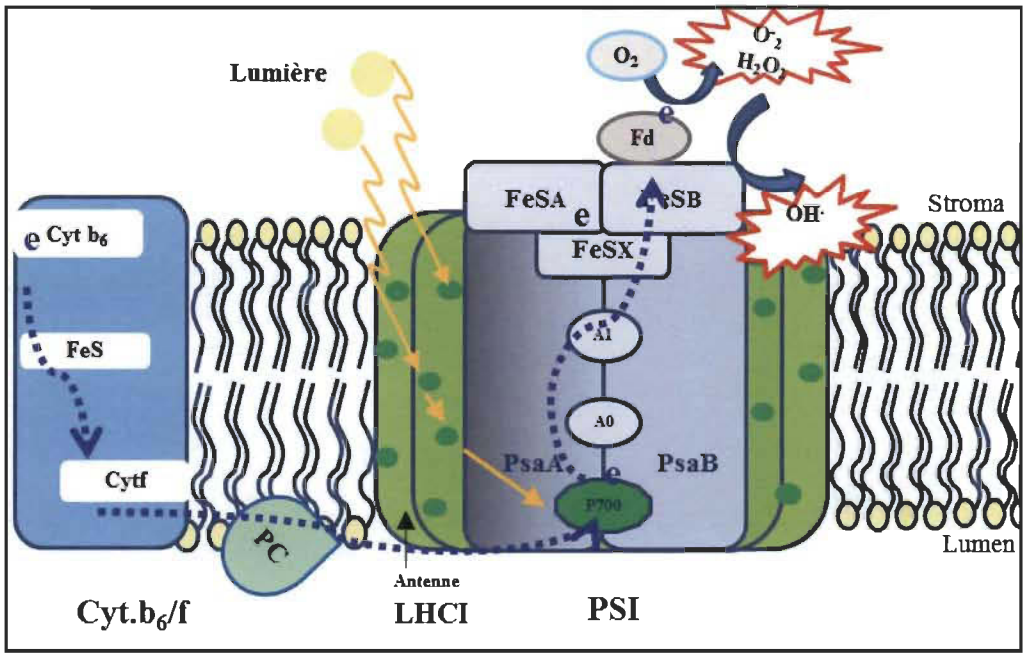


Figure 1.17 Génération des espèces oxygénées réactives au niveau du photosystème I lors de sa photoinhibition.
L'excès de lumière induit une réduction prolongée des accepteurs d'électrons finaux à centres FeS (A et B), ce qui produit une fuite des électrons (é) de la ferrédoxine (Fd) à l'oxygène moléculaire (O_2) pour générer l'ion superoxyde (O_2^-) et ses dérivés le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($OH^·$). PSI : photosystème I avec ses cofacteurs, LHCIs : antennes photo-collectrices de lumière, Cyt b_6f : cytochrome b_6f et PC : plastocyanine [47].

Cette accumulation des ROSs est due à l'inefficacité des mécanismes de protection situés à plusieurs niveaux dans la plante (feuille et cellule). Plus particulièrement, le système antioxydant enzymatique situé dans le stroma ou dans la membrane des thylacoïdes [48,49]. D'ailleurs, il a été rapporté que certaines enzymes antioxydantes de ce système de défense telles que la superoxyde dismutase (SOD) et l'ascorbate peroxydase (APX) sont inhibées sous les conditions d'excès de lumière [45].

1.8.3 Sites et mécanisme de la photoinhibition du photosystème I

1.8.3.1 Sites de l'inhibition du photosystème I

Lorsque les ROSs générés près du PSI restent libres dans leur milieu de formation, ils vont entamer des réactions d'oxydation au niveau des lipides, des pigments et des protéines de leur microenvironnement. L'étude de l'inhibition du PSI, sous condition de stress lumineux montre que les premières cibles du stress oxydatif sont les antennes LHCI et les centres [4Fe4S] au niveau des accepteurs finaux Fx, F_A et F_B [43,50]. L'oxydation des centres [4Fe4S] est suivie d'un détachement des polypeptides stromatiques PsaC, PsaD et PsaE qui peut se faire même à une faible intensité de lumière. Ensuite, il se produit la désactivation de la Chl P700 et des accepteurs A_0 et A_1 qui nécessite une intensité de lumière plus élevée. Finalement, le stress oxydatif endommage les protéines du centre réactionnel la PsaA et la PsaB. La destruction d'au moins un des constituants du PSI induit une inhibition de son fonctionnement [51].

1.8.3.2 Mécanisme de dégradation de la protéine PsaB

L'inhibition du fonctionnement de PSI (525 kDa) est généralement accompagnée de la dégradation des sous-unités du centre réactionnel PsaA et PsaB (65-68 kDa) ainsi que d'autres petites sous-unités [40,50,52]. L'étude du mécanisme de dégradation de la protéine PsaB montre que le stress oxydatif génère la production de plusieurs fragments protéiques de masse moléculaire 51, 45 et 18 kDa détectés par western blot, en utilisant des anticorps anti-PsaB et anti-Ala234-Gln248 (séquence d'acides aminés situés sur la protéine PsaB). Le mécanisme proposé pour la formation du fragment de 51 kDa, consiste en une destruction du centre [4Fe4S] au niveau du transporteur d'électron Fx par le radical $OH^{\cdot}$, ce qui perturbe la conformation structurale de la protéine PsaB. Cette perturbation rend la protéine susceptible aux protéases qui vont fragmenter sa partie exposée au stroma. Le site de clivage est probablement situé entre les hélices 8 et 9 de la protéine, près du site de fixation du Fx (Figure 1.18).

En ce qui concerne la formation des fragments 45 et 18 kDa, le clivage des liaisons peptidiques se produit entre les résidus Ala^{500} et Val^{501} du côté luminal de la protéine par un processus enzymatique. Probablement par des protéases dans le lumen ou bien associées au côté luminal de la membrane thylacoïdale [40].

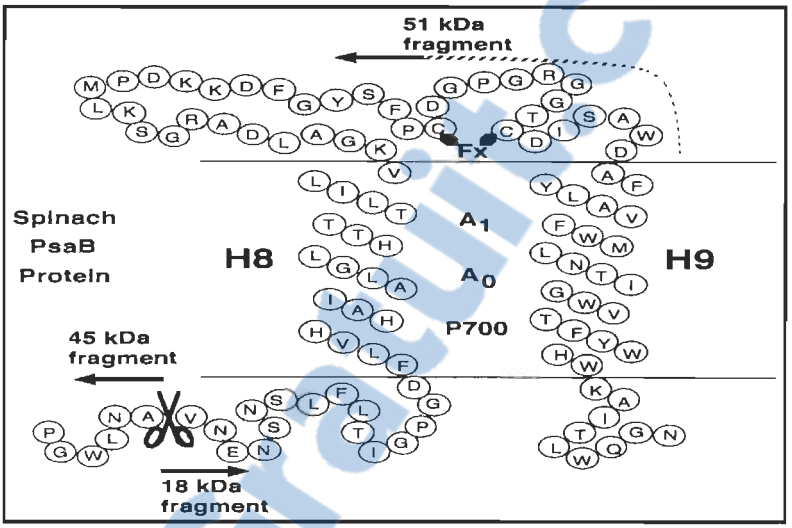


Figure 1.18 Sites de dégradation de la protéine PsaB au niveau du photosystème I par les protéases.
La figure montre les polypeptides de la protéine PsaB et les sites de dégradation par les protéases : du côté du stroma près de l'accepteur d'électron Fx et du côté du lumen entre les acides aminés alanine 500 et valine 501 [40].

1.8.4 Recouvrement de la photoinhibition

Après la photoinhibition à basse température, la réparation des PSI endommagés, dans des conditions de croissance optimales, devient un processus très long qui peut prendre sept jours sans être complet [53]. Dans d'autres cas, la photoinhibition du PSI est complètement irréversible. La lenteur de la réparation des protéines dégradées, dans le centre réactionnel du PSI (PsaA et PsaB), est probablement due au très faible taux de régénération de ces protéines [54]. D'ailleurs, le mécanisme de réparation de ces protéines n'est pas encore connu, contrairement à celui de la protéine D1 dans le centre réactionnel du PSII. Par conséquent, la photoinhibition du PSI induit une diminution du contenu en PSI fonctionnel dans l'appareil photosynthétique et affecte sérieusement l'activité de fixation du CO_2 réduisant ainsi la productivité des plantes. C'est pour cela

Rapport-gratuit.com

que la photoinhibition du PSI est considérée plus néfaste pour la plante que celle du PSII.

1.9 La photoprotection du photosystème I

Dans le but d'identifier le mécanisme de tolérance du PSI face à la photoinhibition à température ambiante et d'expliquer les causes de la sensibilité de certaines plantes à basse température, plusieurs stratégies de défense ont été suggérées. Le mécanisme de base proposé implique l'empêchement de la formation des ROSs et leur élimination lorsqu'ils sont déjà générés.

1.9.1 Mécanismes préventifs

Les premières stratégies pour éviter l'excès de radiation lumineuse chez les plantes concernent le changement de l'orientation des feuilles et de la disposition des chloroplastes dans la cellule pour qu'ils soient moins exposés à la lumière (Figure 1.19 a et b) [55,56].

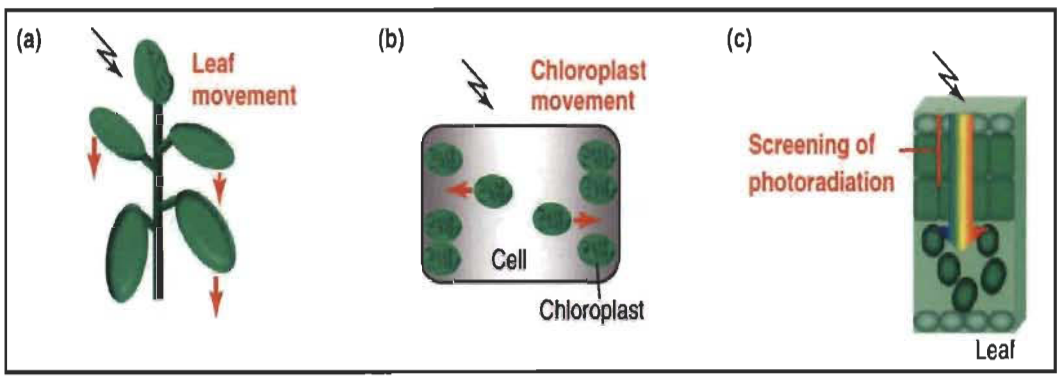


Figure 1.19 Mécanismes de photoprotection préventifs.
(a et b) Mouvement des feuilles et des chloroplastes pour éviter l'exposition à une forte intensité de lumière, (c) accumulation des composés phénoliques dans les cellules épidermiques des feuilles pour absorber l'excès des radiations [56].

L'accumulation des composés phénoliques comme les flavonoïdes, les acides phénoliques et les anthocyanines au niveau des cellules épidermiques (Figure 1.19c)

peut aussi piéger les radiations UV avant d'atteindre les cellules du mésophylle, siège de la photosynthèse [56]. Lorsque ces mécanismes sont insuffisants pour protéger le fonctionnement de l'appareil photosynthétique, d'autres stratégies sont déployées à l'échelle moléculaire.

1.9.2 Mécanismes de régulation

1.9.2.1 Dissipation de l'excès d'énergie

Au niveau des membranes de thylacoïdes, l'excès de l'énergie lumineuse, absorbée par les Chls, sera dissipé via le processus de quenching non photochimique (NPQ). La dissipation thermique d'énergie (qE) est une composante de ce processus, effectué par le cycle des xanthophylles qui se déroule au niveau des antennes collectrices de lumière (LHCs). Ce mécanisme a été largement étudié dans le cas du PSII, et son efficacité a été prouvée [57,58]. Cependant, malgré la présence des xanthophylles dans les antennes LHCIs du PSI, les connaissances concernant leur implication dans la photoprotection du PSI sont presque inexistantes (Figure 1.20) [56,59].

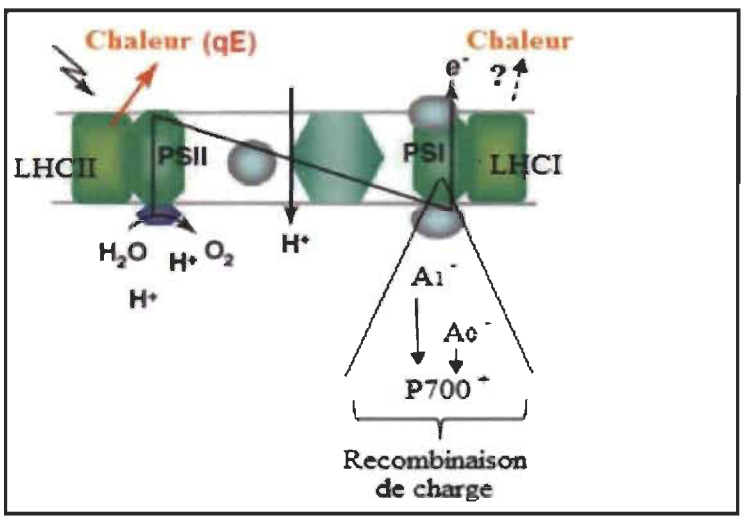


Figure 1.20 Voies de dissipation de l'excès d'énergie absorbée.
La dissipation thermique d'énergie (qE) au niveau du photosystème I n'a pas encore été prouvée contrairement au photosystème II. Alors que la recombinaison de charge entre l'accepteur primaire A_0^- et la chlorophylle spéciale P700 ou entre l'accepteur secondaire A_1^- et le P700 diminue la pression d'excitation du côté accepteur [56].

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

À la différence des xanthophylles, les β-carotènes associés aux antennes LHCI ont la capacité de dissiper une fraction de l'énergie lumineuse excédentaire. En effet, leurs propriétés leur permettent de quencher efficacement les Chls excitées à l'état singulet ($^1Chl^*$) ou triplet ($^3Chl^*$) [8,60].

D'autre part, la recombinaison de charge entre les accepteurs A_0 et A_1 réduits et le P700 oxydé a été considérée comme une voie de dissipation de la pression d'excitation au niveau du PSI [61,62]. En effet, lorsque l'état de réduction des accepteurs finaux Fx, F_A et F_B se prolonge, le transfert d'électrons au niveau de l'accepteur A_1 est bloqué. Ce qui induit l'accumulation des entités A_1^- et A_0^- favorisant ainsi la recombinaison de charge à partir de ces accepteurs vers le $P700^+$ pour produire le P700 à l'état singulet ou triplet (Figure 1.20).

1.9.2.2 Inhibition du photosystème II

L'inhibition du transport d'électron dans la membrane des thylacoïdes, sous condition de lumière, est considérée comme un moyen de protection pour l'appareil photosynthétique, plus particulièrement pour le PSI. En effet, en inhibant le transport d'électron au niveau du PSII ou au niveau du Cyt b_6f, par des inhibiteurs artificiels (DCMU et DNP-INT), le fonctionnement du PSI et de toute la membrane est préservé contre la photoinhibition. La diminution du flux d'électrons vers le PSI réduit la génération des ROSs, et par conséquent leurs dommages à la machinerie photosynthétique [63]. Par analogie, les chercheurs ont considéré la photoinhibition du PSII, dans les conditions naturelles, comme une stratégie de régulation plus tôt qu'un endommagement pour le PSII [64]. Cette forme d'autorégulation ne semble pas bénéfique pour le développement immédiat de la plante, mais lui permet de survivre pendant un stress prolongé.

1.9.2.3 Transport cyclique des électrons

Le TCE est connu par son fonctionnement transitoire, dans les conditions de croissance standards, pour ajuster la stœchiométrie d'ATP. Toutefois, sous conditions de stress, le fonctionnement du TCE devient permanent pour aider la plante à s'acclimater à son environnement [65]. À la différence de la recombinaison de charge, le TCE agit pour diminuer la réduction prolongée des accepteurs Fx, FA et FB. En effet, lorsque la pression des électrons sur ces accepteurs dépasse la capacité de la Fd à réduire le $NADP^+$, l'activation du TCE permet de rediriger l'excès d'électrons vers la PQ et diminuer la pression sur le côté accepteur du PSI [53,65]. De plus, le fonctionnement de TCE permet de combler le déficit d'ATP suite à l'inactivation du PSII, et ce grâce au gradient de proton membranaire qu'il crée. Dans certains cas, il fonctionne à un taux proche de celui du transport linéaire (la photosynthèse optimale). La régulation du TCE dans les conditions de stress est contrôlée par la concentration d'ATP dans les chloroplastes [34]. La déficience en TCE, par l'inactivation de la voie FNR (par mutation), augmente la photoinhibition du PSI [66]. Malgré la multitude de mécanismes de régulation et de dissipation d'énergie, suggérés pour la photoprotection du PSI dans les travaux de recherche effectués, leur efficacité reste relative.

1.9.3 Mécanisme antioxydant

Lorsque les mécanismes de prévention et de régulation de transfert de l'énergie cités auparavant sont dépassés par l'ampleur du stress, l'accumulation des ROSs augmente. Leur élimination est attribuée au système antioxydant décrit par Asada [38]. Ce système est composé d'une série de réactions de détoxification du O_2^- et du H_2O_2, impliquant plusieurs composantes enzymatiques et non enzymatiques (Figure 1.21).

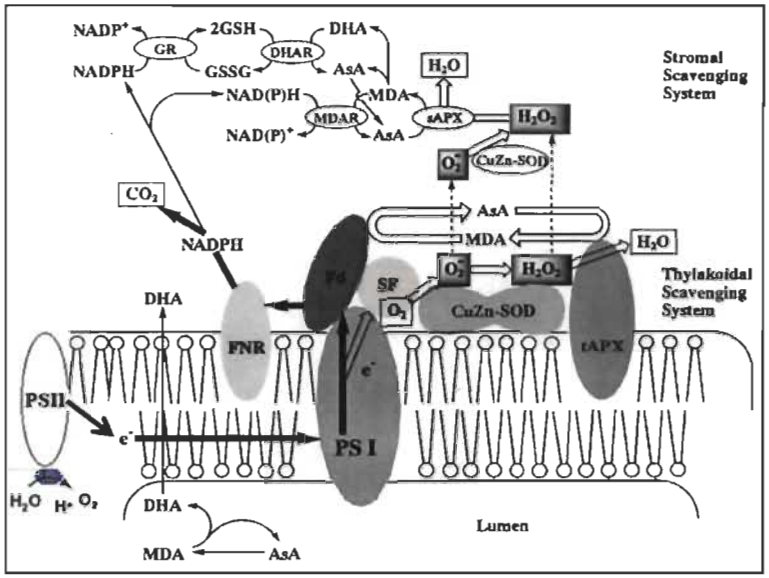


Figure 1.21 **Mécanisme antioxydant enzymatique au niveau des chloroplastes.** Photoréduction de l'O_2 dans les membranes des thylacoïdes et formation de l'ion superoxyde (O_2^-) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Compartimentation des enzymes antioxydantes impliquées dans la détoxification du O_2^- et du H_2O_2 (systèmes thylacoïdales et autres stromatiques). CuZn-superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), ascorbate (AsA), ferrédoxine (Fd), dehydroascorbate réductase (DHAR), glutathionne réductase (GR), monodehydroascorbate (MDA) et dehydroascorbate (DHA), facteur stromatique (SF) [38].

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Les réactions de détoxification sont déclenchées par les enzymes SOD et l'APX. Ces deux enzymes existent sous deux formes : thylacoïdale associé à la membrane et stromatique. Mais dans les deux cas, les systèmes antioxydants d'origine thylacoïdale et stromatique assurent la conversion du O_2^- en H_2O_2, puis du H_2O_2 en eau par la SOD et l'APX respectivement.

Le système antioxydant est considéré comme la plus importante ligne de défense contre le stress oxydatif généré au niveau du chloroplaste. L'étude de l'effet protecteur de ce mécanisme, sous des conditions de photoinhibition à basse température, révèle qu'il n'est pas aussi efficace qu'il pourrait l'être dans d'autres conditions [45,67]. Par conséquent, il a été suggéré que le pouvoir protecteur du système antioxydant pourrait être affecté par les conditions de basse température [67], sans toutefois élucider le maillon sensible à la température ni son mode d'action. Malgré que les mécanismes de protection du PSI cités auparavant soient de nature variée (physique, physiologique et

biochimique), leur efficacité limitée ne reflète pas la tolérance du PSI à la photoinhibition *in vivo*.

1.9.4 Rôles des protecteurs osmotiques

Dans le but de mieux comprendre le mécanisme de résistance du PSI à la photoinhibition, des études *in vitro* ont rapporté l'effet protecteur de certains composés osmotiques ou des scavengeurs artificiels de ROSs. Le rôle protecteur de ces composés tels que le saccharose, glycine betaine, histidine et le n-propylgalate, contre le stress lumineux, a été prouvé sur des extraits membranaires enrichis en PSI [51,68], ce qui suggère que le mécanisme de tolérance du PSI *in vivo* pourrait être de type antioxydant. D'autre part, des études récentes rapportent que les plantes sont capables d'induire l'augmentation de l'accumulation des polyamines (PAs) en réponse à différentes conditions de stress [69]. Cette augmentation des contenus en PAs pourrait être impliquée dans leur réponse de tolérance aux stress. Plus précisément, l'accumulation des PAs dans les chloroplastes suggère qu'elle joue un rôle important dans la protection de l'appareil photosynthétique contre les stress abiotiques [70]. Toutefois, la compréhension des effets et du mode d'action des PAs au niveau de la machinerie photosynthétique nécessite encore beaucoup d'investigations.

1.10 Les polyamines biogéniques

Les PAs biogéniques sont des composés organiques formés de chaînes carbonées aliphatiques possédant au moins deux groupements amines (Figure 1.22). Les PAs les plus répandues sont la spermine (Spm), la spermidine (Spd) et la putrescine (Put). La Spm qui porte quatre groupes amines sur sa chaîne carbonée est appelée aussi tetraamine. Alors que la Spd et la Put portant trois et deux amines sont appelées triamine et diamine respectivement. Ces PAs sont synthétisées dans les cellules eucaryotes végétales et chez les algues vertes [71,72]. À pH physiologique, les PAs existent à l'état protoné et sont associées avec plusieurs macromolécules dans les cellules. Cette interaction permet de réguler la fonction de ces molécules et de contrôler, par

conséquent, plusieurs processus physiologiques tels que la division cellulaire [73], la stabilisation des acides nucléiques et des membranes [74], la sénescence [75] et la réponse aux stress [69].

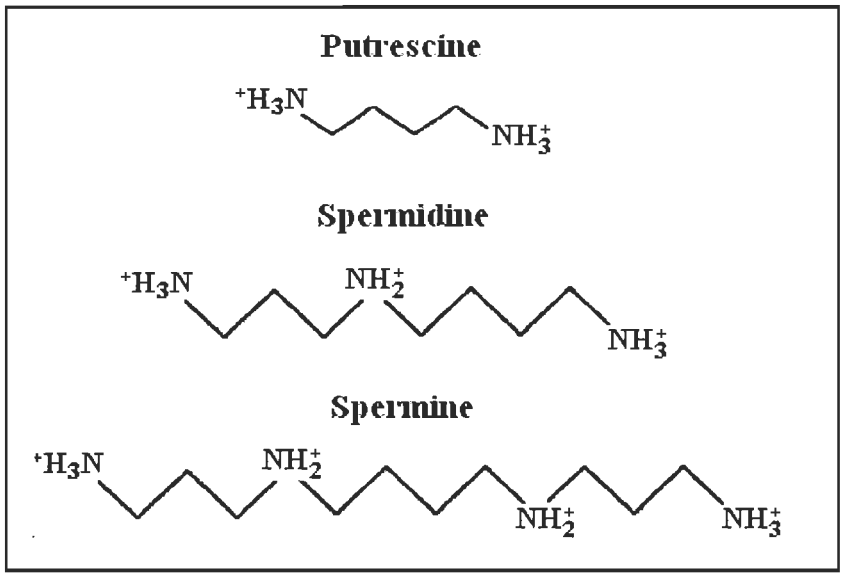


Figure 1.22 Structure des polyamines biogéniques.

1.10.1 Métabolisme des polyamines

1.10.1.1 Biosynthèse

La synthèse de la Spd et de la Spm dépend de la disponibilité de la Put (diamine), qui elle-même dérive de deux précurseurs différents, menant chacun à une voie de synthèse indépendante. La première voie consiste à une simple décarboxylation du L-ornithine par l'enzyme ornithine décarboxylase (ODC). La deuxième voie permet de synthétiser la Put à partir du l'arginine en utilisant l'enzyme arginine décarboxylase (ADC) qui produit l'agmatine. Ce dernier va être métabolisé par les enzymes agmatine iminohydrolase (AIH) et N-carbamoylputrescine amidohydrolase (CPA) successivement pour produire la Put (Figure 1.23). Ensuite, les deux autres PAs, Spd (triamine) et Spm (tetraamine), dérivent de la Put par fixation d'un et deux groupes aminopropyles respectivement. Ces réactions sont catalysées par des enzymes appelées spermidine (SPDS) et spermine synthase (SPMS).

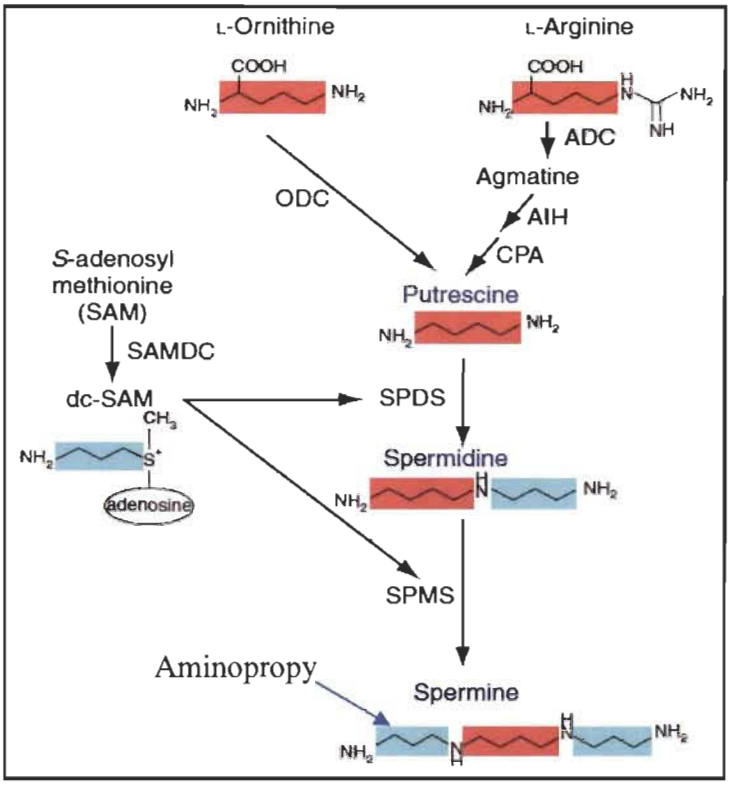


Figure 1.23 Voies de biosynthèse des polyamines biogéniques chez les plantes. Enzymes de biosynthèse : ADC : arginine décarboxylase, ODC : ornithine décarboxylase, SPDS : spermidine synthase, SPMS : spermine synthase et SAMDC : S-adénosyl-méthionine décarboxylase, dcSAM : S-adénosyl-methionine decarboxylé [76].

Le groupement aminopropyle provient de la décarboxylation de S-adénosyl-méthionine (SAM) catalysée par l'enzyme S-adénosyl-méthionine décarboxylase (SAMDC) [76]. En plus de leur présence dans le cytosol, toutes les enzymes impliquées dans la biosynthèse de PAs (ADC, ODC et SAMDC) ont été mises en évidence dans les chloroplastes de cellules végétales. Ce qui révèle l'importance du métabolisme des PAs dans le déroulement des processus photosynthétiques [77,72].

1.10.1.2 Conjugaison

Le contenu cellulaire en PAs peut aller de l'ordre du micro-molaire à l'ordre du milli-molaire. Il est régulé par les processus métaboliques : synthèse, catabolisme et transport entre les différents compartiments de la cellule. Le niveau des PAs est aussi modulé par le processus de conjugaison aux macromolécules biologiques [78]. En effet,

les PAs peuvent se trouver dans les cellules vivantes à l'état libre comme cation ou conjuguées avec des molécules biologiques telles que l'ADN, ARN, phospholipides et protéines. La concentration de PAs libres est régulée au niveau de la traduction et de la transcription [79]. La conjugaison entre les PAs et les protéines des membranes thylacoïdales (LHC et Rubisco) via des liaisons covalentes, est assurée par l'enzyme transglutaminase (TGase) [80]. L'activité de la TGase est finement contrôlée par la Kinetine pour ne pas induire la sénescence des feuilles [81]. De plus, l'incorporation des PAs sur ces protéines est contrôlée par l'intensité de lumière et le contenu en Ca^{2+} [82].

En comparant quatre espèces végétales, Mappeli [83] montre que les pourcentages des PAs libres et conjuguées solubles ou insolubles diffèrent entre les feuilles et les racines d'une même plante dans des conditions standards. Aussi, les proportions des trois PAs (Spm, Spd et Put) varient d'une plante à l'autre en réponse à différentes intensités de lumière UV-B.

1.10.1.3 Catabolisme

La dégradation des PAs chez les cellules végétales est réalisée grâce aux enzymes diamine oxydase (DAO) et polyamine oxydase (PAO). La DAO est une enzyme, dont l'activité est catalysée par un ion de cuivre. Elle oxyde préférentiellement la Put pour produire l'ammoniaque, le H_2O_2 et la pyrroline qui est directement métabolisée en acide 4-aminobutirique. Alors que la PAO est une enzyme à flavine qui oxyde les groupements amines secondaires de la Spd et de la Spm, la dégradation de Spd et de Spm par les PAO produit, en plus du 1,3-diaminopropane, l'acide 4-aminobutirique et 1-(3-aminopropyl)-pyrroline, respectivement pour les deux PAs [84]. La production du H_2O_2 est une caractéristique commune pour l'oxydation de toutes les PAs biogéniques (Figure 1.24). Le H_2O_2 est considéré comme une molécule de signalisation en réponse au stress oxydatif dans la cellule [85].

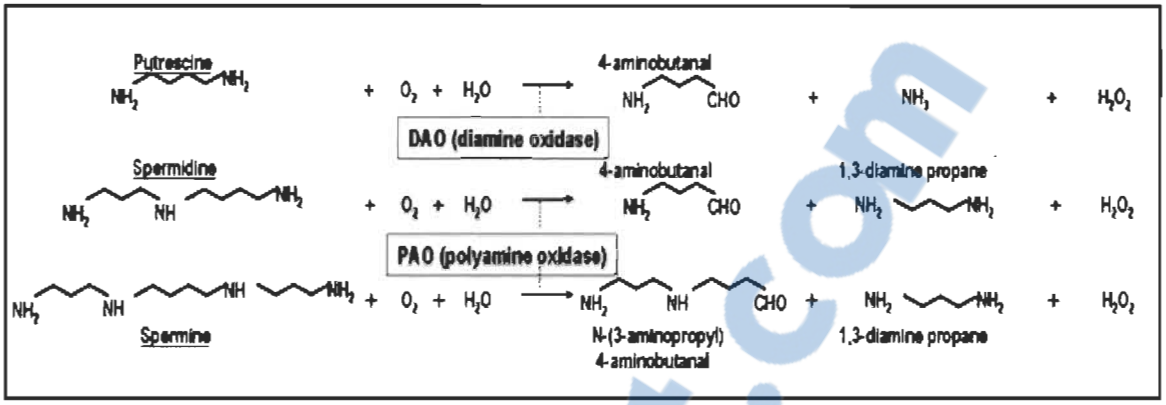


Figure 1.24 Voies de dégradation des polyamines. Enzymes et produits de dégradation [84].

1.10.1.4 Régulation du métabolisme des polyamines

Les niveaux d'accumulation des PAs chez les plantes dépendent de plusieurs facteurs tels que l'espèce végétale, le stade de développement, l'intensité du stress et sa durée [84]. Les variations des niveaux de PAs sont contrôlées par l'activité des enzymes de biosynthèse (ADC, ODC et SAMDC) ainsi que par les enzymes de dégradation (DAO et PAO). Les activités de ces enzymes sont régulées par la lumière et fortement dépendantes de la disponibilité de l'ATP [72,86]. Chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, l'activité de l'ODC est autorégulée par le contenu intracellulaire en PAs elles-mêmes [73]. Aussi, les faibles concentrations de Spm et de Spd peuvent affecter négativement la traduction de l'enzyme ODC [87].

1.10.2 Polyamines et stress environnementaux

Actuellement, il est connu que plusieurs espèces végétales peuvent stimuler leur métabolisme de PAs sous conditions de stress et manifester une meilleure tolérance alors que les plantes incapables d'augmenter leurs contenus en PAs se révèlent plus sensibles aux dommages causés par ces stress. Ceci suggère que la résistance des plantes nécessite l'accumulation des PAs à des niveaux plus élevés que le niveau constitutif dans leurs tissus. Pour cela, la modulation de la biosynthèse de ces amines par différentes méthodes constitue une alternative pour aider les plantes à augmenter leur tolérance.

Rapport-Gratuit.com

1.10.2.1 Application exogène

L'application de PAs exogènes, à des concentrations physiologiques (1 mM) [88], sur des plantes stressées a induit une augmentation de leur accumulation interne en ces polycations. Cette accumulation a été accompagnée d'une amélioration de la réponse de résistance des plantes comparativement aux plantes non traitées aux PAs. L'efficacité de protection des PAs ajoutées a été observée contre différents types de stress tels que la sècheresse, la salinité, les basses températures, le stress osmotique, les métaux lourds, et les radiations ultra violettes [89-90]. En effet, l'ajout de PAs exogènes a permis de réduire les symptômes de la sensibilité chez les plantes, notamment, une diminution ou une disparition complète des dommages cellulaires et des chloroses. Aussi, l'accroissement des PAs endogènes a pu stimuler l'activité photosynthétique et réduire l'état du stress oxydatif. Certes, l'efficacité de la réponse de résistance dépend de l'espèce végétale, de la nature du stress et de la nature de la PA appliquée [77,94-96].

Toutefois, si l'ajout de PAs exogènes protège la plante contre un stress à la fois, la transformation génétique de plantes, qui permet de sur-exprimer des gènes codant des enzymes de biosynthèse de PAs, pourrait améliorer leur tolérance à plusieurs stress. Cette tolérance multiple est d'une importance majeure pour la plante transgénique, surtout que dans la nature elle peut souffrir de plusieurs stress durant son cycle de vie [97].

1.10.2.2 Stimulation de l'expression des gènes

Sur le plan moléculaire, il a été rapporté que plusieurs stress environnementaux peuvent induire un changement dans les niveaux d'expression des gènes correspondants aux enzymes de biosynthèse de PAs [98-100]. En effet, l'accumulation de l'ARN messager des gènes codant pour les enzymes ADC, ODC et SAMDC a été stimulée sur des disques foliaires en réponse au stress salin, à l'acidité ou à l'application de H_2O_2 [99]. Ceci prouve bien l'activation du métabolisme des PAs en réponse aux variations des conditions de croissance de la plante. Toutefois, le niveau d'expression des gènes dépend de plusieurs facteurs tels que l'espèce végétale et sa sensibilité au stress [70].

La variabilité des réponses est probablement modulée par différents facteurs, qui induisent les gènes, tel que l'acide absicique [101].

Des études récentes ont exploité certaines approches de la biologie moléculaire tel que le génie génétique pour produire des plantes transgéniques capables de produire plus de PAs que le génotype sauvage correspondant. Ainsi, il existe des plantes de riz, tabac et tomate transgéniques capables de sur-exprimer les gènes de l'ADC, l'ODC et du SAMDC. Parallèlement, à l'augmentation des niveaux d'accumulation de Spm, Spd et Put, ces plantes présentaient un accroissement de leur pouvoir à tolérer différents stress tels que la salinité, la sécheresse et le stress thermique, comparativement à leurs homologues non transformés [93,102,103].

1.10.3 Polyamines et aspects de la réponse aux stress

1.10.3.1 Protection de la croissance et de la photosynthèse

L'importance physiologique des PAs dans la réponse des plantes aux stress suscite beaucoup d'intérêt dans la communauté scientifique depuis qu'il a été démontré que ces polycations disposent d'un pouvoir protecteur. En effet, les premières constatations rapportent que l'augmentation des contenus endogènes en PAs chez les plantes stressées induit une réduction de l'inhibition de la croissance et une augmentation de la biomasse [99,104-106]. Cette réponse est accompagnée d'une amélioration des performances photosynthétiques des plantes prétraitées à la Spm, Spd ou Put. Toutefois, le rôle de ces PAs sur la photosynthèse parait plus compliqué que sur les autres processus physiologiques de la plante, car ils affectent différemment les multiples aspects de la photosynthèse. En effet, la Put se montre plus efficace que la Spm et la Spd dans l'activation de la bioénergétique des membranes de thylacoïdes. Cette PA stimule la production d'ATP suite à l'augmentation de l'utilisation d'énergie dans les complexes photosynthétiques [107]. Alors que la Spm et la Spd stimulent mieux le processus du NPQ et augmentent l'efficacité de dissipation d'énergie au niveau du PSII. De plus, le ratio Put/Spm associé aux antennes LHCIIs joue un rôle important dans l'ajustement de la taille de ces antennes et par conséquent leur fonctionnement. La diminution de ce ratio

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

induit une augmentation de la taille des LHCIIs favorisant ainsi une dissipation efficace de l'excès d'énergie lumineuse. Alors que dans le cas de l'augmentation du ratio Put/Spm, la modification de la structure de l'appareil photosynthétique induit une meilleure utilisation de l'énergie [108,109].

D'autre part, il a été rapporté que la déficience en sels (Mg^{2+}, Cl^- et K^+) affecte négativement l'activité photochimique du PSII dans les thylacoïdes suite à la désorganisation de leur structure. Cependant l'ajout de Spm, de Spd ou de Put restaure l'empilement des thylacoïdes et par conséquent le fonctionnement du PSII. L'efficacité d'action de ces PAs est relative à leur caractère polycationique. En effet, il a été révélé que la Spm est plus efficace que la Spd, elle-même plus efficace que la Put dans la stimulation de l'efficience photochimique du PSII [110]. Ces résultats ont été confirmés, récemment, par des études de microscopie électronique, qui ont montré que l'ajout de Spd ou de Spm empêche la perturbation de la structure des lamelles stromatiques au niveau des thylacoïdes lors de stress salin. Ainsi, la structure des chloroplastes est préservée et l'efficacité photosynthétique est améliorée, la productivité des plantes est rétablie [89,106].

1.10.3.2 Rôle antioxydant

La majorité des stress abiotiques sont caractérisés par l'augmentation de l'état de stress oxydatif dans les cellules. Par conséquent, la résistance des plantes aux stress est généralement associée à leur capacité de réduire le stress oxydatif et de limiter ses dommages. Dans ce contexte, il a été rapporté que l'application exogène de PAs est accompagnée par une diminution de l'accumulation des plusieurs ROSs générés par différents stress [99,111]. Ceci peut être expliqué par la réduction de l'inhibition de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, APX, GPX et CAT) comme il a été démontré en présence de Put et de Spd [112]. Aussi, l'ajout de PAs exogènes a pu inverser l'accumulation du malondialdehyde, produits de peroxydation des lipides, chez des plantes de concombre exposées aux basses températures. Cette réponse de résistance contre les symptômes du stress oxydatif est encore meilleure chez les plantes

transgéniques sur-exprimant l'enzyme SAMDC [93]. L'accumulation des PAs dans les tissus végétaux permet donc de contrôler la génération des ROSs, ce qui empêche la peroxydation des lipides et la dénaturation des molécules biologiques.

1.10.3.3 Stabilisation des membranes

La réduction de l'état du stress oxydatif chez les plantes stressées a pour répercussion de stabiliser la structure des membranes photosynthétiques [75,99]. D'ailleurs, il a été démontré que la diminution de la peroxydation des lipides en présence de PAs est accompagnée de la préservation de plusieurs protéines photosynthétiques, telles que la protéine D1, D2, la protéine stabilisante du centre manganèse du PSII, la Cyt f et la PC [113,114]. En plus de leur rôle dans la réduction des effets du stress oxydatif, les PAs pourraient interagir directement avec les protéines de la membrane thylacoïdale grâce à l'effet de leurs charges positives. En effet, l'interaction de ces dernières avec les charges négatives de certains constituants membranaires permet la stabilisation de leur conformation [115]. De même, il a été démontré que la Spm est très efficace dans l'inhibition de l'activité des protéases dans les extraits de feuilles. Cette inhibition est due à un changement dans la conformation de ces enzymes suite à l'interaction directe avec la tetraamine. Il en résulte une réduction de la dégradation des protéines cellulaires dans l'extrait foliaire [116].

D'autre part, la préservation des protéines membranaires peut être expliquée par le rôle que jouent ces PAs dans la modulation de leur synthèse. En effet, une étude récente a montré que l'application exogène du Spd a atténué la diminution de l'ARN messager des gènes *psbA* et *psbD* observée sous conditions de sécheresse et de stress osmotique. Aussi, cette PA a pu retarder la perte de leurs protéines correspondantes D1 et D2, composantes essentielles du cœur du PSII [104]. Ceci montre que les PAs agissent aussi au niveau de la transcription des gènes pour réguler le contenu en protéines membranaires.

L'aspect multifonctionnel de ces PAs dans la stabilisation de la composition moléculaire de la membrane thylacoïdale a incité certains chercheurs à approfondir l'investigation concernant leur mode d'interaction avec le complexe du PSII. Cela permettra de mieux comprendre le mode d'action exact de ces PAs dans la préservation de l'intégrité membranaire.

1.10.4 Interaction des polyamines avec les protéines photosynthétiques

1.10.4.1 Site d'interaction

L'association des PAs avec les composantes de la membrane thylacoïdale, telles que les antennes LHCII et les protéines du cœur de PSII, montre leur implication dans la régulation du fonctionnement de l'appareil photosynthétique [117]. Des études récentes ont approfondi leur recherche sur le mode et le site d'interaction de la Spm, la Spd et la Put avec les protéines du complexe PSII, dans des expériences *in vitro* [118]. En effet, des extraits membranaires enrichis en PSII ont été exposés directement à des concentrations variables (physiologiques et non physiologiques) de ces trois PAs. La mesure du fonctionnement du PSII a été réalisée dans les conditions standards. Les résultats obtenus révèlent que l'application exogène de ces PAs est suivie de leur interaction avec les protéines du côté luminal du PSII. Pour les concentrations physiologiques, l'interaction des PAs avec les protéines du PSII ne semble pas affecter le fonctionnement du complexe protéique. Par contre, lorsque les PAs sont ajoutées à de fortes concentrations, elles inhibent l'activité du transport d'électron dans le PSII. Cette perturbation fonctionnelle a été attribuée à la perturbation conformationnel, voire même, au détachement de certains polypeptides du PSII tels que les protéines de masse moléculaire 17, 23 et 33 kDa [119]. Toutefois, dans les conditions de photoinhibition, seules les faibles concentrations de Spm se révèlent bénéfiques pour la protection de l'activité du PSII. En effet, cette PA peut se fixer sur les parties hydrophobes des protéines extrinsèques du CDO, sensibles aux dommages oxydatifs, pour les stabiliser [120]. Dans les mêmes conditions, la Spm et la Put interagissent de façon similaire avec les antennes LHCIIs et empêchent leur détachement suite à l'attaque des ROSs [121].

1.10.4.2 Mode d'interaction

Le mode de fixation des PAs aux polypeptides du PSII a été étudié grâce à la technique spectroscopique du transformée de Fourier à infrarouge (FTIR). Cette technique permet d'élucider les variations structurales des protéines du PSII et de son complexe avec la polyamine. Les résultats obtenus montrent que l'ajout de faibles concentrations de PAs sur les PSII n'induit pas de perturbations structurales notables. Alors que les fortes concentrations de PAs induisent un changement structural remarquable, reflétant la désorganisation des différentes structures constituant les protéines telles que les hélices α, les feuillets β et les coudes. Ce changement conformationnel est dû à l'interaction électrostatique des PAs avec les polypeptides du PSII via des liaisons hydrogène (H) au niveau des groupes polypeptidiques C=O, C-N et N-H [119,122].

1.11 Problématique

Il est bien établi que le PSI joue un rôle important dans le déroulement des processus photosynthétiques. En effet, ce photosystème assure la production du NADPH nécessaire pour la fixation du CO_2 et dirige aussi le transport cyclique des électrons. Bien que le PSI s'est avéré résistant à de nombreux stress environnementaux, dont la photoinhibition *in vivo* à tempérante ambiante, il devient sensible à basse température. Les connaissances concernant les causes de sa sensibilité restent limitées, mais les études effectuées suggèrent l'inefficacité des mécanismes de sa photoprotection. Toutefois, la tolérance du PSI dans les conditions ambiantes est attribuée à un mécanisme qui n'est pas encore identifié.

D'autre part, l'augmentation de l'accumulation des PAs chez des plantes exposées à différents stress abiotiques constitue une évidence de leur implication dans la réponse de résistance à ces stress. Toutefois, beaucoup de considérations ont été accordées à l'étude du rôle joué par les PAs dans la protection du PSII [108,121], alors que peu d'informations sont connues concernant leurs effets sur le complexe de PSI. De plus, des

recherches approfondies ont été concentrées sur le mode d'interaction de ces PAs avec les polypeptides du complexe PSII [119,123]. Néanmoins, il n'y a pas eu de rapport sur le mode de liaison de PAs avec le complexe de PSI et l'effet de ces interactions sur sa structure et son fonctionnement. Par conséquent, l'étude de l'interaction des PAs avec le PSI est d'une grande importance. Elle permettra de comprendre le mécanisme d'action de ces polycations et leur implication potentielle dans l'amélioration de la résistance du PSI, contre le stress sous conditions physiologiques.

Il est donc pertinent de se questionner sur la nature du mécanisme de résistance du PSI *in vivo* et sur la relation qu'il pourrait y avoir avec l'accumulation de la Spm (et autres PAs) chez les plantes. À quel niveau de la membrane photosynthétique agissent les PAs et comment? Quelles sont les propriétés intrinsèques qui déterminent leur rôle protecteur?

1.12 Hypothèse

Notre hypothèse stipule que la Spm, et la Spd à moindre degré, interagissent directement avec certaines composantes du PSI, probablement près du site de génération des ROSs au niveau du côté accepteur. Cette interaction permet de réduire l'état de stress oxydatif, induit par la photoinhibition, grâce au caractère antioxydant de la Spm. Mais aussi, la Spm pourrait stabiliser les protéines extrinsèques du PSI grâce à des interactions électrostatiques.

1.13 Objectifs spécifiques

- Mise en évidence de la protection de l'activité du PSI par la Spm contre la photoinhibition.
- Détermination des mécanismes impliqués dans la protection et leurs modes d'action.

- Détermination du site d'interaction de la Spm avec les polypeptides du PSI ainsi que la nature de l'interaction et son impact sur l'efficacité de protection contre la photoinhibition.

1.14 Plan de travail

Pour confirmer notre hypothèse, une partie de notre travail a été réalisée sur des extraits de membranes thylacoïdales de plants d'épinards (*Spinacea oleracea L.*) photoinhibés *in vitro* à température ambiante, en l'absence et en présence de concentrations variables de Spm. Des analyses biochimiques et spectroscopiques ont été réalisées afin d'évaluer l'activité du PSI et l'état de stress oxydatif. L'effet de la Spm a été comparé à celui d'autres PAs biogéniques à savoir la Spd et la Put (différentes propriétés physicochimiques). Et pour voir l'effet de la charge positive sur l'efficacité de protection, l'effet de la Spm a été comparé à celui de la diaminodecane (Dd) et la decylamine (Da) : deux PAs artificielles qui ont la même taille que la Spm et diffèrent par leur nombre de charges positives.

Dans une deuxième partie du travail, on a étudié l'effet protecteur de la Spm sur des extraits de membranes enrichies en PSI afin de confirmer ou infirmer l'effet protecteur observé. Ce système simple a été utilisé pour l'analyse de la variation de la structure secondaire des protéines du PSI en présence de Spm grâce à l'absorption en infrarouge par transformée de Fourier. Alors que la localisation du meilleur site de fixation de la Spm dans le complexe du PSI est réalisée grâce à la modélisation moléculaire.

1.15 Références

[1] Moore R., Clark W.D. and Vodopich D.S. (1998) Botany, 2nd edn.

[2] Staehelin L. A. (2005) Chloroplast structure: from chlorophyll granules to supra-molecular architecture of thylakoid membranes. Adv. Photosynth. Resp. 20: 717-728.

[3] www.snv.jussieu.fr/bmedia/Photosynthèse

[4] Dekker J. P. and Boekema E. J. (2005) Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. Biochi. Biophys. Acta 1706: 12-39.

[5] Nelson N. and Ben-Shem A. (2004) The complex architecture of oxygenic photosynthesis. Mol. cell boil. 5: 1-12.

[6] Amunts A., Toporik H., Borovikova A., and Nelson N. (2010) Structure Determination and Improved Model of Plant Photosystem I. J. Biol. Chem. 285 (5) 3478-3486.

[7] Joly D. (2007) Effets des plastoquinones sur la dissipation d'énergie des photosystemes. Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Trois-Rivières.

[8] Croce R., Mozzo M., Morosinotto T., Romeo A., Hienerwadel R. and Bassi R. (2007) Singlet and Triplet State Transitions of Carotenoids in the Antenna Complexes of Higher-Plant Photosystem I. Biochem. 46: 3846-3855.

[9] Scheller H.V., Jensen P.E., Haldrup A., Lunde C. and Knoetzel J. (2001) Role of subunits in eukaryotic photosystem I. Biochim. Biophys. Acta 1507, 41-60.

[10] Jordan P., Fromme P., Witt H.T., Klukas O., Saaenger W. and Krauss N. (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. Nature 411: 909-917.

[11] Schöttler M.A., Albus C.A. and Bock R. (2011) Photosystem I: Its biogenesis and function in higher plants. J. Plant Physiol. 168: 1452-1461.

[12] Ossenbuhl F., Inaba-Sulpice M., Meurer J., Soll J. and Eichacker L.A. (2006) The Synechocystis sp PCC6803 Oxa homolog is essential for membrane integration of reaction center precursor protein pD1. Plant Cell 18: 2236-46.

[13] Amann K., Lezhneva L., Wanner G., Herrmann R.G. and Meurer J. (2004) Accumulation of photosystem 1, a member of a novel gene family, is required for accumulation of [4Fe-4S] cluster-containing chloroplast complexes and antenna proteins. Plant Cell 16: 3084-97.

[14] Shen G., Zhao J., Reimer S.K., Antonkine M.L., Cao Q., Weiland S.M., Golbeck J.H. and Bryant D.A. (2002) Assembly of photosystem I. Inactivation of the rub A gene encoding a membrane-associated rubredoxin in the cyanobacterium Synechococcus sp. PCC7002 causes a loss of photosystem I activity. J. Biol. Chem. 277: 20343-54.

[15] Jagannathan B. and Golbeck J.H. (2009) Understanding of the binding interface between PsaC and the PsaA/PsaB heterodimer in photosystem I. Biochem. 48: 5405-16.

[16] Jagannathan B., Dekat S., Golbeck J.H. and Lakshmi K.V. (2010) The assembly of a multisubunit photosynthetic membrane protein complex: a site-specific spin labelling ETR spectroscopic study of the PsaC subunit in photosystem I. Biochem. 49 (11): 2398-408.

[17] Naver H., Boudreau E. and Rochaix J.D. (2001) Functional studies of Ycf3: its role in assembly of photosystem I and interactions with some of its subunits. Plant Cell 13: 2731-45.

[18] Antonkine M.L., Jordan P., Fromme P., Krauß N., Golbeck J.H. and Stehlik D. (2003) Assembly of protein subunits within the stromal ridge of photosystem I Structural changes between unbound and sequentially PSI-bound polypeptides and correlated changes of the magnetic properties of the terminal iron sulphur clusters. J. Mol. Biol. 327: 671-97.

[19] Kurisu G., Zhang H., Smith J. L. and Cramer W. A. (2003) Structure of the Cytochrome b_6f Complex of Oxygenic Photosynthesis: Tuning the Cavity. Sci. 302: 1009-1014.

[20] Yamashita E., Zhang H. and Cramer W. A. (2007) Structure of the Cytochrome b_6f Complex: Quinone Analogue Inhibitors as Ligands of Heme cn. J. Mol. Biol. 370.

[21] Zhang H., Huang D. and Cramer W.A. (1999) Stoichiometrically bound beta-carotene in the cytochrome b_6f complex of oxygenic photosynthesis protects against oxygen damage. J. Biol. Chem. 274 (1581) 39-52.

[22] Cramer W.A., Zhang H., Yan J., Kurisu G. and Smith J.L. (2006) Trans-membrane traffic in the cytochrome b_6f complex. Annu. Rev. Biochem. 75: 769-790.

[23] Baniulis D., Yamashita E., Zhang H., Hasan S.S. and Cramer W.A. (2008) Structure–Function of the Cytochrome b_6f Complex. Photochem. Photobiol. 84: 1349-1358.

[24] Nagasawa Y., Fujita K., Katayama T., Ishibashi Y., Miyasaka H., Takabe T., Nagao S. and Hirota S. (2010) Coherent dynamics and ultrafast excited state relaxation of blue copper protein; plastocyanin. Phys. Chem. Chem. Phys. 12: 6067-6075.

Rapport-Gratuit.com

[25] Bashir Q., Scanu S. and Ubbink M. (2011) Dynamics in electron transfer protein complexes. FEBS J. 278: 1391-1400.

[26] Ubbink M., Ejdeback M., Karlsson B.G. and Bendall D.S. (1998) The structure of the complex of plastocyanin and cytochrome f, determined by paramagnetic NMR and restrained rigid body molecular dynamics. Struct. 6: 323-335.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

[27] www.biology.arizona.edu/biochemistry/photosynthesis

[28] Govindjee R. (2010): http://www.life.illinois.edu/govindjee/2010_z-scheme.pdf

[29] Taiz L. and Zeiger E. (2010) Plant Physiol. 5th edition, 179.

[30] Bukhov N. and, Carpentier R. (2004) Alternative photosystem I-driven electron transport routes: mechanisms and functions, Photosynth. Res. 82: 17-33.

[31] Shikanai T. (2007) Cyclic electron transport around photosystem I: genetic approaches. Annu. Rev. Plant Biol. 58: 199-217.

[32] Endo T., Shikanai T., Sato F. and Asada K. (1998) NAD(P)H Dehydrogenase-Dependent, Antimycin A-Sensitive Electron Donation to Plastoquinone in Tobacco Chloroplasts. Plant Cell Physiol. 38: 1226-1231.

[33] Joët T., Cournac L., Hovarth E. M., Medgyesy P. and Peltier G. (2001) Increased sensitivity of photosynthesis to antimycin A induced by inactivation of the chloroplast ndhB gene. Evidence for a participation of the NADH-dehydrogenase complex to cyclic electron flow around photosystem I. Plant Physiol. 125: 1919-1929.

[34] Joliot P. and Joliot A. (2002) Cyclic electron transfer in plant leaf. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 10209-10214.

[35] Bendall D.S. and Manasse R.S. (1995) cyclic photophosphorylation and electron transport. Biochim. Biophys. Acta 1229: 23-38.

[36] Joliot P. and Joliot A. (2005) Quantification of cyclic and linear flows in plants. PNAS 102 (13) 4913-4918.

[37] Müller P., Li X.P. and Niyogi K.K. (2001) Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. Plant physiol. 125: 1558-1566.

[38] Asada K. (1999) The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Annu .Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 50: 601-639.

[39] Terashima I., Funayama S. and Sonoike K. (1994) The site of photoinhibition in leaves of Cucumis sativus L. at low temperatures is photosystem I, not photosystem II. Planta 193: 300-306.

[40] Sonoike K., Kamo M., Hihara Y., Hiyama T. and Enami I. (1997) The mechanism of the degradation of PsaB gene product, one of the photosynthetic reaction centre subunits of photosystem I, upon photoinhibition. Photosynth. Res. 53: 55-63.

[41] Tjus S.E., Møller B.L. and Scheller H.V. (1998) Photosystem I is an early target of photoinhibition in barley illuminated at chilling temperatures. Plant Physiol. 116: 755-764.

[42] Havaux M. and Davaud A. (1994) Photoinhibition of photosynthesis in chilled potato leaves is not correlated with a loss of Photosystem- II activity. Preferential inactivation of Photosystem I. Photosynth. Res. 40: 75-92.

[43] Hui Y., Jie W. and Carpentier R. (2000) Degradation of the photosystem I complex during photoinhibition. Photochem. Photobiol 72: 508-512.

[44] Sonoike K. (1995) Selective photoinhibition of photosystem I in isolated thylakoid membranes from cucumber and spinach. Plant Cell Physiol. 36: 825-830.

[45] Terashima I., Noguchi K., Itoh-Nemoto T., Park Y-M., Kubo A. and Tanaka K. (1998) The cause of PSI photoinhibition at low temperatures in leaves of Cucumis sativus, a chilling-sensitive plant. Physiol. Plant. 103: 295-303.

[46] Sonoike K. (1996) Degradation of psaB gene product, the reaction center subunit of photosystem I, is caused during photoinhibition of photosystem I: possible involvement of active oxygen species. Plant Sci. 115: 157-164.

[47] Yaakoubi H. (2015) Université de Quebec à Trois-Rivières.

[48] Ogawa K., Kanematsu S., Takabe K., Asada K. (1995) Attachement of CuZn-superoxide dismutase to thylakoid membranes at the site of superoxide generation (PSI) in spinach chloroplast: detection by immuno-gold labelling after rapid freezing and substitution method. Plant Cell Physiol. 36: 565-573.

[49] Miyake C. and Asada K. (1992) Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. Plant Cell Physiol. 33 (5): 541-553.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

[50] Sonoike K. and Terashima I. (1994) Mechanism of the photosystem I photoinhibition in leaves of Cucumis sativus L. Planta 194: 287-293.

[51] Rajagopal S., Joly D., Gauthier A., Beauregard M. and Carpentier R. (2005) Protective effect of active oxygen scavengers on protein degradation and photochemical function in photosystem I submembrane fractions during light stress, FEBS Lett. 272: 892-902.

[52] Tjus S.E., Møller B.L. and Scheller H.V. (1999) Photoinhibition of photosystem I damages both reaction center proteins PS IA and PS I-B and acceptor-side located small photosystem I polypeptide. Photosynth. Res. 60: 75-86.

[53] Teicher H.B., Møller B.L. and Scheller H.V. (2000) Photoinhibition of photosystem I in field-grown barley (Hordeum vulgare L.): induction, recovery and acclimation. Photosynth. Res. 64: 53-61.

[54] Kudoh H. and Sonoike K. (2002) Irreversible damage to photosystem I by chilling in the light: cause of the degradation of chlorophyll after returning to normal growth temperature. Planta 215: 541-548.

[55] James S.A. and Bell D.T. (2000) Leaf orientation, light interception and stomatal conductance of Eucalyptus globules ssp. Globules leaves. Tree Physiol. 20: 815-823.

[56] Takahashi S. and Badger M.R. (2011) Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. Trends Plant Sci. 16(1): 53-60.

[57] Jiang C.D., Gao H.Y., Zou Q., Jiang G.M. and Li L.H. (2006) Leaf orientation, photorespiration and xanthophyll cycle protect young soybean leaves against high irradiance in field. Environ. Exp. Bot. 55: 87-96.

[58] Havaux M. and Niyogi K.K. (1999) The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 8762-8767.

[59] Klimmek F., Ganeteg U., Ihalainen J.A., van Roon H., Jensen P.E., Scheller H.V., Dekker J.P. and Jansson S. (2005) The structure of higher plant LHCI-*in vivo* characterization and structural interdependence of the Lhca proteins. Biochem. 44: 3065-3073.

[60] Carbonera D., Agostini G., Morosinotto T. and Bassi R. (2005) Quenching of chlorophyll triplet states by carotenoids in reconstituted Lhca4 subunit of peripheral light-harvesting complex of photosystem. Biochem. 44: 8337-8346.

[61] Bukhov N.G. and Carpentier R. (2003) Measurement of photochemical quenching of absorbed quanta in photosystem I of intact leaves using simultaneous measurements of absorbance changes at 830 nm and thermal dissipation. Planta, 216: 630-638.

[62] Rajagopal S., Bukhov N.G., Tajmir-Riahi H.A. and Carpentier R. (2003) Control of energy dissipation and photochemical activity in photosystem I by NADP-dependent reversible conformational changes. Biochem. 42: 11839-11845.

[63] Krieger-liszkay A., Kienzler K. and Johnson G.N. (2000) Inhibition of electron at the cytochrome b_6f complex protects photosystem II from photoinhibition. FEBS Lett. 486: 191-194.

[64] Sonoike K. (2011) Photoinhibition and Protection of Photosystem I. Physiol. Plant. 142: 56-64.

[65] Govindachary S., Bigras C., Harnois J., Joly D. and Carpentier R. (2007) Changes in the mode of electron flow to photosystem I following chilling-induced photoinhibition in a C3 plant, Cucumis sativus L, Photosynth. Res. 94: 333-345.

[66] Li X.G., Xu P.L., Zhao J.P., Meng J.J. and He Q.W. (2006) Ferredoxin-quinone reductase benefits cyclic electron flow around photosystem 1 in tobacco leaves upon exposure to chilling stress under low irradiance. Photosynthetica 44: 349-354.

[67] Nakano R., Ishida H., Kobayashi M., Makino A. and Mae T. (2010) Biochemical changes associated with *in vivo* RbcL fragmentation by reactive oxygen species under chilling-light conditions. Plant Biol. 12: 35-45.

[68] Rajagopal S. and Carpentier R. (2003) Retardation of photo-induced changes in Photosystem I submembrane particles by glycinebetaine and sucrose. Photosynth. Res. 78(1): 77-85.

[69] Bouchereau A., Aziz A., Larher F. and Martin-Tanguy J. (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. Plant Sci. 140: 103-125.

[70] Unal D., Tuney I. and Sukatar A. (2008) The role of external polyamines on photosynthetic responses, lipid peroxidation, protein and Chlorophyll a content under the UV-A (352 nm) stress in Physcia semipinnata, J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 90: 64-68.

[71] Martin-Tanguy J. (2001) Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). Plant Growth Regul. 34: 135-148.

[72] Voigt J. and Bohley P. (2000) Cell-cycle dependent regulation of ornithine decarboxylase activity in the unicellular green alga Chlamydomonas reinhardtii. Physiol. Plant 110: 419-425.

[73] Theiss C., Bohley P. and Voigt J. (2002) Regulation by Polyamines of Ornithine Decarboxylase Activity and Cell Division in the Unicellular Green Alga Chlamydomonas reinhardtii. Plant Physiol.128: 1470-1479.

[74] Thomas T., Thomas T.J. (2001) Polyamine in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. Cell Mol. Life. Sci. 58: 244-258.

[75] Tiburcio A.F., Besford R.T., Capell T., Borrell A., Testillano P.S. and Risueño M.C. (1994) Mechanisms of polyamine action during senescence responses induced by osmotic stress, J. Exp. Bot. 45: 1789-1800.

[76] Takahashi T. and Kakehi J.I. (2010) Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. Ann. Bot. 105: 1-6, 2010.

[77] Borrell A., Bestford T., Altabella T., Masgrau C. and Tiburcio A.F. (1996) Regulation of arginine decarboxylase by spermine in osmotically-stressed oat leaves. Physiol. Plant. 98: 105-110.

[78] Bagni N. and Tassoni A. (2001) Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. Amino Acids 20: 301-317.

[79] Kumar A., Altabella T., Taylor MR. and Tiburcio A.F. (1997) Recent advances in polyamine research. Trends Plant Sci. 2: 124-130.

[80] Del Duca S., Beninati S. and Serafini-Fracassini D. (1995) Polyamines in chloroplasts: identification of their glutamyl and acetyl derivatives. Biochem. J. 305: 233-237.

[81] Sobieszczuk-Nowicka E., Wieczorek P. and Legocka J. (2009) Kinetin affects the level of chloroplast polyamines and transglutaminase activity during senescence of barley leaves. Acta Biochim. Pol 56: 255-259.

[82] Della Mea M., Di Sandro A., Dondini L., Del Duca S., Vantini F., Bergamini C., Bassi R. and Serafini-Fracassini D. (2004) A Zea mays 39-kDa thylakoid transglutaminase catalyses the modification by polyamines of light-harvesting complex II in a light-dependent way, Planta 219: 754-764.

[83] Mapelli S., Brambilla I.M., Radyukina N.L., Ivanov Y.V., Kartashov A.V., Reggiani R. and Kuznetsov Vl.V. (2008) Free and bound polyamines changes in different plants as a consequence of UV-B light irradiation. Gen. Appl. Plant Physiol. 34: 55-66.

[84] Liu J.H., Kitashiba H., Wang J., Ban Y. and Moriguchi T. (2007) Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. Plant Biotechnol. 24: 117-26.

[85] Cona A., Rea G., Angelini R., Federico R. and Tavladoraki P. (2006) Functions of amine oxidases in plant development and defence. Trends Plant Sci. 11: 80-88.

[86] Gemperlova L., Novakova M., Vankova J. Eder R. and Cvikrova M. (2006) Diurnal changes in polyamine content, arginine and ornithine decarboxylase, and diamine oxidase in tobacco leaves, J.Exp. Bot. 57 (6): 1413-1421.

[87] Shantz L.M. and Pegg A.E. (1999) Translational regulation of ornithine decarboxylase and other enzymes of the polyamine pathway. The International Journal of Biochemistry and Cell Biol. 31: 107-122.

[88] Galston A.W.and Sawhney R.K. (1990) Polyamines in plant physiology. Plant Physiol. 94(2): 406-10.

[89] Aldesuquy H., Baka Z. and Mickky B. (2014) Kinetin and spermine mediated induction of salt tolerance in wheat plants: Leaf area, photosynthesis and chloroplast ultrastructure of flag leaf at ear emergence. Egypt. J. basic Appl. Sci. 1: 77-87.

[90] Groppa M.D. and Benavides M.P. (2008) Polyamines and abiotic stress: recent advances. Amino Acids 34: 35-45.

[91] Shen W., Nada K. and Tachibana S. (2000) Involvement of polyamines in the chilling tolerance of cucumber cultivars. Plant Physiol. 124: 431-439.

[92] Groppa M.D. and Benavides M.P. and Tomaro M.L. (2003) Polyamine metabolism in sunflower and wheat leaf discs under cadmium or copper stress. Plant Sci. 164: 293-299.

[93] Cheng L., Zou Y., Ding S., Zhang J., Yu X., Cao J. and Lu G. (2009) Polyamine Accumulation in Transgenic Tomato Enhances the Tolerance to High Temperature Stress. J. ıntegrative Plant Biol. 51: 489-99.

[94] Velikova V., Yordanov I. and Edreva A. (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. Plant Sci. 151: 59-66.

[95] Navakouidis E., Lütz C., Langebartels C., Lütz-Meindl U. and Kotzabasis K. (2003) Ozone impact on the photosynthetic apparatus and the protective role of polyamines. Bioch. Biophys. Acta. 1621: 160-169.

[96] Wang X., Shi G., Xu Q., and Hu J, (2007) Exogenous polyamines enhance copper tolerance of Nymphoides peltatum. J. Plant Physiol. 164 (8) 1062-1070.

[97] Gill S.S. and Tuteja N. (2010) Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. Plant Signal. Behav. 5: 1, 26-33.

[98] Hao Y.J., Kitashiba H., Honda C., Nada K. and Moriguchi T. (2005) Expression of arginine decarboxylase and ornithine decarboxylase genes in apple cells and stressed shoots. J. Exp. Bot. 56: 1105-1115.

[99] Jang S.J., Wi S.J., Choi Y.J., An G. and Park K.Y. (2012) Increased polyamine biosynthesis enhances stress tolerance by preventing the accumulation of reactive oxygen species: T-DNA mutational analysis of Oryza sativa lysine decarboxylase-like protein 1. Mol. Cells 34: 251-262.

[100] Liu J.H., Nada K., Honda C., Kitashiba H., Wen X.P., Pang X.M. and Moriguchi T. (2006) Polyamine biosynthesis of apple callus under salt stress: importance of arginine decarboxylase pathway in stress response. J. Exp. Bot. 57: 2589-2599.

[101] Alcázar R., Cuevas J.C., Patron M., Altabella T. and Tiburcio A.F. (2006) Abscisic acid modulates polyamine metabolism under water stress in Arabidopsis thaliana. Physiol. Plant. 128: 448-455.

[102] Capell T., Bassie L. and Christou P. (2004) Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 9909-9914.

[103] Roy M. and Wu R. (2002) Overexpression of S-adenosylmethionine decarboxylase gene in rice increases polyamine level and enhances sodium chloride-stress tolerance. Plant Sci. 163: 987-992.

[104] Duan H.G., Yuan S., Liu W.J., Xi D.H., Qing D.H., Liang H.G. and Lin H.H. (2006) Effects of exogenous spermidine on photosystem II of wheat seedlings under water stress, J. Integr. Plant Biol. 48: 920-927.

[105] Verma S. and Mishra S.N. Putrescine alleviation of growth in salt stressed Brassica juncea by inducing antioxidative defense System. J. Plant Physiol. 2005; 162: 669-77.

[106] Hu L., Xiang L., Zhang L., Zhou X., Zou Z. and Hu X. (2014) The photoprotective role of spermidine in tomato seedlings under salinity-alkalinity stress. PLOS ONE 9 (10): 1-9.

[107] Ioannidis N.E., Sfichi L. and Kotzabasis K. (2006) Putrescine stimulates chemiosmotic ATP synthesis. Biochim. Biophys. Acta: Bio. 1757: 821-8.

[108] Logothetis K., Dakanali S., Ioannidis N. and Kotzabasis K. (2004) The impact of high CO_2 concentrations on the structure and function of the photosynthetic apparatus and the role of polyamines, J. Plant Physiol. 161: 715-724.

[109] Sfakianaki M., Sfichi L. and Kotzabasis K. (2006) The involvement of LHCII-associated polyamines in the response of the photosynthetic apparatus to low temperature, J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 84: 181-188.

[110] Ioannidis N.E. and Kotzabasis K. (2007) Effects of polyamines on the functionality of photosynthetic membrane *in vivo* and *in vitro*, Biochim. Biophys. Acta 1767: 1372-1382.

[111] Yiu J.C., Juang L.D., Fang D.Y. T., Liu C.W. and Wu S.J. (2009) Exogenous putrescine reduces flooding-induced oxidative damage by increasing the antioxidant properties of Welsh onion. Scientia Horticult. 120 (3): 306-314.

[112] Zhang W., Jiang B., Li W., Song H., Yu Y. and Chen J. (2009) Polyamines enhance chilling tolerance of cucumber (Cucumis sativus L.) through modulating antioxidative system. Scientia Horticult. 122: 200-208.

[113] Besford T., Richardson C.M., Campos J.L. and Tiburcio A.F. (1993) Effect of polyamines on stabilization of molecular complexes in thylakoid membranes of osmotically stressed oat leaves. Planta 189: 201-206.

[114] Stoynova E.Z., Karanov E.N. and Alexieva V. (1999) Subcellular aspects of the protective effect of spermine against atrazine in pea plants. Plant Growth Regul. 29: 175-180.

[115] Standfuss J., Van Scheltinga A.C.T., Lamborghini M. and Kuhlbrandt W. (2005) Mechanisms of photoprotection and non photochemical quenching in pea light harvesting complex at 2.5 A resolution, EMBO J. 24: 919-928.

[116] Balestreri E., Cioni P., Romagnoli A., Bernini S., Fissi A. and Felicioli R. (1987) Mechanism of polyamine inhibition of a leaf protease. Arch. Biochem. Biophys. 255(2): 460-3.

[117] Kotzabasis K., Fotinou C., Roubelakis-Angelakis K.A. and Ghanotakis D. (1993) Polyamines in the photosynthetic apparatus, Photosynth. Res. 38: 83-88.

[118] Hamdani S., Yaakoubi H. and Carpentier R. (2011 Review) Polyamines interaction with thylakoid proteins during stress. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 104: 314-319.

[119] Beauchemin R., Harnois J., Rouillon R., Tajmir-Riahi H.A. and Carpentier R. (2007) Interaction of polyamines with proteins of photosystem II: cation binding and photosynthetic oxygen evolution, J. Mol. Struct. 833: 169-174.

[120] Beauchemin R., Gautier A., Harnois J., Boisvert S., Govidachary S. and 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 QA to QB, Biochim. Biophys. Acta 1767: 905-912.

[121] Hamdani S., Gauthier A., Msilini N. and Carpentier R. (2011) Positive charges of polyamines protect PSII in isolated thylakoid membranes during photoinhibitory conditions. Plant Cell Physiol. 52(5): 866-873.

[122] Hamdani S., Tajmir-Riahi H.A. and Carpentier R. (2009) Methylamine interaction with proteins of photosystem II: a comparison with biogenic polyamines, J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 96: 201-206.

[123] Bograh A., Gingras Y., Tajmir-Riahi H.A. and Carpentier R. (1997) The effects of spermine and spermidine on the structure of photosystem II proteins in relation to inhibition of electron transport, FEBS Lett. 402: 41-44.

CHAPITRE II

PROTECTIVE ACTION OF SPERMINE AND SPERMIDINE AGAINST PHOTOINHIBITION OF PHOTOSYSTEM I IN ISOLATED THYLAKOID MEMBRANES

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en anglais dans la revue PLOS ONE, 2014, 9(11).

2.1 Résumé

Le but spécifique de ce chapitre est d'étudier l'action protectrice de deux polyamines biogéniques qui sont la spermine (Spm) et la spermidine (Spd), et de déterminer leurs mécanismes d'action potentiels dans la photo-stabilité du photosystème I (PSI). Pour cette raison, l'activité de PSI a été mesurée dans des membranes des thylakoïdes isolées puis exposées à de fortes intensités de lumière, en l'absence et en présence de différentes concentrations de Spm et de Spd. Nos résultats montrent que le prétraitement des membranes de thylacoïdes avec Spm et Spd réduit considérablement l'inhibition de la consommation d'oxygène, les taux de photo-oxydation de P700 et l'accumulation des ions superoxydes (O_2^-) induits par le stress lumineux. La Spm semble être plus efficace que la Spd dans la préservation de la photo-stabilité du PSI. La corrélation entre les niveaux de la protection du PSI, l'inhibition du photosystème II (PSII) et l'inhibition de la génération des O_2^- a révélé que la photo-protection du PSI est assurée par deux mécanismes qui dépendent de la concentration de la polyamine ajoutée. Compte tenu de leur caractère antioxydant, ces polyamines peuvent éliminer directement les O_2^- générés dans la solution de membranes thylacoïdales. Le rôle antioxydant a été observé à une concentration physiologique (1 mM). Cependant, pour les concentrations d'ordre non physiologique la capacité des polyamines à protéger le PSI est due à leur effet inhibiteur sur le transfert des électrons au niveau du PSII.

Rapport-Gratuit.com

2.2 Premier article scientifique

Protective action of spermine and spermidine against photoinhibition of photosystem I in isolated thylakoid membranes

Hnia **Yaakoubi**, Saber **Hamdani**, Laurent **Bekale** and Robert **Carpentier***

Groupe de Recherche en Biologie-Végétale, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Qc, G9A 5H7, Canada

*To whom correspondence should be addressed. e-mail: Robert.Carpentier@uqtr.ca.

ABSTRACT

The photo-stability of photosystem I (PSI) is of high importance for the photosynthetic processes. For this reason, we studied the protective action of two biogenic polyamines (PAs) spermine (Spm) and spermidine (Spd) on PSI activity in isolated thylakoid membranes subjected to photoinhibition. Our results show that pre-loading thylakoid membranes with Spm and Spd reduced considerably the inhibition of O_2 uptake rates, P700 photooxidation and the accumulation of superoxide anions (O_2^-) induced by light stress. Spm seems to be more effective than Spd in preserving PSI photo-stability. The correlation of the extent of PSI protection, photosystem II (PSII) inhibition and O_2^- generation with increasing Spm doses revealed that PSI photo-protection is assumed by two mechanisms depending on the PAs concentration. Given their antioxidant character, PAs scavenge directly the O_2^- generated in thylakoid membranes at physiological concentration (1 mM). However, for non-physiological concentration, the ability of PAs to protect PSI is due to their inhibitory effect on PSII electron transfer.

INTRODUCTION

Plant productivity is highly dependent on the integrity of the photosynthetic apparatus. In the thylakoid membranes, the apparatus is composed mainly of 4 supra-molecular protein complexes: photosystem II (PSII), photosystem I (PSI), cytochrome b_6/f (Cyt b_6/f) and ATP synthase. These complexes are responsible for the photochemical transformation of light energy into chemical energy resulting into the production of NADPH and ATP possessing high reducing power. Excitation of PSII with light produces electrons, protons and oxygen *via* water oxidation. The electrons are transferred to PSI through the transporters of the thylakoid membranes to reduce $NADP^+$. In addition, the protons are used by ATP synthase for adenosine triphosphate (ATP) formation [1]. NADPH and ATP are then used to assimilate CO_2 for sugar production *via* Calvin-Benson cycle.

However, excess light may affect photosynthetic processes such as the rate of electron-transport, oxygen evolution, and ATP production [2-6]. The damaging effect of light on photosynthetic activity is known as the photoinhibition process (PI). It is well established that the two photosystems may be targets for PI *in vivo* and *in vitro* under various environmental conditions. It was reported that PSI is more resistant at ambient temperature; the mechanism of this resistance is not yet well understood [7-13]. Although PSII is known to be more sensitive than PSI, it has been demonstrated that the inhibition of PSI is more deleterious to plants. This is not only due to the slow rate of its recovery but also due to its involvement in PSII repair as PSI is thought to provide the proton gradient required for ATP synthesis [14-16].

To avoid the strong damaging effects of light on photosynthetic membranes, plants have developed several protective mechanisms involving physical (alteration of leaf blade orientation), physiological (non-photochemical quenching) and biochemical changes (e.g, accumulation of enzymatic and non-enzymatic antioxidants) [5,17-21]. Therefore, understanding these survival mechanisms presents a broad bearing on many fields including the development of photo-resistant plants. Nowadays, it is well known that oxidative stress constitutes the most important factor of the PI [22-24]. During this

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

process, light, oxygen and electron transport induce the production of reactive oxygen species (ROSs) such as singlet oxygen ($^1O_2$), superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical ($OH^{\cdot}$). These species are mainly generated in PSI, but their damaging effects were observed even at the PSII level [15]. The oxidative stress may induce functional and/or structural modification of thylakoid membrane proteins to engender their damage [15,22,25,26]. The most important line of defense against the oxidative stress implicates the enzymatic antioxidant system called water-water cycle [27]. This cycle is composed of several reactions which scavenge $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2. It involves the enzymes superoxide dismutase (SOD) and ascorbate peroxidase (APX), two enzymes located in the stroma and in the acceptor side of PSI [28,29].

Recently, it has been observed that plants significantly increase the amount of various polyamines (PAs), such as spermine (Spm), spermidine (Spd) and putrescine (Put), under stress conditions [30-33]. For example, chilling temperatures can stimulate the S-adenosylmethionine decarboxylase, an enzyme implicated in PAs synthesis. The enhancement of PAs levels under stressful conditions may decrease plant susceptibility to photoinhibition [34]. Biogenic PAs are produced in the chloroplast and occur under free or conjugated forms [35,36]. The conjugation of PAs is catalyzed by an enzyme named transglutaminase. This enzyme catalyses the incorporation of PAs into thylakoid and stromal proteins such as the light harvesting complex (LHC) and the large subunit of Rubisco [27,38,39]. Recently, Hamdani *et al.* [40] have investigated the beneficial role of some amines (Spm, Put and methylamine) as photo-protectors of PSII *in vitro*. It was found that only Spm showed photo-protective effect. This finding is considered important in understanding the mechanism of plant photo-adaptation in the presence of Spm. As PSI is also susceptible to photoinhibition under some conditions, it is reasonable to assume that PAs such as Spm could also exert a protective function against PSI photoinhibition. It is, therefore, of interest to determine the specific effect and to elucidate the photo-protective mechanism of these PAs.

The protective action of PAs against various stresses such as salt stress, UV-B radiation, ozone, heavy metal, or osmotic stress, is largely reported in the literature

[41-45]. Most of these studies suggested that PAs protected plant cells *via* a direct interaction with their components or indirectly *via* its antioxidant role. However, the mechanism of their action is not yet fully understood. We provide here an insight on the mode of action of these PAs in protecting PSI activity in isolated thylakoid membranes. The measurements of electron transport, P700 photooxidation, and O_2^- accumulation have been carried out to assess the effect of two PAs, with different positive charges and carbon chain, namely Spm and Spd on thylakoid membranes subjected to high light intensities. The structure of the two PAs is presented below:

$^+H_3N - (CH_2)_3 - NH_2^+ - (CH_2)_4 - NH_3^+$

Spermidine

$^+H_3N - (CH_2)_3 - NH_2^+ - (CH_2)_4 - NH_2^+ - (CH_2)_3 - NH_3^+$

Spermine

The results of this study showed that the activity of electron transport in PSI was significantly protected by the addition of these PAs even below 1 mM. The photo-protective effect increased with PAs concentration to reach a maximum at 7 mM. We also observed that the generation of O_2^- in thylakoid membrane preparations was considerably reduced in the presence of the two PAs.

MATERIALS AND METHODS

Thylakoid membranes isolation

Thylakoid membranes were isolated from fresh market spinach (Spinacia oleracea L.). Dark-adapted leaves were homogenized in a Tricine-NaOH buffer (50 mM pH 7.6) containing 400 mM sorbitol, 10 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$ and 0.1% ascorbic acid. The suspension was filtered with miracloth tissue and centrifuged at 2550 g for 7 min. The pellet was then suspended in a same homogenization medium but without

sorbitol. Then the pellet was washed with MES-NaOH solution (20 mM, pH 6.2) containing 15 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, and centrifuged for 7 min at 2550 g and 4°C. Finally, the pellet was resuspended in Hepes-NaOH buffer (20 mM, pH 7.6) containing 400 mM sucrose, 10 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$ and 20 mM KCl [46]. The final thylakoid membranes preparation was kept in the dark, and chlorophyll (Chl) concentration was calculated following the procedure outlined in Porra *et al.* [47].

Photoinhibitory treatment and polyamines addition

The samples of thylakoid membranes, at 500 μg Chl mL^{-1}, were suspended in an assay medium containing 20 mM Hepes-NaOH (pH 7.6), 20 mM KCl, 10 mM NaCl and 2 mM $MgCl_2$. Then, Spm or Spd solution was added at different concentrations. After few minutes, the samples were illuminated by an intense white light (2000 μmol of photons m^{-2} s^{-1}) from a 150 W quartz-halogen projector lamp for 30 min with continuous stirring at 24°C controlled by water-bath.

Oxygen uptake rates

The PSI activity was estimated by the measure of oxygen uptake rates in thylakoid membranes using an Oxylab system (Hansatech Instruments, Norfolk, England) at 24°C as described by Carpentier *et al.* [48]. The electrode chamber contained two compartments separated by a cellophane membrane. The activity of PSI was measured with $DCPIPH_2$ (2,6-dichlorophenol indophenol) as electron donor and methyl viologen (MV) as a final electron acceptor. The assay medium was composed of the samples of thylakoid membranes pre- or un-illuminated, at a final Chl concentration of 10 μg mL^{-1}, 20 mM Tricine-KOH (pH 7.8), 10 mM KCl, 10 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 50 μM 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU), 500 μM MV, 1 mM NaN_3, 1 mM Na-ascorbate and 100 μM DCPIP. The reaction mixture was constantly stirred with a magnetic stirrer. After 1-min incubation, the reaction mixture was illuminated using a 150 W quartz-halogen projector lamp (500 μmol of photons m^{-2} s^{-1}). The PSI activity

was expressed in terms of μmol of oxygen consumed per mg Chl per hour (mg Chl-^{1} h-^{1}).

Oxygen evolvement rates

Oxygen evolution by PSII in thylakoid membranes was measured using an Oxylab system at 22°C. The samples were prepared in a buffer containing 20 mM MES-NaOH (pH 6.3), 1 mM NaCl, 0.5 mM $MgCl_2$, 0.35 mM 2,6-dichlorobenzoquinone as a PSII electron acceptor. Thylakoid membranes pre-incubated or not with Spm or Spd were added to the buffer at the concentrations of 25 μg Chl mL^{-1}. The reaction mixture was illuminated with saturating light and the rates of oxygen evolved were measured. The results were expressed as the percentage of PSII inhibition.

P700 photooxidation

P700 photooxidation was monitored in thylakoid membranes as light-induced absorbance changes at 820 nm at room temperature using the dual wavelength emitter detector ED-P700DW connected via a PAM-101 fluorometer (Walz). The ED-P700DW unit detects strictly the differential absorbance changes between 810 and 860 nm peaking at 820 nm ascribed to the $P700^{+}$ radical absorption and removes the plastocyanin absorbance changes. Far-red light (78 μmol m^{-2} s^{-1}), that preferentially excites PSI 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 assay medium contained 20 mM Hepes-NaOH (pH 7.6), 20 mM KCl, 10 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$ and 500 μg Chl mL^{-1}. The measurements were performed in the presence of 100 μM DCMU and 50 μM MV to avoid reduction of P700 by linear electron flow coming from PSII during measurements and to prevent charge recombination between $P700^{+}$ and reduced acceptor side, respectively.

Superoxide anions generation

The generation of superoxide anions was estimated by the reduction of nitro blue tetrazolium (NBT) according to Beauchamp and Fridovich [49]. The NBT photo-reduction assay was modified for use with photosynthetic membranes. Samples of thylakoid membranes pre-incubated or not with different Spm and Spd concentrations in Hepes-NaOH buffer (pH 7.6, containing 20 mM KCl, 10 mM NaCl and 2 mM $MgCl_2$), were mixed with 0.5 mM NBT solution. Upon illumination of the mixture at 24°C the thylakoids generated the $O_2^{\cdot-}$ that reduces the NBT. The reduction of the yellow NBT resulted in its transformation into the purple formazan. This reaction is called $O_2^{\cdot-}$-dependent NBT reduction. An aliquot of the un-illuminated or illuminated preparation was diluted with the Hepes-NaOH buffer and the changes in optical density (OD) were followed at 560 nm. The increase in the rates of NBT photo-reduction reflected the accumulation of $O_2^{\cdot-}$ generated in the mixture.

RESULTS

Protective effect of polyamines on photo-damage of photosystem I

Effect of Spm and Spd on oxygen uptake rates

To investigate the effect of intense white light and two PAs on PSI activity, the oxygen uptake rates were measured in isolated thylakoid membranes exposed to strong illumination in the absence or presence of Spm or Spd. Reduced DCPIP was used as an artificial electron donor and MV as an electron acceptor. As shown in Fig. 1A (curve Ctrl), the initial oxygen uptake rate measured in control thylakoid membranes was estimated to 525 μmol oxygen consumed mg Chl^{-1} h^{-1}. The rates of O_2 uptake gradually decreased during the period of illumination. The loss of PSI activity was observed from the first minutes of irradiance and was reduced by 61% after 15 min of illumination and by 76% after 30 min. This inhibition of O_2 uptake indicated the perturbation of electron transport through the thylakoid membranes and the dysfunction of PSI complexes [11,50,51]. Fig. 1A also shows the measured O_2 uptake rates in thylakoid membranes

preloaded with normal and supra-physiological concentrations of Spm (1 and 2 mM) and subjected to photoinhibition. The presence of Spm, a tetra-amine with four positive charges, reduced the inhibition of O_2 uptake rates compared to photoinhibited control. After 30 minutes of illumination, the photoinhibition of PSI declined from 76% to 67% with 1 mM and to 60% with 2 mM (Fig. 1A, inset). The photo-protection was greater with 2 mM Spm than for 1 mM. It is clear that the addition of exogenous Spm in thylakoid membranes provided a protection to PSI against photoinhibition *in vitro*. This result prompted us to investigate the response of PSI activity to increasing Spm doses.

To determine the concentration dependence of Spm that protected PSI activity, O_2 uptake rates were measured in samples photoinhibited in the presence of increasing doses of Spm. Surprisingly, the rates of O_2 uptake remaining after photoinhibition greatly increased with Spm concentration (Fig. 1B). The maximal protective effect of Spm was reached at a non-physiological concentration, i.e, 7 mM. Above that dose, the rates of O_2 uptake decreased (data not shown).

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

The comparison of the effect of Spm to that of Spd, a tri-amine with three positive charges (Fig. 1B), showed that Spd also protected the O_2 uptake rates in a dose dependent manner (Fig. 1B). However, the protective action of Spd was not as strong as for Spm. The photo-protection of O_2 uptake rates at 7 mM by Spm and Spd was near 70% and 50%, respectively.

It is interesting to note that the addition of Spm exerted a slight stimulatory effect on PSI activity in control samples even in dark (data not shown). This stimulation is generally significant for Spm concentrations above 3 mM and reached 16% at 7 mM Spm. Given that PSI activity is dependent on pH variation and the optimal activity is reached at about pH 9 [52,53], the rise of pH in the thylakoid solution due to the presence of high doses of PAs increased PSI activity in control sample. Nevertheless, this Spm-induced stimulatory effect stayed much weaker compared to the photo-protective effect (Fig. S1).

Action of Spm and Spd on P700 photooxidation

To gain more information on the effect of strong white light and PAs (Spm and Spd) on PSI reaction centers, we analyzed the P700 photooxidation. The oxidation kinetics of P700 was measured in thylakoid membranes exposed to photoinhibition in the absence or presence of different concentrations of the two PAs (Fig. 2). The kinetics of the control sample (Fig. 2A, curve Ctrl) showed a fast initial photooxidation phase, which occurred within 0.65 s, leading to a prolonged steady-state phase. This curve represents the maximum photooxidizable P700 population obtained in the presence of DCMU and MV. When compared to the control, the photoinhibited samples (Fig. 2A, curve PI) showed a slower initial phase of photooxidation kinetics and the P700 oxidation reached its maximum after 3.7 s. The addition of 1 mM Spm increased significantly the rate of P700 photooxidation observed after photoinhibition (Fig. 2A, curve PI+Spm). The effect of Spd was less significant than that of Spm (Fig. 2A, curve PI+Spd).

Fig. 2B illustrates the amount of active P700 (ΔA 820 nm): the fraction that can be photooxidized. It shows a strong decrease of active P700 in photoinhibited samples (Fig. 2B, PI+0) compared to the control. It should be mentioned that photooxidizable P700 (%) in both PI+0 samples is supposed to be same, but the observed small variation is due to the use of different extracts of thylakoid membranes. However, increasing the doses of both Spm and Spd reduced the loss of active P700 compared to photoinhibited samples. Strikingly, at 7 mM Spm, almost whole population of photooxidizable P700 was preserved against the strong illumination (Fig. 2B, PI+7). In contrast, the protective effect of Spd on the level of $P700^+$ cation radical increased slowly compared to Spm in the range between 1-3 mM. A strong protective effect was observed above 5 mM. As observed with the O_2 uptake rates, Spm was more effective than Spd in protecting PSI reaction center under photoinhibitory treatment.

Inhibition of $O_2^{\cdot-}$ generation by Spm and Spd

The possible decrease in the generation of $O_2^{\cdot-}$ (the first precursor for the generation of H_2O_2 and $OH^{\cdot}$) at the PSI acceptor side in the presence of PAs was investigated using NBT as an $O_2^{\cdot-}$ chemical sensor. The measurements of NBT reduction, monitored as changes in optical density at 560 nm, were carried out for control or PAs-pretreated thylakoid membranes. It should be mentioned that a slight NBT reduction (OD 560 nm = 0.010-0.015) was observed in the dark upon NBT addition to the thylakoid membranes incubated or not with PAs. The increase of OD 560 nm in the dark may be explained by a direct reduction of NBT by thylakoid membrane components *via* an $O_2^{\cdot-}$-independent pathway. This process is usually observed with biological membranes that contain some electron-transferring components that reduce NBT directly [49]. However, under illumination, the $O_2^{\cdot-}$-dependent NBT reduction strongly dominates. To determine the $O_2^{\cdot-}$-dependent NBT reduction, the values measured in the dark were subtracted from the values of the corresponding illuminated sample. The kinetics of NBT photo-reduction in thylakoid membranes photoinhibited either without (Ctrl) or with PAs (Spm and Spd) are presented in Fig. 3. Our results showed an enhancement of the NBT photo-reduction in the photoinhibited sample (Ctrl) with increasing irradiation time, indicating the generation of the superoxide anions. In the control sample, the superoxide anions are formed at an initial rate of 9.44×10^{-2} min^{-1}. The rapid $O_2^{\cdot-}$ generation explained the loss of PSI activity in the thylakoid membranes under photoinhibition. However, when exogenous Spm (1 mM) was added to the thylakoid solution, the rate of $O_2^{\cdot-}$ generation was reduced from 9.44×10^{-2} to 6.99×10^{-2} min^{-1} (26%). Under the same conditions, 1 mM of Spd reduced the NBT photo-reduction rate by 13.5% (8.17×10^{-2} min^{-1}). The inhibition of the NBT photo-reduction by PAs revealed their $O_2^{\cdot-}$ scavenging character. This result also indicates that Spm is more effective in reducing the $O_2^{\cdot-}$ accumulation than Spd.

Rapport-Gratuit.com

Correlation between PSI photo-protection, PSII inhibition and O_2^- generation by Spm and Spd

Given that Spm and Spd affect negatively PSII electron transfer in PSII sub-membrane fractions [54], their effect on PSII activity in thylakoid membranes and their consequences on PSI photo-protection were also studied. To estimate the effect of Spm on PSII activity, thylakoid membranes were incubated with different PAs concentrations in the dark and the inhibition of PSII activity is shown in Fig. 4A. The response of PSII shows that the normal Spm dose (1 mM) did not exert a negative effect on the PSII photochemical activity but, in the contrary, it slightly increased the PSII activity (≈5%). However, when the added Spm exceeded 1.5 mM, PSII inhibition progressively increased and the total inhibition was observed at about 6-7 mM.

The correlation of PSII inhibition and PSI protection as expressed in terms of P700 photooxidation and O_2 uptake with Spm is illustrated in Fig. 4A. The results allowed us to differentiate two phases with regard to inhibition of PSII activity. The first one is observed for doses below 1.5 mM where the PSII activity is not greatly affected while the PSI photo-protection readily increases. This effect of Spm on PSI activity may be ascribed to the O_2^- scavenging action as observed by the decrease of the rate of O_2^- production (Fig. 3). The second phase is observed for the concentrations higher than 1.5 M Spm and may be divided into two parts: (i) for doses between 1.5-3 mM, the loss of PSII activity and the protection of P700 photooxidation increased, but the latter stayed more prominent than the PSII inactivation, (ii) for Spm doses higher than 3 mM, the inhibition of PSII electron transport and the protection of P700 photooxidation were closely similar. On the other hand, the protection of PSI activity measured as O_2 uptake rates also increased with the Spm added doses, but not to the same extent as P700 oxidation. These results suggest that Spm, depending on its concentration, can protect PSI against PI by two different mechanisms: scavenging O_2^- and by regulating PSII electron transfer.

To better estimate the Spm concentration range for these mechanisms, we measured NBT photo-reduction to determine the O_2^- generated in the presence of

different Spm doses (Fig. 4B). The results show that the initial rate of $O_2^{\cdot}$ production displayed a complex response depending on the concentration of Spm. When the doses of Spm were below 1 mM, a significant decrease in the rate of NBT reduction was observed. After that, the addition of 1.5-2 mM Spm to the thylakoid preparation increased the rate of NBT reduction, but it did not surpass the control rate. Surprisingly, at Spm doses higher than 3 mM, the rate of NBT reduction decreased sharply and correlated well with PSII inhibition in dark (Fig. 4A). This indicates that at these Spm concentrations the decrease of NBT reduction rate is due to the inhibition of electron transfer from PSII to PSI by Spm. It is likely, that the concentration of Spm in the range of 1.5-2 mM constitutes a transient phase between its roles as antioxidant and as a regulator of PSII electron transfer.

To confirm the implication of decreasing PSII electron transfer in PSI photo-protection, we measured the O_2 uptake rates in DCMU treated thylakoid membranes. Our results (Fig. 5) demonstrate that, the total inhibition of electron transfer from PSII to PSI by DCMU fully preserved PSI activity (O_2 uptake rates) during the first hour of exposure to strong light. The decrease of the O_2 uptake was observed only after prolonged period of illumination (120-180 minutes). The comparison of this result with the loss of PSI activity in the absence of DCMU (Fig. 1A, curve Ctrl) clearly demonstrates that the flux of electrons from PSII constitutes a prerequisite condition for PSI inhibition.

In the case of thylakoid membranes treated with Spd, the inhibition of PSII activity (Fig. 6A, curve PSII inhibition) showed a generally comparable response to that of Spm (Fig. 4A, curve PSII inhibition). Up to 2.5 mM, Spd induced a greater stimulation of PSII activity (20%) than Spm. It is known that PAs are associated with the components of the thylakoid membranes and are considered as regulators of the photosynthetic processes [43]. The activation of PSII electron transfer with addition of low PAs concentrations to thylakoid membranes (Fig. 4A and 6A) showed that the microenvironment was changed. One plausible explanation for this stimulation is the interaction of added PAs with photosynthetic membranes lacking their associated PAs as

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

by the extraction procedure. This interaction could allow the restoration of the appropriate protein structural organization for electron transfer. At 2.5 mM, the protection of P700 oxidation and O_2 uptake did not exceed 12% and 7% respectively. The inhibition of the electron transfer in PSII was observed only above 2.5 mM, and increased rapidly to reach maximum (95%) at 7 mM. However, the protection of P700 oxidation increased progressively with Spd concentration (85% at 7 mM). The response of the O_2 uptake rates to increasing Spd concentrations was less important than that of P700 oxidation (Fig. 6A) as for Spm. This is probably due to the sensitivity of some membrane-bound electron carriers to the higher dose of polyamines. On the other hand, the rate of NBT reduction decreased slowly at first between 0.5-3 mM Spd, but then rapidly decreased for doses higher than 3 mM (Fig. 6B). Our results demonstrate that the mechanisms of the photo-protection of PSI activity in thylakoid membranes are similar for both Spm and Spd, and that they depend on the PAs concentration.

DISCUSSION

In the present work, we provide some evidence of the protective action of Spm and Spd on the PSI activity in thylakoid membranes under photoinhibitory conditions. This protection was observed when Spm and Spd were added at known physiological concentration (1 mM) and also at higher doses of PAs. The potential mechanisms implicated in the photo-protection of PSI activity are discussed below.

In this study we have shown that high light intensity affected rapidly the activity of electron transfer in PSI under *in vitro* conditions as measured by the decrease of O_2 uptake rates (Fig. 1A). The alteration of PSI activity by PI includes the decrease of the electron transfer from the donor side of PSI (Cyt b_6/f and PC) to its acceptor side [11,12,55,56]. In photoinhibited PSI sub-membrane fractions, Hui *et al.* [12] associated the initial fast PSI inhibition to the detachment of the LHCI antenna. They considered the loss of the peripheral $LHCI_{680}$ antenna as a photo-protective mechanism that decreased excess energy transfer to PSI core. The important decline of PSI activity was observed at the end of treatment (Fig. 1A at 30 min). At this stage, the inhibition of O_2

uptake is associated to a slow rate of P700 photooxidation and the loss of its active forms as observed in Fig. 2. This latter perturbation reflects the breakdown of the PSI reaction center (P700) that constitutes a common feature of PSI photoinhibition [11,12,57]. Moreover, the investigation of the mechanisms of PSI photo-inactivation relates its dysfunction to the degradation of the subunits of the acceptor side mainly the PsaC, PsaD, and PsaE and/or the reaction center proteins (PsaA and PsaB) [8,15,24,50,51].

The above functional and structural perturbations of the PSI complex are known to be part of a photo-oxidative process [8,57]. Our results support the above idea as we indeed demonstrated that O_2^- generation (Fig. 3) was concomitant with the loss of PSI activity (Fig. 1A, curve PI). However, the presence of Spm and Spd in the thylakoid preparation provided a scavenging effect against O_2^- (Fig. 3). We suggest that exogenous Spm and Spd can improve the antioxidant defense system reducing thereby PSI inhibition (Fig. 1 and 2).

It is known that exogenous PAs can prevent the lipid peroxidation in photosynthetic membranes and stabilize their proteins like cytochrome f, plastocyanin, PSII manganese-stabilizing protein and D1/D2 proteins against different stress conditions [32,45]. Generally, the generation of photo-oxidative stress in the photosynthetic membranes under strong illumination follows the dysfunction of the antioxidant defense system. Indeed, the antioxidant enzymes located near or at the PSI acceptor side (SOD and APX) are deactivated and/or degraded by excess light [8]. Thus, if the ROSs generation can be inhibited or the formed species can be scavenged before they attack the polypeptides, the integrity of PSI will be preserved. In this context, it has been reported that the improvement of the antioxidant system during *in vitro* experiments by ROSs scavengers (SOD, catalase and n-popyl gallate) can preserve the PSI structure and maintain its function against PI [15,24]. It was reported that PAs can contribute to the improvement of the Hallywell-Asada pathway *in vivo* [58]. As mentioned above, it is shown here that PAs exert a scavenging effect against O_2^- (Fig. 3). Also, it is possible

that PAs can protect the antioxidant enzymes located in the PSI stromal side against photo-degradation, thus preserving their function.

Contrary to the artificial scavengers like n-propyl gallate, we may hypothesize that the biogenic PAs can contribute to a natural strategy to enhance the antioxidant defense system. Our results provide evidence for the $O_2^{\cdot-}$ scavenging by Spm and Spd in photosynthetic membranes. Indeed, we observed that the PAs-$O_2^{\cdot-}$ scavenging action is present and exclusively ascribed to antioxidant character of these PAs at concentration of 1 mM. These results are consistent with several works which reported that PAs can directly scavenge $O_2^{\cdot-}$ and $OH^{\cdot}$, and quench chemically-generated $^1O_2$ under *in vitro* conditions [59,60]. Based on electron paramagnetic resonance, nuclear magnetic resonance and mass spectroscopy studies, Ha *et al.* [59] demonstrated that OH scavenging occurred in reactions of Spm oxidation.

Recent study reported that over-expression of PAs in thylakoid membranes stimulates the thermal dissipation of absorbed light energy in LHCII of tobacco plants [39]. The quenching of Chl fluorescence may decrease the accumulation of singlet excited state of Chl (Chls*), resulting in a drop of triplet excited states (^{3}Chls*) reducing thereby the pathway for the generation of $^1O_2$. On the other hand, Khan *et al.* [60] showed that Spm quenches $^1O_2$ via a charge-transfer process to protect DNA. The rate constant for the formation $^1O_2$-Spm is higher than that of $^1O_2$-DNA. Similar processes may be implicated in the protection of PSI against PI.

To better assume these roles, Spm and Spd must be in a very close proximity to the sites of their action. The interaction of PAs with thylakoid membranes is likely ensured by their polycationic nature. Despite that the two PAs presented a similar pattern in protecting PSI against PI, we observed that Spm is more effective than Spd. The little difference observed between the two PAs may be attributed to the difference in their chemical properties such as the number of their positive charges (four for Spm and three for Spd). This feature allows them to interact with the negatively charged stromal side of thylakoid membranes [61]. The most positively charged PAs bind more strongly

to protein carboxylic groups compared to the least ones [62]. This electrostatic interaction can stabilize the protein structure, leading to the preservation of thylakoid membrane integrity and function [61,63]. Furthermore, the electrovalent attachment of PAs to thylakoid membranes may concur to their close proximity of the sites of ROSs generation to better assume their antioxidant role.

The strong inhibition of PSII activity by PAs is shown in Fig. 4A and 6A. The inhibition of electron transfer at Cyt b_6/f protects the photosynthetic membranes against photo-oxidative stress [64]. Similarly, when PAs fully inhibit PSII activity (7 mM), the O_2^- scavenging is solely due to a decrease of electron flow towards the acceptor side of PSI. In the range of concentration between 1.5 and 7 mM a clear distinction between PSI protection against PI due to the above inhibition of superoxide formation and direct scavenging of O_2^- by PAs cannot be performed. However, the greatest part of the protective action can still be attributed to PSII inhibition by the PAs. The inhibition of PSII activity observed with non-physiological doses of Spm or Spd (Fig. 4A and 6A) was considered harmful when the activity of PSII was studied separately in isolated thylakoids or PSII sub-membrane fractions [65]. But, *in vivo*, when PSII pumps electrons to the PSI complex under stress conditions, the importance of PSII deactivation must be taken into account. Especially, when the PSII repair and PAs biosynthesis are finely controlled and require PSI activity to fulfill the need for ATP. This point of view is important in the understanding of the importance of PSI resistance to photoinhibition *in vivo*.

CONCLUSION

We report in this study that exogenous application of Spm or Spd on thylakoid membranes resulted in the preservation of PSI activity against PI under *in vitro* conditions. The mechanisms of PSI photo-protection minimized the PI-induced oxidative stress. This is clearly due to a direct O_2^- scavenging by PAs at physiological concentration and/or due to the inhibition of electron transfer from PSII towards PSI at higher doses.

REFERENCES

1. Nelson N, Ben-Shem A (2004) The complex architecture of oxygenic photosynthesis. Mol. Cell Biol. 5: 1-12.

2. Quiles MJ, López NI (2004) Photoinhibition of photosystems I and II induced by exposure to high light intensity during oat plant growth: Effects on the chloroplast NADH dehydrogenase complex. Plant Sci. 166: 815-823.

3. La Porta N, Bertamini M, Nedunchezhian N, Raddi P, Muthuchelian K (2005) Photoinhibition of photosynthesis in needles of two cypress (*Cupressus sempervirens*) clones. Tree Physiol. 25: 1033-1039.

4. Govindachary S, Bigras C, Harnois J, Joly D, Carpentier R (2007) Changes in the mode of electron flow to photosystem I following chilling-induced photoinhibition in a C3 plant, Cucumis sativus L. Photosynth. Res. 94: 333-345.

5. Govindachary S, Bukhov N, 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.

6. Sonoike K, Terashima I (1994) Mechanism of the photosystem I photoinhibition in leaves of Cucumis sativus L. Planta 194: 287-293.

7. Terashima I, Funayama S, Sonoike K (1994) The site of photoinhibition in leaves of cucumis sativus l at low-temperatures is photosystem I, not photosystem II. Planta 193: 300-306.

8. Tjus SE, Moller BL, Scheller HV (1998) Photosystem I is an early target of photoinhibition in barley illuminated at chilling temperatures. Plant Physiol. 116: 755-764.

9. Takahashi S, Tamashiro A, Sakihama Y, Yamamoto Y, Kawamitsu Y, *et al.* (2002) High-susceptibility of photosynthesis to photoinhibition in the tropical plant Ficus microcarpa L. f. cv. Golden Leaves. BMC Plant Biol. 2: 2.

10. Rajagopal S, Bukhov N, Carpentier R (2002) 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: 194-200.

11. Rajagopal S, Carpentier R (2003) Retardation of photo-induced changes in Photosystem I submembrane particles by glycinebetaine and sucrose. Photosynth. Res. 78: 77-85.

12. Hui Y, Jie W, Carpentier R (2000) Degradation of the photosystem I complex during photoinhibition. Photochem. Photobiol. 72: 508-512.

13. Miyake C, Okamura M (2003) Cyclic electron flow within PSII protects PSII from its photoinhibition in thylakoid membranes from spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol. 44: 457-462.

14. Danon A, Mayfield SP (1994) Ligth-regulated translation of chloroplast messenger RNAs through redox potential. Science 266: 1717-1719.

15. Tjus SE, Scheller HV, Andersson B, Moller BL (2001) Active oxygen produced during selective excitation of photosystem I is damaging not only to photosystem I, but also to photosystem II. Plant Physiol. 125: 2007-2015.

16. Kudoh H, Sonoike K (2002) Irreversible damage to photosystem I by chilling in the light: cause of the degradation of chlorophyll after returning to normal growth temperature. Planta 215: 541-548.

17. Havaux M, Niyogi KK (1999) The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 8762-8767.

18. Havaux M, Bonfils JP, Lűtz C, Niyogi KK (2000) Photodamage of the photosynthetic apparatus and its dependence on the leaf developmental stage in the *npq1* Arabidopsis mutant deficient in the xanthophyll-cycle enzyme violaxanthin deepoxidase. Plant Physiol. 124: 273-284.

19. Adams BD, Adams WW (1992) Photoprotection and others responses of plants to high light stress. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43: 599-626.

20. James SA, Bell DT (2000) Leaf orientation, light interception and stomatal conductance of *Eucalyptus globules ssp. Globules* leaves. Tree Physiol. 20: 815-823.

21. Jiang CD, Gao HY, Zou Q, Jiang GM, Li LH (2006) Leaf orientation, photorespiration and xanthophyll cycle protect young soybean leaves against high irradiance in field. Environ. Exp. Bot. 55: 87-96.

22. Miyao M, Ikeuchi JM, Yamamoto N, Ono TA (1995) Specific degradation of the D1 protein of photosystem II by treatment with hydrogen peroxide in darkness: Implications for the mechanism of degradation of the D 1 protein under illumination. Biochemistry 34: 10019-10026.

23. Hideg É, Spetea C, Vass I (1994) Singlet oxygen and free radical production during acceptor- and donor-side-induced photoinhibition: Studies with spin trapping EPR spectroscopy. Biochim. Biophys. Acta. B. 1186: 143-152.

24. Sonoike K (1996) Degradation of psaB gene product, the reaction center subunit of photosystem I, is caused during photoinhibition of photosystem I: possible involvement of active oxygen species. Plant Sci. 115: 157-164.

25. Yordanov I, Velikova V (2000) photoinhibition of photosystem 1. Bulg. J. Plant Physiol. 26: 70-9.

26. Aro EM, Virgin I, Andersson B (1993) Photoinhibition of photosystem 2 inactivation, protein damage and turnover. Biochim. Biophys. Acta 1143: 113-134.

27. Asada K (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. Plant Physiol. 141: 391-396.

28. Ogawa K, Kanematsu S, Takabe K, Asada K (1995) Attachement of CuZn-superoxide dismutase to thylakoid membranes at the site of superoxide generation (PSI) in spinach chloroplast: detection by immuno-gold labelling after rapid freezing and substitution method. Plant Cell Physiol. 36: 565-573.

29. Miyake C, Asada K (1992) Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. Plant Cell Physiol. 33 (5): 541-553.

30. Lütz C, Navakoudis E, Seidlitz HK, Kotzabasis K (2005) Simulated solar irradiation with enhanced UV-B adjust plastid- and thylakoid-associated polyamine changes for UV-B protection. Biochim. Biophys. Acta 1710: 24-33.

31. Kuznetsov VV, Shevyakova NI (2007) Polyamines and stress tolerance in plants. Plant Stress 1: 50-71.

32. Stoynova EZ, Karanov EN, Alexieva V (1999) Subcellular aspects of the protective effect of spermine against atrazine in pea plants. Plant Growth Regul. 29: 175-180.

33. Nayyar H, Chande S (2004) Protective effects of polyamines against oxidative stress induced by water and cold stress in chickpea. J. Agron. Crop Sci. 190: 355-365.

34. He L, Nada K, Kasukabe Y, Tachibana S (2002) Enhanced susceptibility of photosynthesis to low-temperature photoinhibition due to interruption of chill-induced increase of S-adenosylmethionine decarboxylase activity in leaves of spinach (Spinacia oleracea L.). Plant Cell Physiol. 43: 196-206.

35. Kotzabasis K, Fotinou C, Roubelakis-Angelakis KA, Ghanotakis D (1993) Polyamines in the photosynthetic apparatus photosystem II highly resolved subcomplexes are enriched in spermine. Photosynth. Res. 38: 83-88.

36. Della Mea M, Di Sandro A, Dondini L, Del Duca S, Vantini F, *et al.* (2004) A Zea mays 39-kDa thylakoid transglutaminase catalyses the modification by polyamines of light-harvesting complex II in a light-dependent way. Planta 219: 754-764.

37. Del Duca S, Tidu V, Bassi R, Esposito C, Serafini-Fracassini D (1994) Identification of chlorophyll-a/b proteins as substrates of transglutaminase activity in isolated chloroplasts of Helianthus tuberosus L. Planta 193: 283-289.

38. Sobieszczuk-Nowicka E, Wieczorek P, Legocka J (2009) Kinetin affects the level of chloroplast polyamines and transglutaminase activity during senescence of barley leaves. Acta Biochim. Pol. 56: 255-259.

39. Ioannidis NE, Ortigosa SM, Veramendi J, Pintó-Marijuan M, Fleck I, *et al.* (2009) Remodeling of tobacco thylakoids by over-expression of maize plastidial transglutaminase. Biochim. Biophys. Acta. B. 1787: 1215-1222.

40. Hamdani S, Gauthier A, Msilini N, Carpentier R (2011) Positive charges of polyamines protect PSII in isolated thylakoid membranes during photoinhibitory conditions. Plant cell physiol. 52: 866-873.

41. Demetriou G, Neonaki C, Navakoudis E, Kotzabasis K (2007) Salt stress impact on the molecular structure and function of the photosynthetic apparatus -The protective role of polyamines. Biochim. Biophys. Acta 1767: 272-280.

42. Mapelli S, Brambilla IM, Radyukina NL, Ivanov YV, Kartashov AV, *et al.* (2008) Free and bound polyamines changes in different plants as a consequence of UV-B light irradiation. Gen. Appl. Plant Physiol. 34: 55-66.

43. Navakoudis E, Lütz C, Langebartels C, Lütz-Meind U, Kotzabasis K (2003) Ozone impact on the photosynthetic apparatus and the protective role of polyamines. Biochim. Biophys. Acta 1621: 160-169.

44. Groppa MD, Tomaro ML, Benavides MP (2007) Polyamines and heavy metal stress: the antioxidant behavior of spermine in cadmium- and copper-treated wheat leaves. Biometals 20: 185-195.

Rapport-gratuit.com

45. Besford T, Richardson CM, Campos JL, Tiburcio AF (1993) Effect of polyamines on stabilization of molecular complexes in thylakoid membranes of osmotically stressed oat leaves. Planta 189: 201-206.

46. 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.

47. Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE (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.

48. Carpentier R, Larue B, Leblanc RM (1984) Photoacoustic spectroscopy of *Anacystis nidulans*: III. Detection of photosynthetic activities. Arch. Biochem. Biophys. 228: 534-543.

49. Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal. Biochem.44: 276-287.

50. Jiao S, Emmanuel H, Guikema JA (2004) High light stress inducing photoinhibition and protein degradation of photosystem I in *Brassica rapa*. Plant Sci. 167: 733-74.

51. Hwang HJ, Kim JH, Eu YJ, Moon BY, Cho SH, *et al.* (2004) Photoinhibition of photosystem I is accelerated by dimethyldithiocarbamate, an inhibitor of superoxide dismutase, during light-chilling of spinach leaves. J. Photochem. Photobiol. B. 73: 79-85.

52. Yang X, Zhang YH, Yang ZL, Chen LJ, He JL, *et al.* (2009) pH dependence of photosynthetic behavior of plant photosystem I particles. Russ. J. Plant Physiol. 56: 599-606.

53. Bonenfant D, Carpentier R (1989) Stabilization of the structure and functions of photosystem I submembrane fraction by immobilization in an albumin-glutaraldehyde matrix. Appl. Biochem. Biotechnol. 59-71.

54. Beauchemin R, Gautier A, Harnois J, Boisvert S, Govidachary S, *et al.* (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 QA- to QB. Biochim. Biophys. Acta 1767: 905-912.

55. Sonoike K, Terashima I, Iwaki M, Itoh S (1995) Destruction of photosystem I iron–sulfur centers in leaves of Cucumis sativus L. by weak illumination at chilling temperatures. FEBS Lett. 362: 235-238.

56. Oh MH, Safarova RB, Eu YJ, Zulfugarov IS, Kim JH, *et al.* (2009) Loss of peripheral polypeptides in the stromal side of photosystem I by light-chilling in cucumber leaves. Photochem. Photobiol. Sci. 8: 535-541.

57. Sonoike K, Kamo M, Hihara Y, Hiyama T, Enami I (1997) The mechanism of the degradation of psaB gene product, one of the photosynthetic reaction center subunits of photosystem I, upon photoinhibition. Photosynth. Res. 53: 55-63.

58. Aronova EE, Shevyakova NI, Stetsenko LA, Kuznetsov VlV (2005) Cadaverine-induced induction of superoxide dismutase gene expression in mesembryanthemum crystallinum L. Dokl. Biol. Sci. 403: 257-259.

59. Ha HC, Sirisoma NS, Periannan A, Casero JR (1998) The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 11140-11145.

60. Khan AU, Mei Y-H, Wilson T (1992) A proposed function for spermine and spermidine: Protection of replicating DNA against damage by singlet oxygen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 11426-11427.

61. Barber J (1981) Control of photosynthetic phenomena in surface membrane charges. In: Photosynthesis I. Photophysical processes. Membrane energization, Ed. G. Akoyunoglou, Balaban Intern. Sci. Services, Philadelphia, 385-396.

62. Kaur-Sawhney R, Altman A, Galston AW (1978) Dual mechanisms in polyamine-mediated control of ribonuclease activity in oat leaf protoplast, Plant Physiol. 62: 158-160.

63. Tiburcio AF, Besford RT, Capell T, Borrell A, Testillano PS, *et al.* (1994) Mechanisms of polyamine action during senescence responses induced by osmotic stress. J. Exp. Bot. 45: 1789-1800.

64. Krieger-liszkay A, Kienzler K, Johnson GN (2000) Inhibition of electron at the cytochrome b6f complex protects photosystem II from photoinhibition. FEBS Lett. 486: 191-194.

65. Hamdani S, Yaakoubi H, Carpentier R (2011) Polyamines interaction with thylakoid proteins during stress, J. Photochem. Photobiol. B. 104: 314-319.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES
Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Changes in the O_2 uptake rates in thylakoid membranes during 30 min of photoinhibition (A) in the absence (Ctrl) or presence of 1 or 2 mM Spm. Inset: percentage of photoinhibition in presence of 1 and 2 mM of Spm in thylakoid membranes, from the experiment of Fig. 1A.

(B) Comparison of the effect of increasing the Spm and Spd concentration on O_2 uptake rates in thylakoid membranes after 30 min of illumination. Control rate in the dark (Fig. 1A) was 525 μmol O_2 mg Chl^{-1} h^{-1}, and the results are a mean of 9 assays.

Figure 2. P700 photooxidation in thylakoid membranes after 30 min of photoinhibition (A) Original traces of the Far-Red light-induced P700 photooxidation monitored as absorbance changes at 820 nm in the samples of thylakoid membranes either control (Ctrl) or photoinhibited for 30 min (PI) in the absence of PAs. PI+Spm and PI+Spd curves represent respectively, the absorbance changes at 820 nm in thylakoid membranes photoinhibited in presence of 1 mM Spm or Spd. The arrow indicates the switching on of Far-Red light (78 μmol m^{-2} s^{-1}). Each trace is the average of six measurements.

(B) Variation of the amount of photooxidizable P700 (ΔA 820 nm) in the thylakoid membranes either control (Ctrl) or photoinhibited for 30 min (PI+0) in the absence of PAs. PI+1, PI+2, PI+3, PI+5 and PI+7 represent the percentage of photooxidizable P700 in photoinhibited samples in presence of varying concentrations (1-7 mM) of Spm and Spd. Each value is the average of six measurements.

Figure 3. NBT photo-reduction in the absence or in presence of Spm and Spd. The changes in the optical density at 560 nm following NBT photo-reduction in thylakoid membranes preparation subjected to photoinhibition in the absence or presence of 1 mM Spm or Spd as a function of time (during 15 min). Each value is the average of six measurements.

Figure 4. Correlation of the PSI protection, PSII inhibition and NBT-photo-reduction in the presence of Spm. (A) Effect of increasing Spm doses on (i) inhibition of PSII in control thylakoid membranes (in dark) and (ii) protection of PSI activity after 30 min photoinhibition, expressed as percentage of P700 photooxidation and O_2 uptake obtained from the experiments of Fig. 1B and Fig. 2B and calculated using the following formula:

$$((PI + Spm) - PI) * 100 / (Ctrl - PI)$$

Were PI + Spm is the photoinhibited sample in presence of Spm, PI is the photoinhibited samples and Ctrl is the control.

(B) The variation of the initial rate of NBT photo-reduction in thylakoid membrane preparations subjected to photoinhibition in the absence or presence of increasing Spm doses. The rates were obtained as described in Fig. 3.

Figure 5. Photo-protection of PSI activity by DCMU. The measurement of O_2 uptake rates in thylakoid membranes treated with 1 mM DCMU and exposed to photoinhibition for 180 minutes. The results are expressed as normalized values of O_2 uptake rates. Each value is the average of six measurements.

Figure 6. Correlation of the PSI protection, PSII inhibition and NBT photo-reduction in presence of Spd (A) Effect of increasing Spd doses on (i) inhibition of PSII in control thylakoid membranes (in dark) and (ii) protection of PSI activity after 30 min photoinhibition, expressed as percentage of P700 photooxidation and O_2 uptake obtained from the experiments of Fig. 1B and Fig. 2B, and calculated using the following formula:

$$((PI + Spd) - PI) * 100 / (Ctrl - PI)$$

Were PI + Spd is the photoinhibited sample in presence of Spd, PI is the photoinhibited samples and Ctrl is the control.

(B) The variation of the initial rate of NBT photo-reduction in thylakoid membrane preparations subjected to photoinhibition in the absence or presence of increasing Spd doses. The rates were obtained as described in Fig. 3.

SUPPORTING INFORMATION LEGEND

Figure S1. Comparison of the variation of O_2 uptake rates in control (Ctrl) and photoinhibited (PI) samples preloaded or not with 7 mM Spm. Ctrl: control, Ctrl+7 mM Spm: control loaded with 7 mM Spm, PI: photoinhibited, PI +7 mM Spm: photoinhibited in the presence of 7 mM Spm. Each value is the average of six measurements.

Figure 1

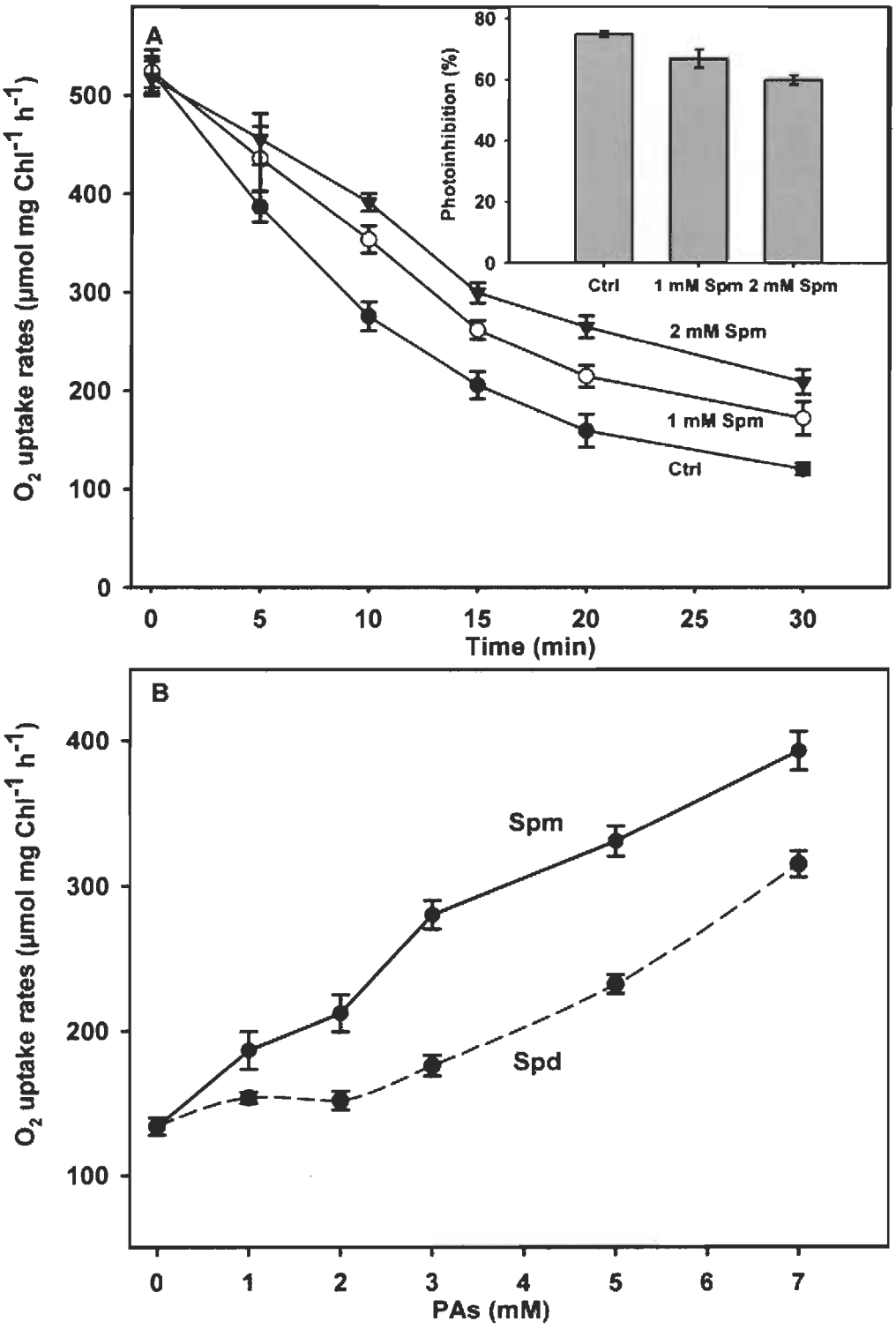

A
O_2 uptake rates (μmol mg Chl^{-1} h^{-1})
Time (min)
Photoinhibition (%)
Ctrl
1 mM Spm
2 mM Spm
B
Spm
Spd
PAs (mM)

Figure 2

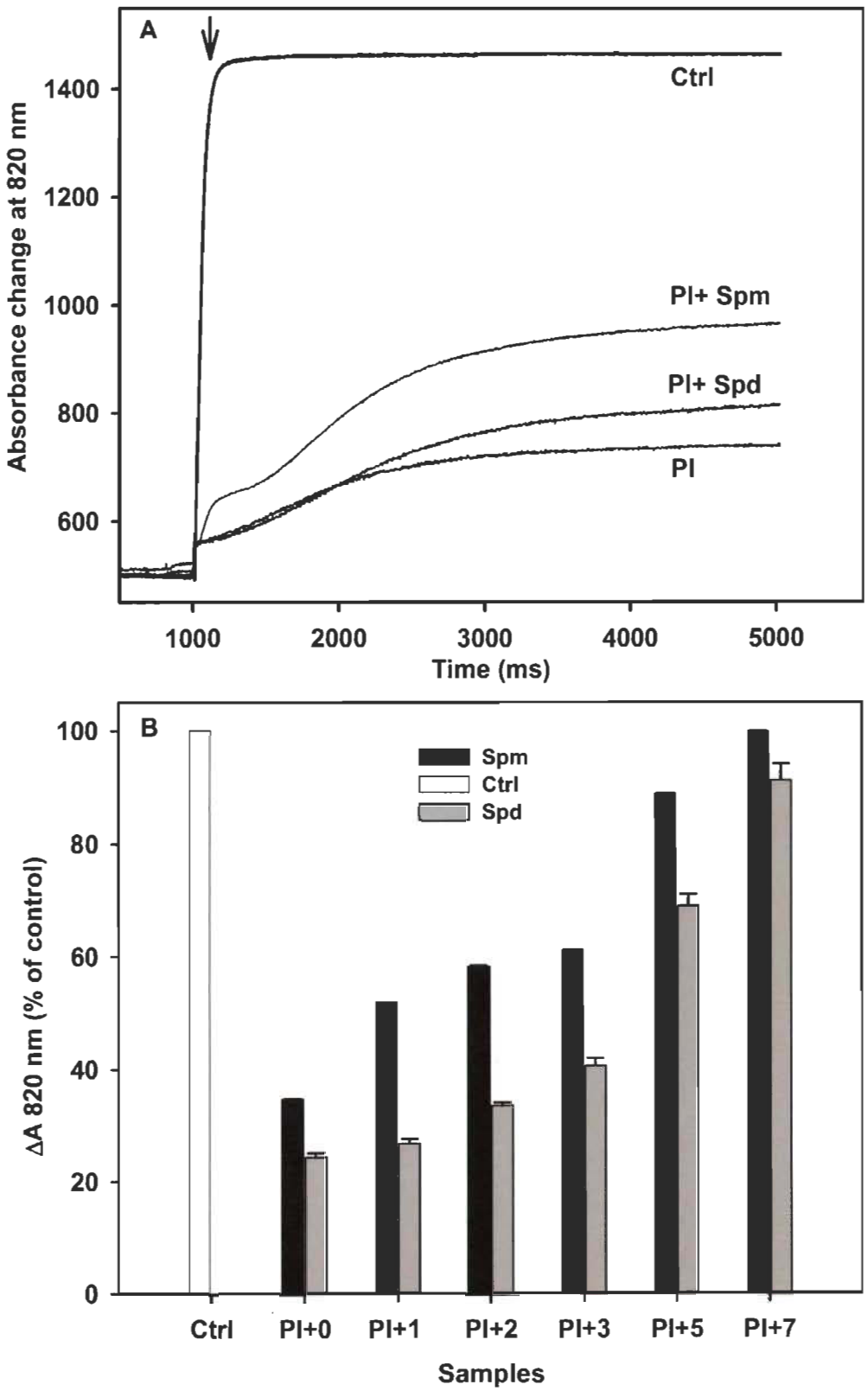

A
Ctrl
Pl+ Spm
Pl+ Spd
Pl
Absorbance change at 820 nm
1400
1200
1000
800
600
1000
2000
3000
4000
5000
Time (ms)
B
Spm
Ctrl
Spd
ΔA 820 nm (% of control)
100
80
60
40
20
0
Ctrl
Pl+0
Pl+1
Pl+2
Pl+3
Pl+5
Pl+7
Samples

Figure 3

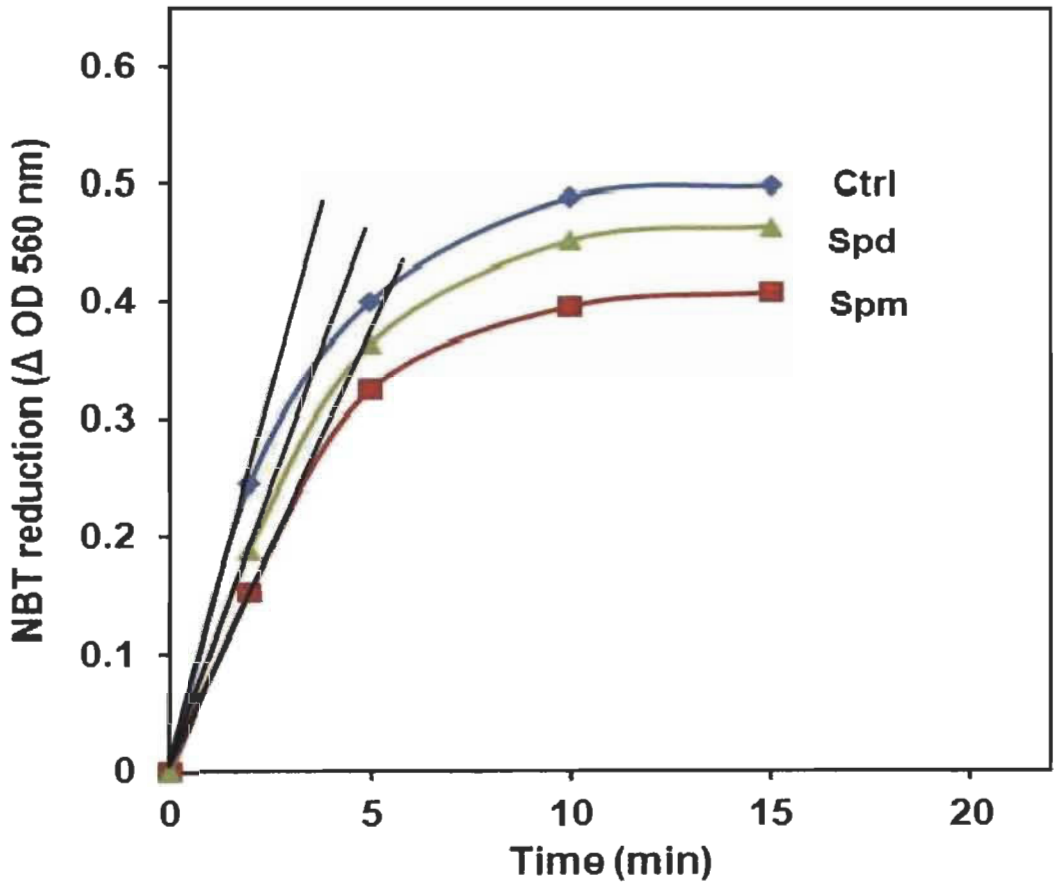
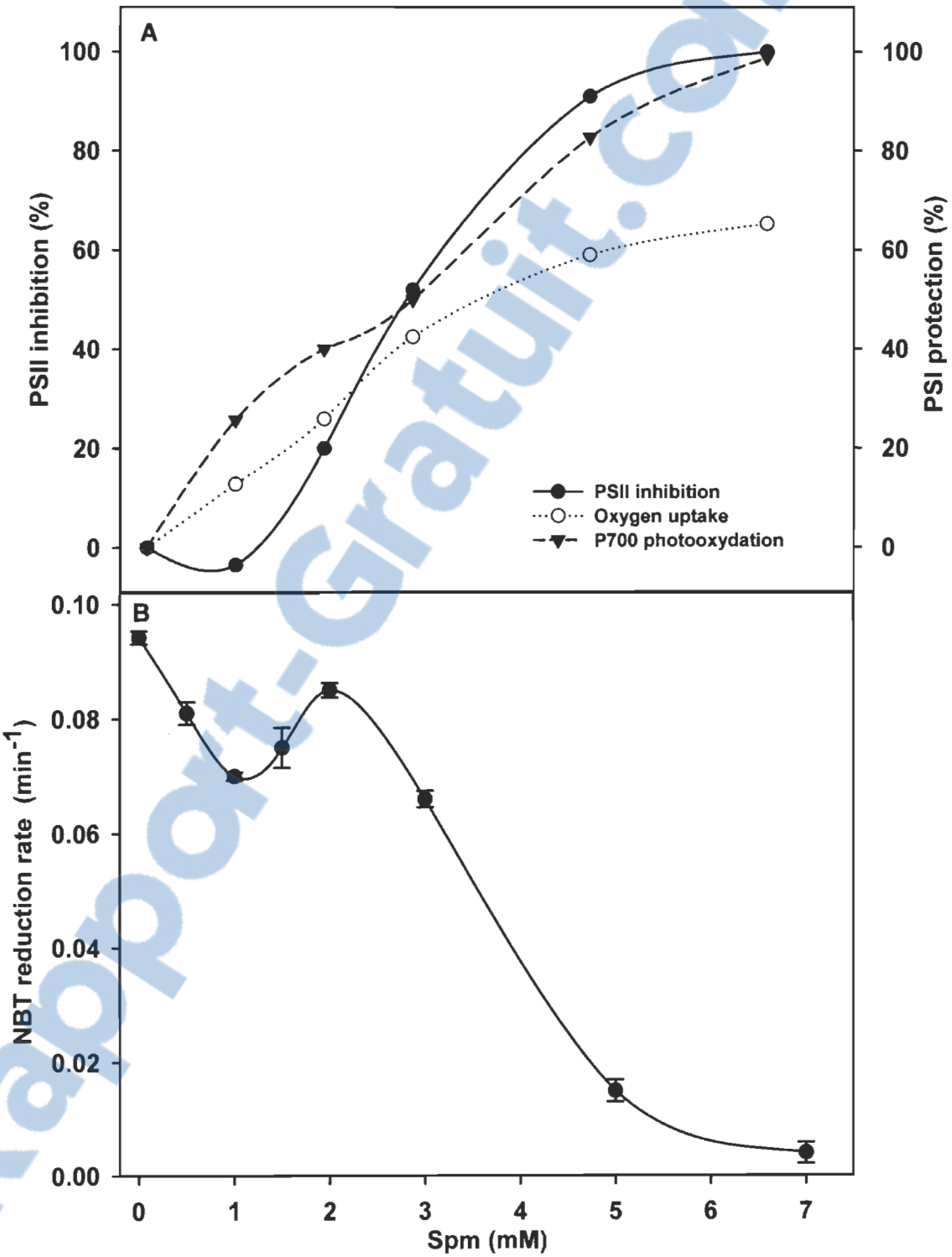

NBT reduction (Δ OD 560 nm)
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
5
10
15
20
Time (min)
Ctrl
Spd
Spm

Figure 4



Rapport-Gratuit.com

Figure 5

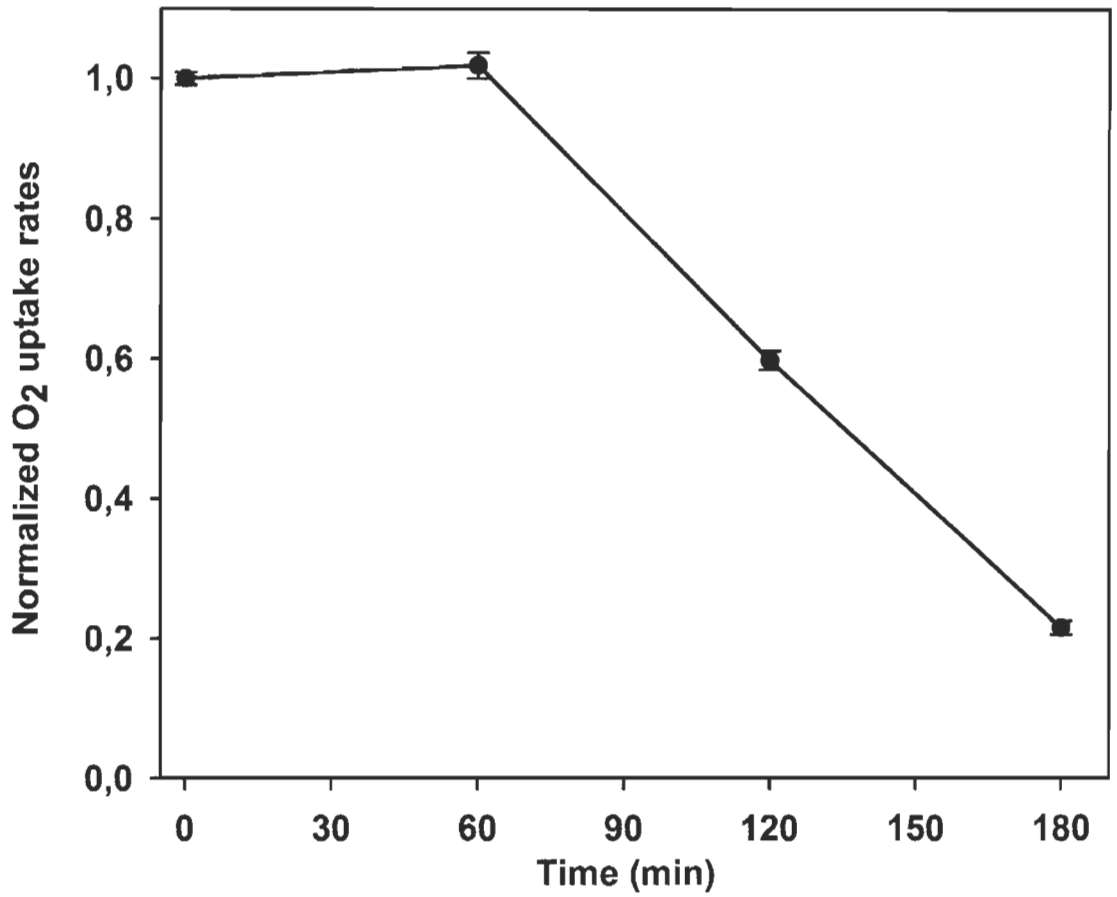
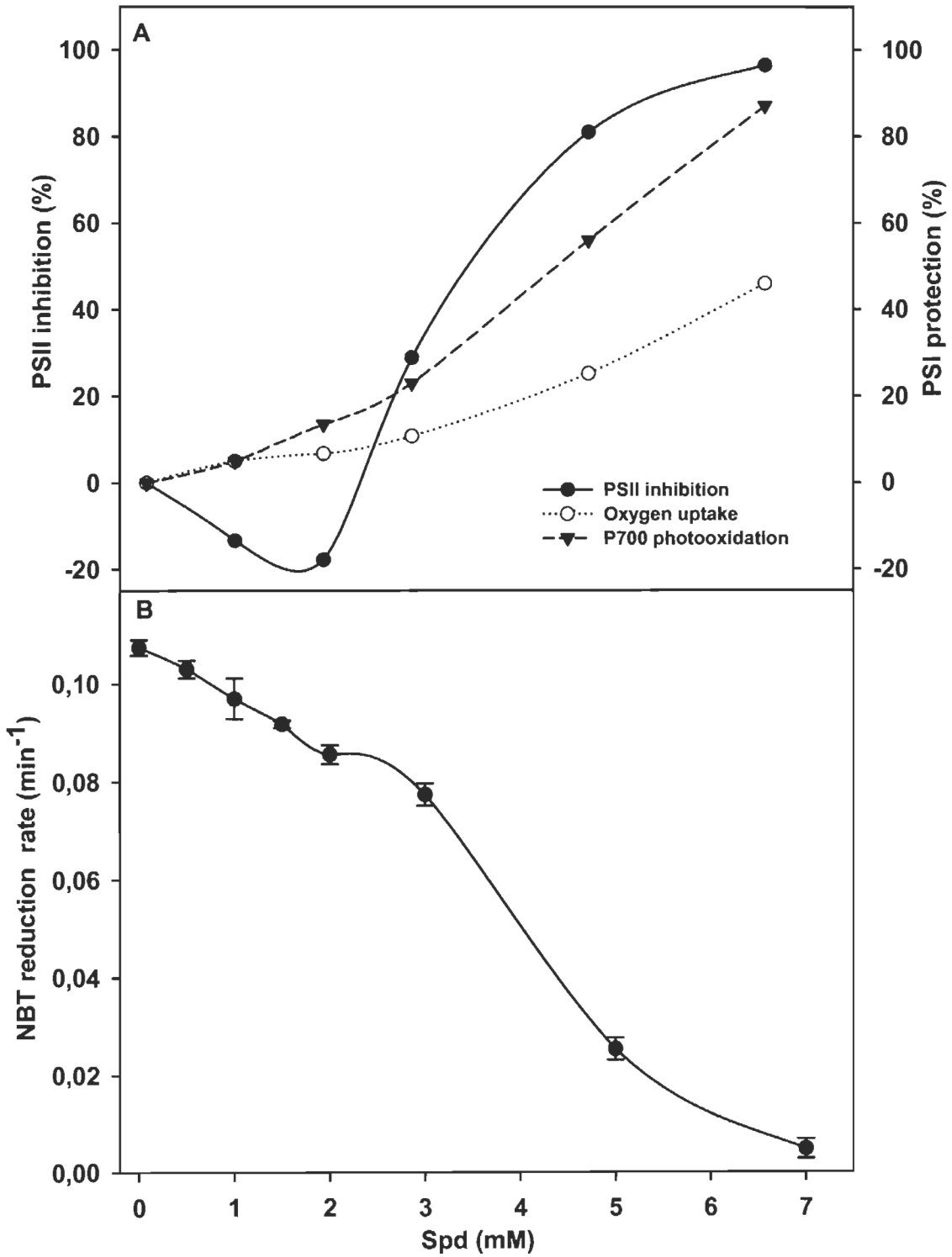
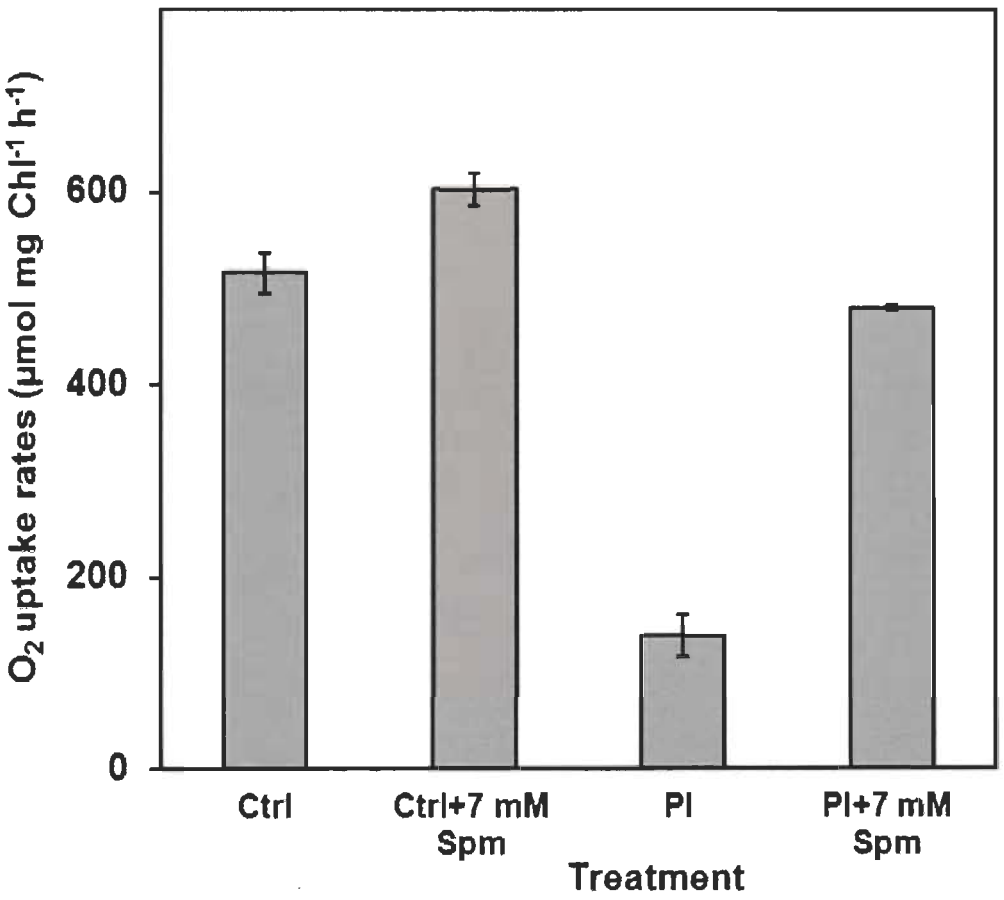

1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
Normalized O_2 uptake rates
0
30
60
90
120
150
180
Time (min)

Figure 6



Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Figure S1


O2 uptake rates (µmol mg Chl-1 h-1)
600
400
200
0
Ctrl
Ctrl+7 mM Spm
Pl
Pl+7 mM Spm
Treatment

CHAPITRE III

EFFECT OF BIOGENIC POLYAMINE SPERMINE ON THE STRUCTURE AND FUNCTION OF PHOTOSYSTEM I

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en anglais dans la revue : *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (2014), 141: 76-83.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

3.1 Résumé

Le but spécifique de ce chapitre est de localiser les sites de liaison de la spermine (Spm) avec les protéines de fragments membranaires enrichis en PSI et d'étudier l'impact de cette interaction sur la photoprotection de ce complexe protéique. Pour cela, l'activité du PSI et la modification des structures secondaires de ses protéines ont été étudiées en utilisant des méthodes spectroscopiques et de modélisation moléculaire.

Nos résultats ont montré qu'à forte concentration, la Spm est capable d'interagir avec les polypeptides des membranes enrichies en PSI (via des ponts hydrogène) et induit des changements conformationels majeurs dans les structures des protéines. On a observé une réduction des hélices-α de 52 % à 42 % et une augmentation des feuillets-β de 26 % à 29 %. Cependant, la polyamine ne modifie pas de manière significative la photooxydation du P700 dans l'échantillon du contrôle, et protège considérablement l'activité photochimique du PSI contre l'excès de lumière. Par ailleurs, les changements de conformation des protéines coïncident avec une inhibition importante des taux de consommation d'oxygène par la Spm, en présence du donneur artificiel d'électron : TMPD réduit. Ce qui révèle que la plastocyanine, protéine du côté donneur du PSI, constitue une cible principale pour l'inhibition par cette polyamine. La photoprotection de l'activité photochimique du PSI peut être alors expliquée par la stabilisation des polypeptides stromatiques du PSI par la Spm. En effet, les résultats de la modélisation moléculaire montrent que la Spm est capable de se fixer à des acides aminés de

caractères hydrophile et hydrophobe au niveau des polypeptides du côté accepteur du PSI. Aussi, la présence de plusieurs liaisons de type hydrogène joue un rôle important dans la stabilisation du complexe Spm-PSI.

3.2 Deuxième article scientifque

Effect of biogenic polyamine spermine on the structure and function of photosystem I

Hnia **Yaakoubi**, Imed **Hasni**, Heidar-Ali **Tajmir-Riahi*** and Robert **Carpentier***

Groupe de Recherche en Biologie-Végétale, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Qc, G9A 5H7, Canada

Keywords: PSI sub-membranes fractions, spermine, photoinhibition, FTIR, spectroscopy, modeling

Abbreviations: Spm, spermine; PSI, photosystem I; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; A_0, primary acceptor chlorophyll; A_1, phylloquinone; Fx, iron sulfur cluster; FNR, ferredoxin NADP reductase; LHCI, PSI light harvesting complexes; PSII, photosystem II; Cyt b_6/f, cytochrome b_6/f complex; PC, plastocyanin; SOD, superoxide dismutase; APX, ascorbate peroxidase; Chl, chlorophyll; DCMU, 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea; TMPD, N,N,N,N'-tetramethylphenylenediamine; As, ascorbate; MV, methyl viologen; FTIR, Fourier Transform Infra Red.

* To whom correspondence should be addressed. e-mail: Robert.Carpentier@uqtr.ca and tajmirri@uqtr.ca

ABSTRACT

We located the binding sites of spermine (Spm) to PSI sub-membrane proteins and the impact of this interaction on the photoprotection of PSI activity, using spectroscopic methods and molecular modeling. Our results showed that at high Spm content the polyamine binds PSI polypeptides through H-bonding and induces major protein conformational changes with the reduction of α-helix from 52 to 42% and an increase of the β-sheet from 26to 29%. However, polyamine did not affect significantly the photooxidizable P700 in control sample and considerably protects it against strong illumination. On the contrary, protein conformational changes coincide with an important inhibition of O_2 uptake rates by polyamine, which revealed that the protein of the PSI donor side plastocyanin is a main target for Spm inhibition. The photoprotection of PSI photochemical activity may be due to the stabilization of the PSI stromal polypeptides by Spm as shown by the docking results. Spm binds to different amino acids with hydrophilic and hydrophobic characters, while the presence of several H-bondings stabilizes Spm-PSI complexation.

INTRODUCTION

Spermine (Spm) is a biogenic polyamine implicated in numerous physiological processes including in photosynthesis [1]. Its association with the thylakoid membranes revealed its importance in the regulation of the activity of their components including probably PSI. The PSI super-complex is an essential constituent, defined as a plastocyanin-ferredoxin oxidoreductase responsible for NADPH synthesis [2]. The structural analysis of this photosystem revealed the existence of numerous polypeptides such as PsaA to PsaN. The largest polypeptides called PsaA and PsaB constitute the PSI core proteins. They bind the chlorophyll of PSI reaction center (P700) and other electron carriers (A0, A1 and Fx). The final electron acceptors F_A and F_B are located in the PsaC polypeptide on the stromal side of the thylakoid membrane. The PsaC is linked, in one hand to PsaD that fixes ferredoxin, and on the other hand to PsaE that fixes ferredoxin and PC. The other polypeptides are not directly implicated in the electron transfer

through PSI, but they play cofactor roles. In the periphery of the PSI core, the LHCI antenna captures the light and transfers it to P700, where charge separation occurs [3-5]. After charge separation in the PSI reaction center, the electrons produced by water oxidation in PSII reduce P700 chlorophylls via Cyt b_6/f complex and PC. Besides its importance in driving the linear electron transfer as described above, the PSI is implicated in the driving of cyclic electron transport [6-7]. This latter process is generally stimulated under stress conditions; it oxidizes the acceptor side of PSI and reduces its donor side [6-9]. Moreover, the cyclic electron transport is able to provide ATP to thylakoid membranes under limited conditions. The ATP synthesised by the cyclic pathway may be involved in numerous process as reported [10].

Generally, PSI is not considered sensitive to environmental stress [11-12] and very little is known about the mechanism of its resistance under ambient conditions. Nevertheless, some studies demonstrated that PSI may be a target for light stress under specific conditions, like chilling-temperature and in isolated photosynthetic materials [13-15]. Furthermore, since the discovery of PSI sensitivity in plants, the mechanism of PSI inactivation *in vivo* and *in vitro* has received large consideration [16-18]. It is known that the oxidative stress constitutes the main origin of PSI photodamage. Indeed, ROSs generated in the PSI acceptor side, affected firstly the PSI acceptor proteins, then the chlorophylls and the proteins of PSI reaction center [18-20]. The investigation of the mechanism of PSI repair under photoinhibitory conditions revealed that the recovery-rate of photo-damaged PSI is very slow, and in some cases the damage is irreversible [21-23]. For this reason, the photoinhibition of PSI could have serious consequences for the photosynthetic efficiency [24].

The investigation of the PSI-protective mechanisms, under light stress, revealed that the cyclic electron transfer may decrease the over-reduction of PSI acceptor side reducing the excitation pressure [8,25,26]. On the other hand, the studies undertaken on the enzymatic antioxidant systems (SOD and APX) are not in full agreement with its effectiveness in protecting PSI [27-30]. Furthermore, little is known about the implication of the non-photochemical quenching of the LHCI-antenna in PSI-

photoprotection [31-32]. All these strategies do not explain the effectiveness of its resistance *in vivo* at ambient conditions. In recent years, attention was focused on the importance of the role played by polyamines in the protection of PSII against stress [33-35], but little information is known regarding polyamine effect on the PSI complex. On the other hand, extensive research has been concentrated on the interaction mode of polyamines with the PSII complex and its polypeptides such as LHCII and 33 kDa proteins [36-39]. Nevertheless, there has been no report on the binding mode of polyamines with the PSI complex and the effect of such interaction on PSI structure and function. Therefore, the investigation on the interaction of polyamines with PSI is of a major importance to understand the mechanism of action of these polycations and their potential implication in the improvement of the PSI resistance to stress under physiological conditions.

We report the multiple spectroscopic results and docking study of the interaction of spermine with isolated PSI sub-membrane fractions in order to determine its binding mode and the impact of its interaction on the PSI activity under standard and photoinhibitory conditions. In addition, the effects of polyamine-PSI complexation on the protein stability and conformation are reported here.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of PSI sub-membrane fractions

PSI sub-membrane fractions were isolated from fresh market spinach (Spinacia oleracea L.) according to the procedure of Harnois *et al.* [40]. Dark-adapted leaves were homogenized in a Tricine-KOH buffer (pH 7.8). After several successive centrifugations, the final pellet was suspended in Tricine-KOH buffer (20 mM, pH 7.8) containing, 10 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$ and 10 mM KCl. The stromal lamella obtained contains all the components of PSI complex with 260 Chl/reaction center, besides to the Cyt b_6/f complex and PC. PSI sub-membrane fractions were kept in the dark and Chl concentration was calculated following the procedure outlined in Porra *et al.* [41]. We

chose to use PSI sub-membrane particles as a simple functional system to get a better insight into the action of Spm on the PSI complex.

Spermine application and photoinhibitory treatment

Samples of PSI sub-membrane fractions diluted at 200 µg Chl mL^{-1} were suspended in an assay medium containing Tricine-KOH buffer (20 mM, pH 7.8). Then, spermine solution was added at different concentrations (0, 1, 3, 5 and 10 mM) and incubated for few minutes. After that, samples were illuminated by an intense white light (2000 µmol m^{-2} s^{-1}) generated by quartz-halogen projector lamp (150 W) with continuous stirring at 24°C. The illuminated samples were used for the measurement of PSI photochemical activity.

O_2 uptake rates measurement

O_2 uptake rates in PSI sub-membrane fractions were determined using an Oxylab system (Hansatech Instruments, Norfolk, England) at 24°C as described by Carpentier *et al.* [42]. The PSI activity was measured with TMPD/Asc as an artificial electron donor system and MV as a final electron acceptor. The assay medium was composed of PSI un- or illuminated samples at various period of time, at a final Chl concentration of 10 µg mL^{-1}, 20 mM Tricine-KOH (pH 7.8), 10 mM KCl, 10 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 10 µM DCMU, 500 µM MV, 1 mM NaN_3, 5 mM Na-ascorbate and 100 µM TMPD. The reaction mixture was illuminated using a 150 W quartz-halogen projector lamp (500 µmol m^{-2} s^{-1}). The O_2 uptake rates were expressed as the percentage of control.

Measurement of P700 photooxidation

P700 photooxidation was monitored as light-induced absorbance changes at 820 nm (ΔA_{820}) at room temperature using the dual wavelength emitter detector ED-P700DW connected via a PAM-101 fluorometer (Walz). The ED-P700DW unit detects strictly the differential absorbance changes between 810 and 860 nm peaking at

Rapport-Gratuit.com

820 nm ascribed to the $P700^+$ radical absorption and removes the plastocyanin absorbance changes. Far-red light (78 μmol m^{-2} s^{-1}), that preferentially excites PSI was obtained by passing the beam from a Filtre-Lite light source (Microview, Thornhill, ON, Canada) through a RG-9 filter (Schott, Mainz, Germany). During the measurement of absorbance changes, the sample was used at a concentration of 75 μg Chl mL^{-1} in an assay medium contained Tricine-KOH buffer (20 mM, pH 7.8). The measurements were performed in the presence of 3 mM MV to prevent charge recombination between $P700^+$ and reduced acceptor side.

Analysis of protein conformation

Analysis of the secondary structure of PSI proteins and its Spm complexes was carried out on the basis of the procedure previously reported [43]. The protein secondary structure is determined from the shape of the amide I band, located around 1650-1660 cm^{-1}. The FTIR spectra were smoothed and their baselines were corrected automatically using Grams AI software. Thus the root-mean square (rms) noise of every spectrum was calculated. By means of the second derivative in the spectral region 1700-1600 cm^{-1} five major peaks for PSI protein and complexes were resolved. The above spectral region was deconvoluted by the curve-fitting method with the Levenberg-Marquadt algorithm and the peaks corresponding 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 and the areas were measured with the Gaussian function. The areas of all the component bands assigned to a given conformation were then summed up and divided by the total area [38, 44]. The curve-fitting analysis was performed using the GRAMS/AI Version 7.01 software of the Galactic Industries Corporation.

Molecular modeling

The docking studies were performed with ArgusLab 4.0.1 software (Planaria Software LLC; http://www.arguslab.com). The structure of plant PSI was drawn from

the reported coordinates [45] (PDB entry: 3BZ1) and the Spm three-dimensional structures were generated from PM3 semi-empirical calculations using Chem3D Ultra 6.0. The docking runs were performed on the ArgusDock docking engine using high precision with a maximum of 150 candidate poses. The conformations were ranked using the Ascore scoring function, which estimates the free binding energy. Upon docking of Spm to PSI, the current configurations were optimized using a steepest descent algorithm until convergence, within 40 iterations, and amino acids residues within a distance of 3.5 Å relative to Spm were involved in the complexation.

RESULTS

Effect of Spm on the absorbance changes at 820 nm in PSI sub-membrane fractions

Before studying the protective action of Spm on the photochemical activity of PSI sub-membrane fractions against photoinhibition, the response of P700 photooxidation to exogenous application of the tetra-amine was analysed. P700 photooxidation is known to estimate the relative photochemical activity of PSI and is measured by the changes of absorbance at 820 nm [8]. This assay is chosen to determine whether Spm affects the PSI function independently from the photoinhibitory treatment. Fig. 1 shows the original traces of far-red light-induced (78 μmole m^{-2} s^{-1}) increase in absorbance changes at 820 nm measured in PSI preparations, in the absence of additive (trace Ctrl) or in the presence of various doses of Spm (traces 1, 3 and 5 mM). The traces of the Ctrl presented a positive change in the absorbance at 820 nm reflecting the rate of P700 photooxidation of the sample. The addition of exogenous Spm to the PSI sub-membrane fractions slightly decreased the rate of P700 photooxidation similarly for all the applied doses (1, 3 and 5 mM). The total amount of the photooxidizable P700 was not significantly altered by the presence of the tetra-amine. Above 5 mM, we observed a weak stimulation of the photooxidizable P700 probably due to an increase of pH due to Spm [46].

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Effect of Spm on O_2 uptake rates in photoinhibited PSI sub-membrane fractions

In order to study a potential protective action of Spm on PSI electron transfer under photoinhibition, we measured the oxygen uptake rates in isolated PSI sub-membranes fractions pre-treated or not with increasing Spm doses and subjected to high light intensities. We first measured the effect of prolonged illumination on the O_2 uptake rates in control samples (Fig. 2A), using the electron donor system TMPD/Asc which provides electron to PC. Fig. 2A shows that the O_2 uptake rates decreased rapidly for the first few minutes of illumination (5 minutes). This may be due to the detachment of some LHCI antenna as reported [15]. Then, the loss of PSI activity slowly declined until 40 minutes. After that, the drop of the O_2 uptake rates increased and almost 45% of the initial activity was lost after 90 minutes of irradiation. This indicated the impairment of electron transport through PSI due to the alteration of its constituent proteins [15,18].

The effect of pre-loading the PSI sub-membrane fractions with increasing Spm concentrations on the activity of 60 min-photoinhibited samples in shown in Fig. 2B. The O_2 uptake rates were reduced by about 25-30% after 60 min of illumination in the absence of Spm. However, with 0.5 mM Spm the activity was reduced by only 10%. At concentrations above 1 mM, Spm did not exert a significant protective action on the O_2 uptake rates in the photoinhibited samples. In contrasts, Spm above 1 mM increased the inhibition of the O_2 uptake rates under excess light. With 5 mM Spm, the drop of PSI activity was about 85% compared to the control. These results indicate that Spm can preserve the PSI activity measured as O_2 uptake against photoinhibition only at low concentration in the PSI sub-membrane fractions but some sites sensitive to Spm are present in the electron transfer chain.

Effect of Spm on absorbance changes at 820 nm in photoinhibited PSI sub-membrane fractions

To gain more information on the effect of Spm on photoinhibited PSI we analysed the P700 photooxidation kinetics. The kinetics were measured in the absence or presence of 5 mM Spm, a dose that coincided with a strong inhibition of the O_2 uptake rates in

photoinhibited samples (Fig. 2B). Fig. 3A (Ctrl) shows a fast initial photooxidation phase, leading to a prolonged steady-state phase. This trace represents the maximum oxidized P700 population obtained in the presence of MV. As observed in Fig. 1, the presence of 5 mM Spm in PSI sub-membrane fractions did not significantly alter the amount of active P700 (Fig. 3A, Ctrl +Spm). However, the exposure of PSI sub-membrane fractions to strong white light (2000 μmole m^{-2} s^{-1}) reduced considerably the rate of P700 photooxidation (Fig. 3A, PI) compared to the untreated control (Ctrl). These results are in agreement with previous studies that reported the sensitivity of the PSI reaction center to high light stress [8,13,14]. Indeed, the decline of these absorbance changes under photoinhibition coincided with the alteration of the P700 reaction center complex and/or the PSI electron acceptors such as A_0, A_1, F_A, F_B and Fx [14]. The addition of 5 mM Spm before photoinhibitory treatment greatly suppressed the loss of the rate of P700 photooxidation (from 35% to 6% after 50 min of irradiation) (Fig. 3A, PI+Spm) compared to samples photoinhibited without Spm. We noted also that with Spm the photoxidizable P700 continued to increase during the illumination with far-red flash.

In order to assess the stability of this protection over the treatment of photoinhibition, we measured the amount of active P700 in the presence of 5 mM at various intervals of time. Our results (Fig. 3B) revealed that, in absence of Spm, the photoxidizable P700 continued to decrease over the time of illumination to reach 45% after 90 minutes. However, preloading the PSI sub-membrane fractions with 5 mM Spm preserved significantly the photoxidizable P700 until the end of the treatment. The decline of active P700 population did not exceed 10%. The photoprotection of the PSI reaction center by Spm reflect also the stability of the proteins of the acceptor side and consequently the PSI complex against the photodamaging stress.

FTIR spectra of Spm-PSI sub-membrane fractions complexes

The infrared spectra of the free PSI sub-membrane fractions and their Spm complexes are shown in Fig. 4. The amide I bands at 1656 (mainly C=O stretch) and

amide II bands at 1545 cm^{-1} (C-N stretching coupled with N-H bending modes) [38,43,44,47], are sensitive to the protein complexation and changes in the secondary structure and widely used for studying protein conformation. The changes of the protein amide I and II bands in the presence of Spm cation indicate major polyamine-protein interaction. Similarly, the infrared self-deconvolution with second derivative resolution enhancement and curve-fitting procedures [43] were used to determine the protein secondary structures in the presence of polyamine (Fig. 4 and Table 1).

Upon addition of Spm, protein amide I at 1656 showed shifting towards lower frequencies (Fig. 4). In addition major intensity increases were observed for amide I band as the spermine concentration increased from 1 to 5 mM (Fig. 4). The spectral changes observed are due to Spm cation binding to protein C=O, C-N and NH groups (hydrophilic interaction). However the spectra changes observed for the amide I band are also coming from alterations of protein conformation upon Spm interaction. A quantitative analysis of the PSI protein secondary structure and its Spm complexes has been carried out and the results are shown in Fig. 4 and Table 1. The protein conformation in PSI sub-membrane fractions includes 52% α-helix (1654 cm^{-1}), 26% β-sheet (1623 cm^{-1}), 9% turn structure (1665 cm^{-1}) and 13% β-antiparallel. (1681 cm^{-1}) as previously reported [48]. Upon Spm cation interaction (10 mM), a major decrease of the α-helix from 52 % (free PSI) to 40%, coinciding with an increase of β-sheet from 26% to 28%, turn from 9% to 14%, and β-anti from 13% to 18% were observed (Fig. 4 and Table 1). The major decrease of α-helix can be attributed to a partial protein unfolding upon Spm complexation.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Docking studies

To predict the binding site of Spm in PSI, we used the docking experiment in which the preferred spermine binding sites are located. The docking results showed Spm binding to different amino acids with both hydrophobic and hydrophilic characters (Fig. 5 and Table 2). The presence of several H-bondings between Spm and amino acids stabilizes the Spm-PSI complexation. The free binding energy of Spm-PSI complex

(- 6.68 kcal/mol) shows spermine-protein interaction is spontaneous at room temperature (Table 2). The Spm bindings to PSI proteins are rather different from those of Spm-PSII complexes [35].

DISCUSSION

The objective of this study is to investigate the binding mode of Spm to the PSI sub-membrane fractions and to evaluate its action on the photo-protection of PSI activity. To our knowledge, this is the first study that reports the modification of the secondary structure of the PSI sub-membrane fractions by the biogenic polyamine spermine. Our results demonstrate that Spm can interact with PSI sub-membrane fractions and protect the PSI photochemical activity against photoinhibition. To explain these results, it should be noted that the PSI sub-membrane fractions contain the Cyt b_6/f complex and PC proteins in its donor side.

The decrease of the α-helix content and the increase of the other protein structural components indicate significant conformational changes induced by Spm in whole or part of the PSI sub-membrane fractions polypeptides. Our results show that Spm can interact with PSI polypeptides (H binding) through C=O groups. The structural changes did not profoundly affect P700 photooxidation that presented only a slight retardation of the rate of P700 oxidation without decreasing the amount of active P700 (Fig. 1). The little decrease of the rate of P700 oxidation may be explained by the increase of the intermolecular distance between some polypeptides in PSI complexes [48] due to Spm interaction. This is confirmed by the docking analysis that demonstrated the preferred site of Spm interaction is located between the PSI core proteins (PsaA, PsaB and cofactors) and the proteins of the stromal acceptor side (PsaC, PsaD and PsaE). Moreover, the unchanged photooxidizable P700 suggested that high doses of Spm did not inhibit the proteins in the acceptor side of PSI under standard conditions. However, this interaction was found to be beneficial for the protection of the PSI reaction center (P700) under high light stress (Fig. 3) and consequently to the PSI electron acceptor chain, usually affected by photoinhibition [14,15]. This photoprotection observed in the

presence of Spm may be related to a direct stabilization of the PSI polypeptides. Generally, it is known that PAs regulated the function of biological membranes [49]. Also, they can preserve the thylakoid membranes integrity and function under stress condition [50]. On the other hand, this stabilization may be due to the antioxidant character of Spm [51-53]. Indeed, the presence of the tetra-amine at or near the site of ROSs generation (F_A and F_B located on PsaC) likely favoured the ROSs scavenging before they damage the PSI polypeptides. Thus, the interaction of Spm with the PSI acceptor side was not harmful for the function of the PSI complex and requires slight conformational changes.

To explain the major modifications of protein structure induced by Spm in the PSI sub-membrane fractions, we suggest that the polyamine may interact with other sites, in the PSI donor side. The measured O_2 uptake rates using the TMPD/Asc (PC electron donor) showed that 5 mM of Spm accentuate the inhibition of electron transfer compared to the photoinhibited control (Fig. 2B), while the P700 is preserved. This indicates clearly that PC protein constitutes a sensitive binding site for Spm, especially in PSI sub-membrane fractions where this luminal protein is directly exposed to the polyamine. The strong inhibition of the O_2 uptake rates by Spm (Fig. 2B) with TMPD/Asc as artificial electron donor to PC is consistent with the major conformational changes of the structure of the PSI sub-membrane fractions (Fig. 4). In fact, PC is known as a mobile protein located in the lumen side of the thylakoid membranes and transfers electron from Cyt b_6/f to P700 [54]. Further, the function of PC may be influenced by the physicochemical variation of its micro-environment [55] such as induced by the presence of Spm. On the other hand, given the importance of conformational change induced by Spm, we cannot exclude the possibility of Spm interaction with the Cyt b_6/f complex as well.

CONCLUSION

The results of the present study revealed that the interaction of Spm with PSI sub-membrane fractions can induce major conformational changes without altering the PSI

photochemical activity (P700 photooxidation). Docking results showed that Spm binds to different amino acids with hydrophilic and hydrophobic characters and the presence of several H-bondings stabilizes Spm-PSI complexes. Moreover, this interaction can provide a protection for the PSI under high light stress. The major structural modifications observed by FTIR analysis were likely related to proteins of the PSI electron donor side. The measure of the O_2 uptake rates showed the sensitivity of PC to the high doses of the polyamine. The generated information is helpful in understanding the mechanism of PSI resistance to light stress at ambient conditions.

REFERENCES

[1] K. Kotzabasis, C. Fotinou, K.A. Roubelakis-Angelakis, D. Ghanotakis, Polyamines in the photosynthetic apparatus photosystem II highly resolved subcomplexes are enriched in spermine, Photosynth. Res. 38 (1993) 83-88.

[2] N. Nelson, A. Ben-Shem, The structure of photosystem I and evolution of photosynthesis Bioessays 27 (2005) 914-922.

[3] A. Ben-Shem, F. Frolow, N. Nelson, Crystal structure of plant photosystem I, Nature (2003) 630-635.

[4] 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.

[5] 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.

[6] R.E. Cleland, D.S. Bendall, Photosystem I cyclic electron transport: Measurement of ferredoxin-plastoquinone reductase activity, Photosynth. Res 34 (1992) 409-418.

[7] H.B. Teicher, H.V. Scheller, The NAD(P)H dehydrogenase in barley thylakoids is photoactivatable and uses NADPH as well as NADH1, Plant Physiol. 117 (1998) 525-532.

[8] 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.

[9] K. Sonoike, The different roles of chilling temperatures in the photoinhibition of photosystem I and photosystem II, J Photochem Photobiol B Biol 48 (1999)136-141.

[10] N. Bukhov, R. Carpentier, Alternative photosystem I-driven electron transport routes: mechanisms and functions, Photosynth. Res. 82 (2004)17-33.

[11] C. Miyake, M. Okamura, Cyclic electron flow within PSII protects PSII from its photoinhibition in thylakoid membranes from spinach chloroplasts, Plant Cell Physiol. 44 (2003) 457-462.

[12] S. Takahashi, A. Tamashiro, Y. Sakihama, Y. Yamamoto, Y. Kawamitsu, H. Yamasaki, High-susceptibility of photosynthesis to photoinhibition in the tropical plant Ficus microcarpa L. f. cv. Golden Leaves, BMC Plant Biology 2 (2002) 2.

[13] I. Terashima, S. Funayama, K. Sonoike, The site of photoinhibition in leaves of cucumis sativus l at low-temperatures is photosystem I, not photosystem II, Planta 193 (1994) 300-306.

[14] S.E. Tjus, B.L. Moller, H.V. Scheller, Photosystem I is an early target of photoinhibition in barley illuminated at chilling temperatures, Plant Physiol. 116 (1998) 755-764.

[15] Y. Hui, W. Jie, R. Carpentier, Degradation of the photosystem I complex during photoinhibition, Photochem. Photobiol. 72 (2000) 508-512.

[16] K. Sonoike, I. Terashima, Mechanism of the photosystem I photoinhibition in leaves of Cucumis sativus L, Planta 194 (1994) 287-293.

[17] S. Rajagopal, N. Bukhov, R. Carpentier, Changes in the structure of chlorophyll-protein complexes and excitation energy transfer during photoinhibitory treatment of isolated photosystem I submembrane particles, J. Photochem. Photobiol. B. 67 (2002) 194-200.

[18] K. Sonoike, I. Terashima, M. Iwaki, S. Itoh, Destruction of photosystem I iron–sulfur centers in leaves of Cucumis sativus L. by weak illumination at chilling temperatures, FEBS Lett. 362 (1995) 235-238.

[19] S. Rajagopal, D. Joly, A. Gauthier, M. Beauregard, R. Carpentier, Protective effect of active oxygen scavengers on protein degradation and photochemical function in photosystem I submembrane fractions during light stress, FEBS Lett. 272 (2005) 892-902.

[20] K. Sonoike, M. Kamo, Y. Hihara, T. Hiyama, I. Enami, The mechanism of the degradation of psaB gene product, one of the photosynthetic reaction center subunits of photosystem I, upon photoinhibition, Photosynth. Res. 53 (1997) 55-63.

[21] H.B. Teicher, B.L. Møller, H.V. Scheller, Photoinhibition of photosystem I in field-grown barley (Hordeum vulgare L.): Induction, recovery and acclimation, Photosynth. Res. 64 (2000) 53-61.

[22] H. Kudoh, K. Sonoike, Irreversible damage to photosystem I by chilling in the light: cause of the degradation of chlorophyll after returning to normal growth temperature, Planta 215 (2002) 541-548.

[23] S. Zhang, H.V. Scheller, Photoinhibition of photosystem I at chilling temperature and subsequent recovery in Arabidopsis thaliana, Plant Cell Physiol. 45 (2004) 1595-1602.

[24] K. Sonoike, Photoinhibition of photosystem I, Physiol. Plant. 142 (2011) 56-64.

[25] K. Sonoike, Various aspects of inhibition of photosynthesis under light/chilling stress: ''photoinhibition at chilling temperatures'' versus ''chilling damage in the light'', J Plant Res 111 (1998) 121-129.

[26] W. Huang, S.B. Zhang, K.F. Cao, Cyclic electron flow plays an important role in photoprotection of tropical trees illuminated at temporal chilling temperature, Plant Cell Physiol. 52 (2010) 297-305.

[27] I. Terashima, K. Noguchi, T. Itoh-Nemoto, Y-M. Park, A. Kubo, K. Tanaka, The cause of PSI photoinhibition at low temperatures in leaves of Cucumis sativus, a chilling-sensitive plant, Physiol Plant. 103 (1998) 295-303.

[28] I. Murgia, D. Tarantino, C. Vannini, M. Bracale, S. Carravieri, C. Soave, Arabidopsis thaliana plants overexpressing thylakoidal ascorbate peroxidase show increased resistance to Paraquat induced photooxidative stress and to nitric oxide-induced cell death, Plant J. 38 (2004) 940-953.

[29] R. Nakano, H. Ishida, M. Kobayashi, A. Makino, T. Mae, Biochemical changes associated with in vivo RbcL fragmentation by reactive oxygen species under chilling-light conditions, Plant Biol 12 (2010) 35-45.

[30] D. Tarantino, C. Vannini, M. Bracale, M. Campa, C. Soave, I. Murgia, Antisense reduction of thylakoidal ascorbate peroxidase in Arabidopsis enhances Paraquat-induced photooxidative stress and Nitric Oxide-induced cell death, Planta 221,(2005) 757-765.

Rapport-Gratuit.com

[31] A.S. Verhoeven, W.W Adams III, B. Demmig-Adams, R. Croce, R. Bassi, Xanthophyll cycle pigment localization and dynamics during exposure to low temperatures and light stress in Vinca major1, Plant Physiol. 120 (1999) 727-737.

[32] A. Alboresi, M. Ballottari, R. Hienerwadel, G.M. Giacometti, T. Morosinotto, Antenna complexes protect Photosystem I from Photoinhibition, BMC PlantBiology 9 (2009) 71.

[33] N.E. Ioannidis, K. Kotzabasis, Effects of polyamines on the functionality of photosynthetic membrane in vivo and in vitro, Biochim. Biophys. Acta 1767 (2007)1372-1382.

[34] E. Navakoudis, C. Lütz, C. Langebartels, U. Lütz-Meind, K. Kotzabasis, Ozone impact on the photosynthetic apparatus and the protective role of polyamines, Biochim. Biophys. Acta 1621 (2003) 160-169.

[35] S. Hamdani, A. Gauthier, N. Msilini, R. Carpentier, Positive charges of polyamines protect PSII in isolated thylakoid membranes during photoinhibitory conditions, Plant cell physiol. 52 (2011) 866-873.

[36] A. Bograh, Y. Gingras, H.A. Tajmir-Riahi, R. Carpentier, The effects of spermine and spermidine on the structure of photosystem II proteins in relation to inhibition of electron transport, FEBS Lett. 402 (1997) 41-44.

[37] R. Beauchemin, J. Harnois, R. Rouillon, H.A. Tajmir-Riahi, R. Carpentier, Interaction of polyamines with proteins of photosystem II: Cation binding and photosynthetic oxygen evolution, J. Mol. Struct. 833 (2007) 169-174.

[38] 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.

[39] S. Nahar, H.A. Tajmir-Riahi, R. Carpentier, A quantitative analysis of protein secondary structure of photosystem II particles and light-harvesting complex of chloroplast thylakoid membranes by FT-IR spectroscopy, J. Mol. Struct. 328 (1994) 115-120.

[40] J. Harnois, N. Msilini, R. Carpentier, Isolation of photosystem I submembrane fractions, in: Photosynth. Res. Prot., 2nd ed., Springer Science, New York (2011) 11-15.

[41] R.J. Porra, W.A. Thompson, P.E. Kriedemann, Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophyll a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy, Biochim. Biophys. Acta 975 (1989) 384-394.

[42] R. Carpentier, B. Larue, R.M. Leblanc, Photoacoustic spectroscopy of Anacystis nidulans: III. Detection of photosynthetic activities, Arch. Biochem. Biophys. 228 (1984) 534-543.

[43] D.M. Byler, H. Susi, Examination of the secondary structure of proteins by deconvoluted FTIR Spectra, Biopolym. 25 (1986) 469-486.

[44] R. Beauchemin, C.N.N' soukpoe-Kossi, T.J. Thomas, T. Thomas, R. Carpentier, H.A. Tajmir-Riahi, Polyamine analogues bind human serum Albumin, Biomacromol. 8 (2007) 3177-3183.

[45] A. Amunts, O. Drory, N. Nelson, N. The structure of a plant photosystem I supercomplex at 3.4 A resolution, Nature 447 (2007) 58-63.

[46] X. Yang, Y.H. Zhang, Z.L. Yang, L.J. Chen, J.L. He, R.F. Wang, pH dependence of photosynthetic behavior of plant photosystem I particles, Russ. J. Plant Physiol. 56 (2009) 599-606.

[47] 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.

[48] S. Rajagopal, N.G. Bukov, H.A. Tajmir-Riahi, R. Carpentier, Control of energy dissipation and photochemical activity in photosystem I by NADP-dependent reversible conformational changes, Biochem. 42 (2003) 11839-11845.

[49] F. Schuber, Influence of polyamines on membrane function, Biochem. J. 260 (1989) 1-10.

[50] A.F. Tiburcio, R.T. Besford, T. Capell, A. Borrell, P.S. Testillano, M.C. Risueño, Mechanisms of polyamine action during senescence responses induced by osmotic stress, J. Exp. Bot. 45 (1994) 1789-1800.

[51] S.J. Jang, S.J. Wi, Y.J. Choi, G. An, K.Y. Park, Increased polyamine biosynthesis enhances stress tolerance by preventing the accumulation of reactive oxygen species: T-DNA mutational analysis of Oryza sativa lysine decarboxylase-like protein 1, Mol. Cells 34 (2012) 251-62.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

[52] H.C. Ha, N.S. Sirisoma, A. Periannan, J.R. Casero, The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95 (1998) 11140-11145.

[53] J.E. Rider, A. Hacker, C.A. Mackintosh, A.E. Pegg, P.M. Woster, R.A. Casero, Spermine and spermidine mediate protection against oxidative damage caused by hydrogen peroxide. Amino Acids 33 (2007) 231-240.

[54] E. L. Gross, Plastocyanin: Structure and function, Photosynth. Res. 37 (1996) 103-116.

[55] K. Sigfridsson, Ionic strength and pH dependence of the reaction between plastocyanin and Photosystem 1. Evidence of a rate-limiting conformational change, Photosyn. Res. 54 (1997) 143-153.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Original traces of light-induced increase in absorbance at 820 nm measured in isolated PSI sub-membrane fractions in the absence of Spm (Ctrl) or in the presence of 1, 3 and 5 mM Spm. Samples were preloaded with 3 mM methyl viologen to prevent recombination between $P700^+$ and reduced PSI acceptors. The results are mean of 6 assays.

Figure 2. (**A**) Changes in the rates of O_2 uptake in PSI sub-membrane fractions during 90 min of intense illumination. The measurements were made with TMPD/Asc system as an artificial electron donor. (**B**) Effect of increasing the Spm concentrations on the O_2 uptake rates in PSI sub-membrane fractions subjected to strong illumination for 60 minutes. The results are mean of 6 assays.

Figure 3. (**A**) original traces of light-induced increase in absorbance at 820 nm measured in isolated PSI sub-membrane fractions in the absence of Spm (Ctrl) and photoinhibited samples (PI) or in the presence of 5 mM Spm (Ctrl+Spm) and photoinhibited samples (PI+Spm). (**B**) Variation of the amount of photooxidizable P700 according to the time of photoinhibition in the absence (PI) or in the presence of 5 mM Spm (PI+Spm). The results are mean of 6 assays.

Figure 4. Curve-fitted amide I band in the region (1700–1600 cm^{-1}) and the secondary structure of free PSI sub-membrane fractions and their Spm complexes (Spm added at 1, 3, 5 and 10 mM).

Figure 5. Best conformation for spermine docked to the PSI structure (PDB entry 3BZ1).

Table1. Secondary structure analysis (FTIR) of PSI sub-membrane fractions and their Spm complexes at different polyamine concentrations

Amide I Components (cm^{-1})	Conformation	Conformation (%) Spermine (mM)				
		0	**1**	**3**	**5**	**10**
1679-1685	β-Antiparallel	13	15	15	18	18
1663-1678	Turn	9	10	10	11	14
1650-1658	α-Helix	52	46	46	42	40
1641-1648	Random	0	0	0	0	0
1613-1640	β-Sheet	26	29	29	29	28

Table 2. Amino acid residues involved in spermine–PSI interaction with the free binding energy for the best selected docking positions

Complexes	Residues involved in the interaction	$\Delta G_{binding}$ (kcal/mol)
Spm– PSI	**Gln-721, Glu-705, Glu-1141*, Glu-1144, His-1142, Leu-1140*, Lys-1143, Lys-1273, Asn-1698, Lys-1721, Phe-1696, Trp-1695, Tyr-1694*, Val-1722**	**- 6.68**

* Hydrogen bonding reported with this residue

Figure 1

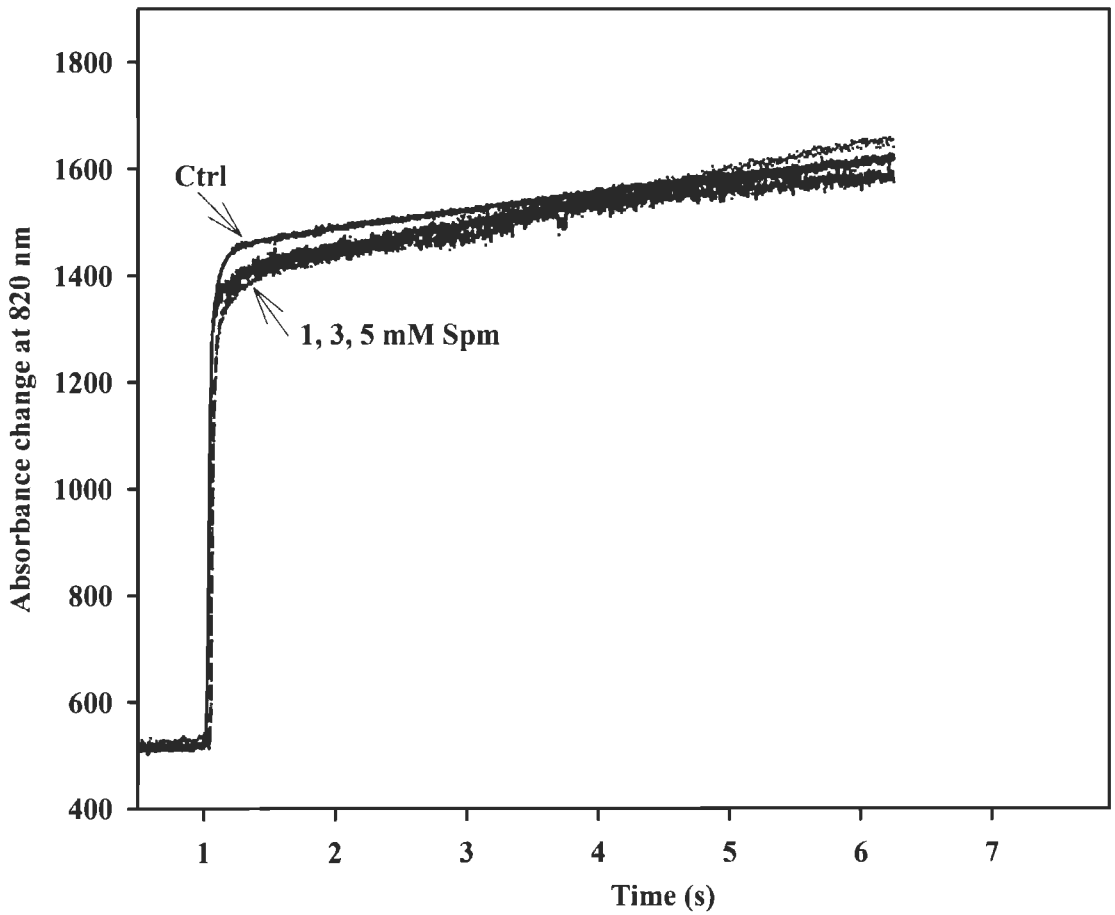
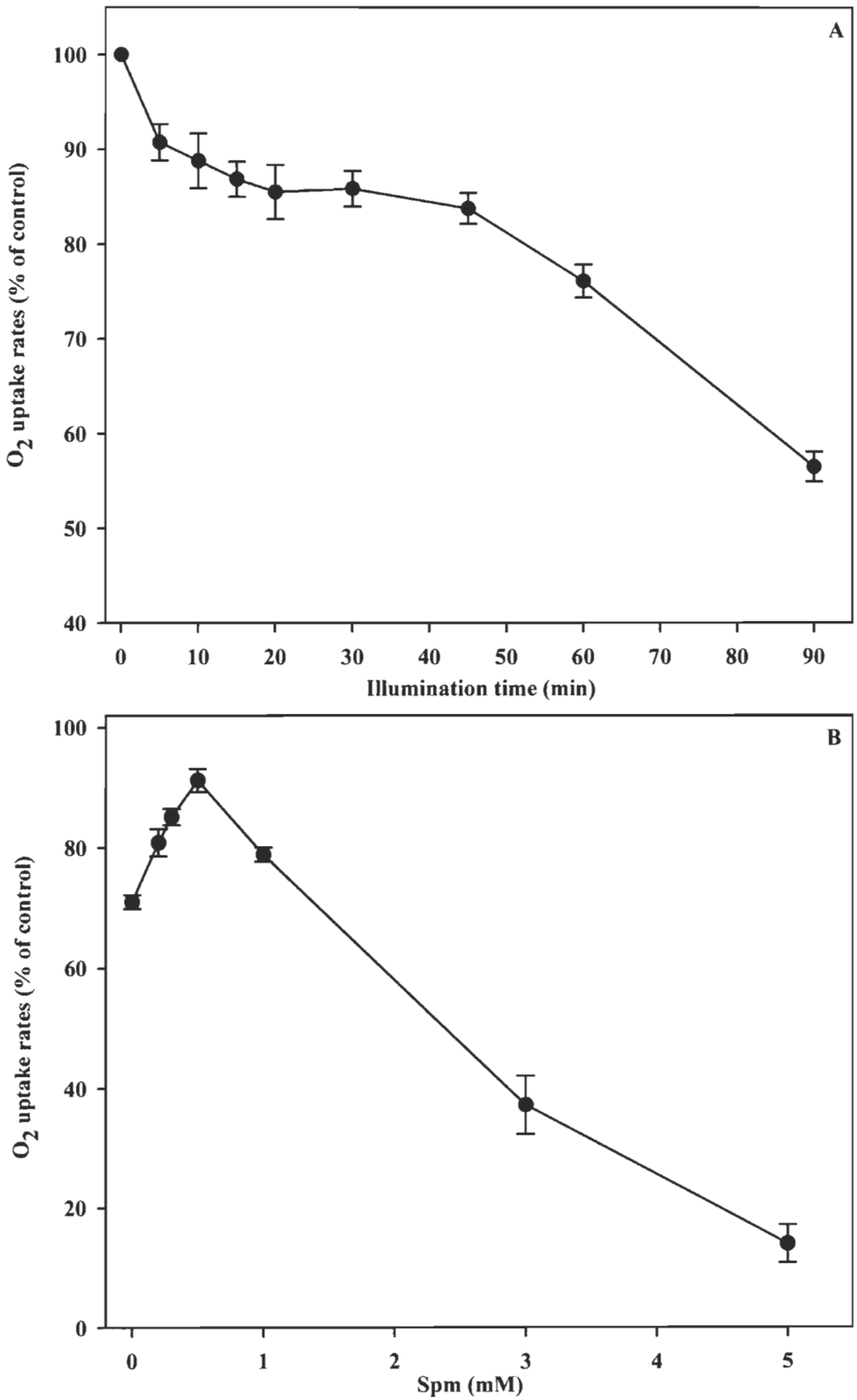

1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
Absorbance change at 820 nm
Ctrl
1, 3, 5 mM Spm
1
2
3
4
5
6
7
Time (s)

Figure 2



Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Figure 3

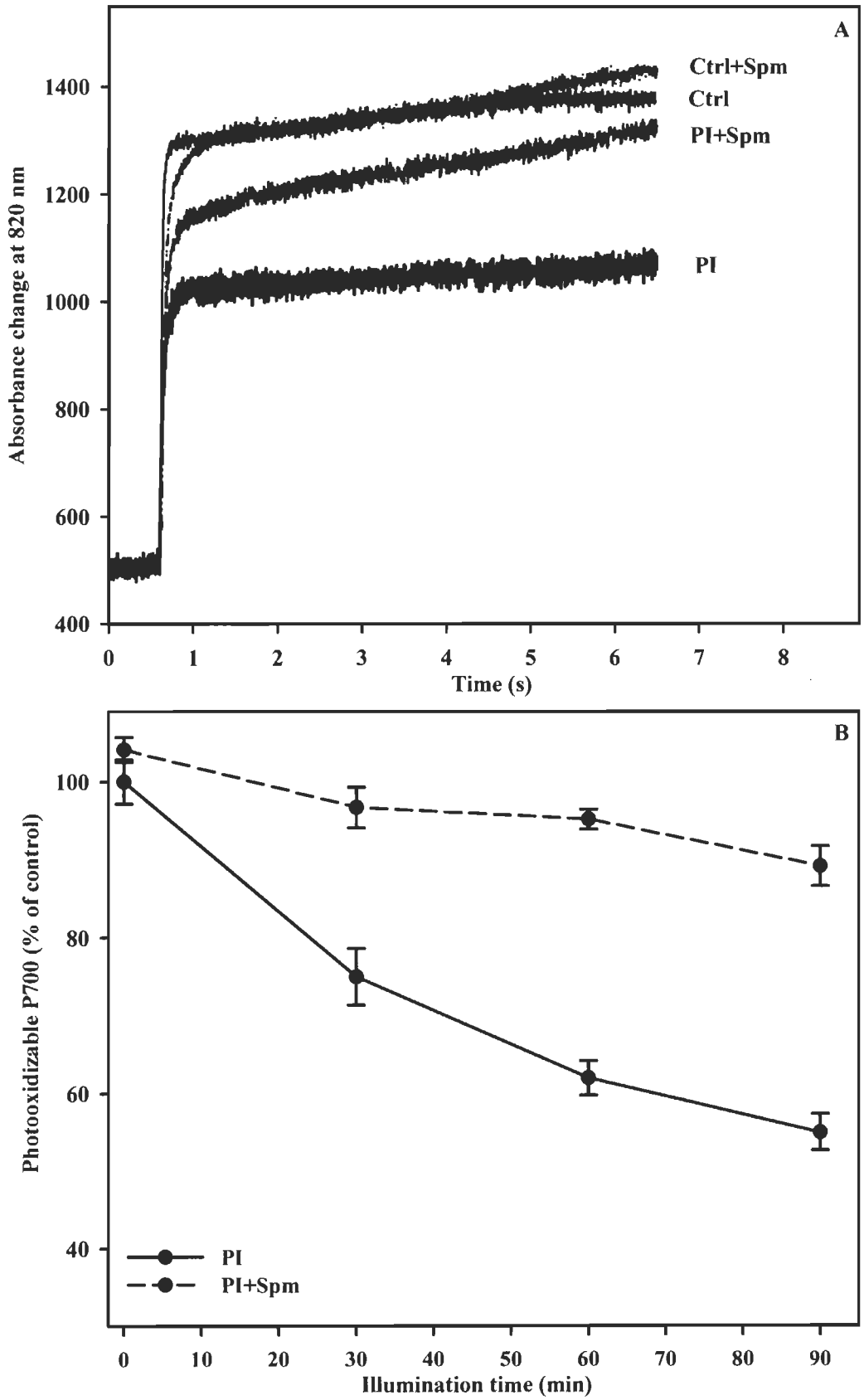
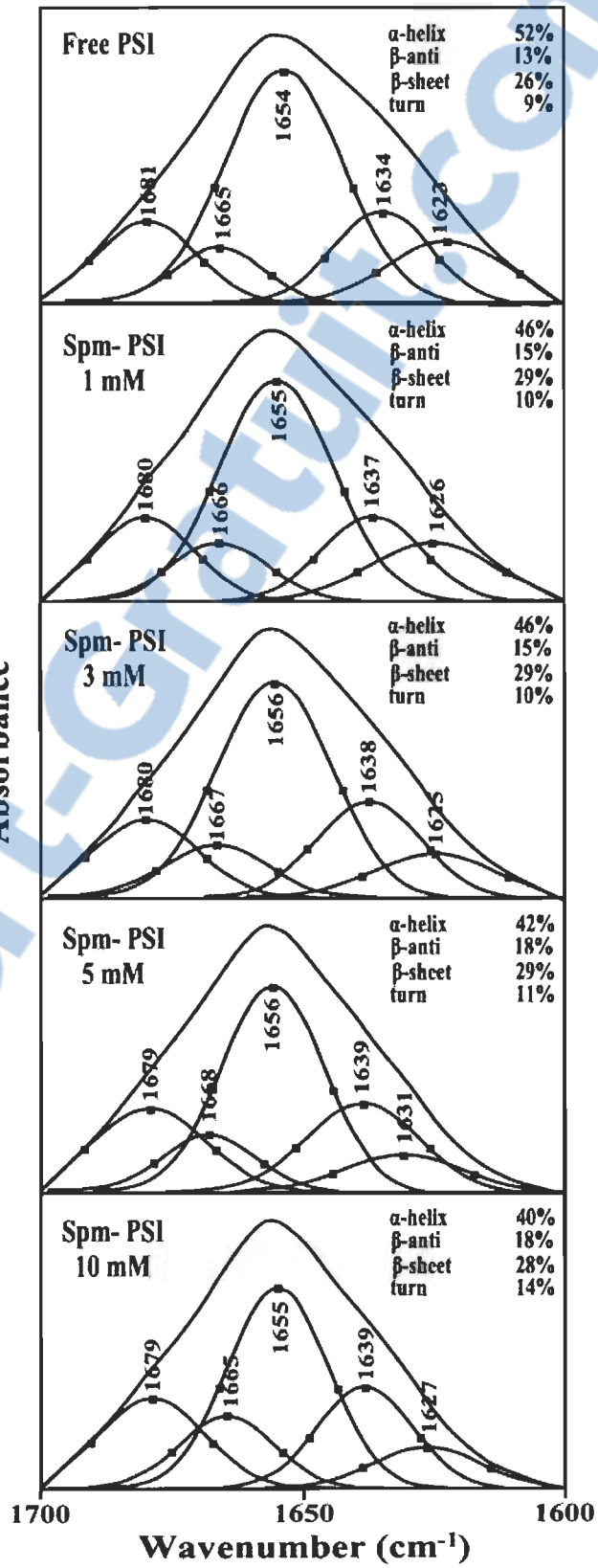
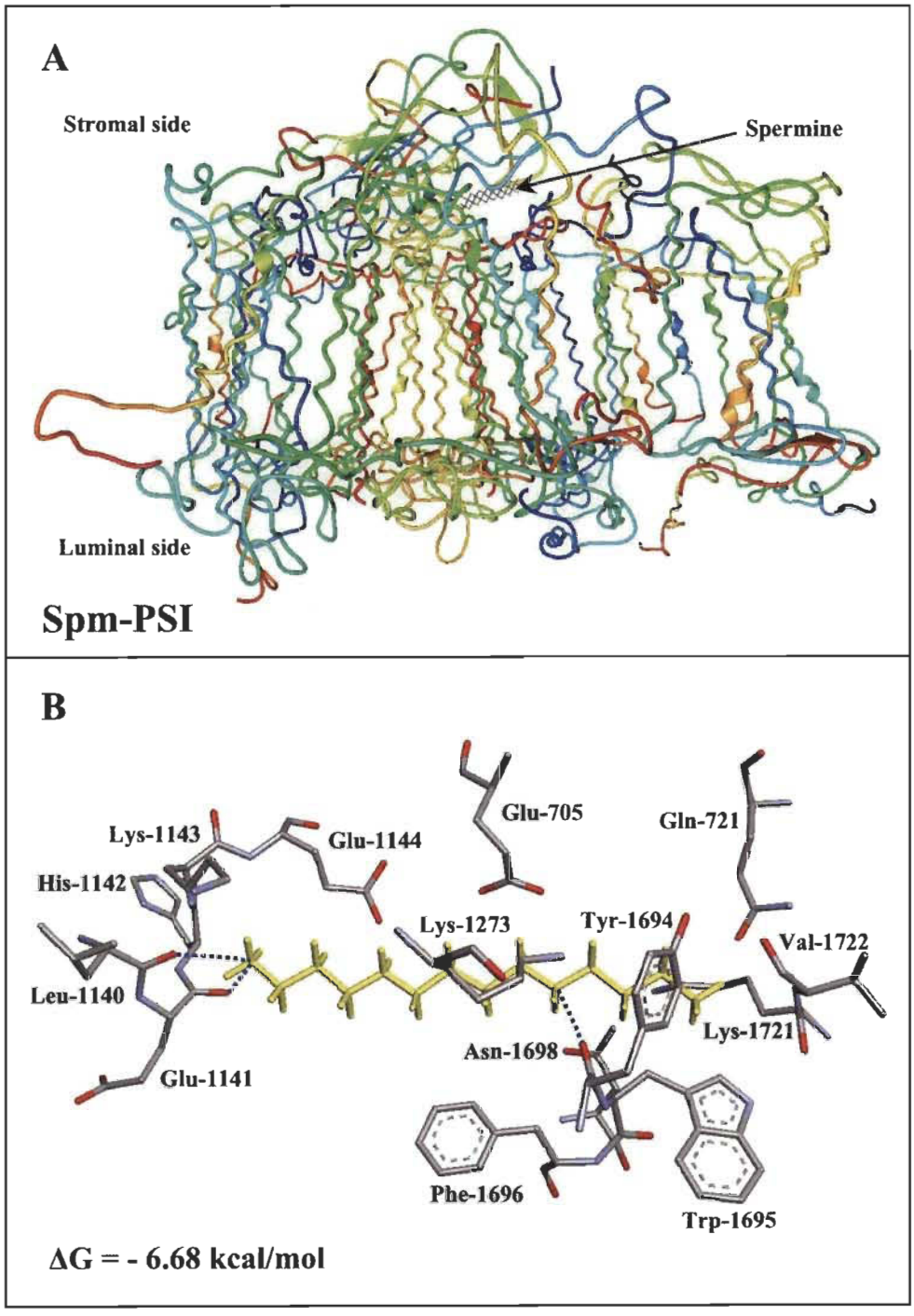

A
Ctrl+Spm
Ctrl
PI+Spm
PI
Absorbance change at 820 nm
1400
1200
1000
800
600
400
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Time (s)
B
Photooxidizable P700 (% of control)
100
80
60
40
PI
PI+Spm
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
Illumination time (min)

Figure 4



Rapport-Gratuit.com

Figure 5


A
Stromal side
Spermine
Luminal side
Spm-PSI
B
Lys-1143
Glu-1144
Glu-705
Gln-721
His-1142
Lys-1273
Tyr-1694
Val-1722
Leu-1140
Lys-1721
Asn-1698
Glu-1141
Phe-1696
Trp-1695
ΔG = - 6.68 kcal/mol

CHAPITRE IV

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

4.1 Conclusion générale

Le contexte général de cette étude concerne la compréhension des mécanismes de protection de l'appareil photosynthétique, lequel constitue une cible pour de nombreux stress environnementaux. Notre étude s'est penchée plus particulièrement sur l'implication des PAs biogéniques qui sont connues pour leurs rôles biologiques variés dans la croissance des plantes (division cellulaire, développement, sénescence, etc.). Une stimulation de l'accumulation des PAs a été observée chez plusieurs espèces végétales soumises à des conditions de stress. Leur association à la réponse de tolérance des plantes a donc été suggérée. Par conséquent, l'investigation de leur rôle potentiel dans la régulation de l'activité photochimique des plantes suscite beaucoup d'intérêt. D'ailleurs, la protection de plusieurs aspects photosynthétiques tels que l'assimilation de CO_2, le contenu en pigments chlorophylliens et l'ultrastructure des chloroplastes a été rapportée. Malgré que ces polycations induisent une réponse positive sur tous ces phénomènes, les connaissances concernant leurs mécanismes d'action précis sont limitées.

L'objectif principal de cette thèse est d'examiner l'implication possible des PAs au cœur des mécanismes qui protègent naturellement le PSI contre la photodégradation à température ambiante. Les résultats obtenus ont permis de caractériser l'action protectrice de la Spm sur l'activité photochimique du PSI sous conditions de stress lumineux et d'élucider les modes d'action impliqués dans sa photoprotection. Nos résultats ont permis aussi de déterminer le site d'action de cette polyamine ainsi que la nature de son interaction avec les constituants du complexe PSI. On peut dire que l'ensemble des résultats obtenus confirme l'atteinte de nos objectifs spécifiques, et montre l'importance de l'action des PAs dans la protection de l'activité photochimique du PSI contre les effets de photoinhibition.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

4.1.1 Investigation de l'action protectrice de la Spm sur le PSI sous conditions de photoinhibition

4.1.1.1 Investigation de l'action protectrice de la Spm et de la Spd

Le chapitre II traite l'étude de l'action protectrice de la Spm et de la Spd sur l'activité photochimique du PSI dans des membranes de thylacoïdes. Tout d'abord, nous avons évalué l'impact de l'application d'une forte intensité de lumière sur l'activité du PSI dans des extraits de membranes thylacoïdales *in vitro*. L'activité générale de transport des électrons à travers le PSI a été déterminée par mesure de la consommation d'O_2 en utilisant le donneur artificiel d'électrons : 2,6-dichlorophenol indophenol ($DCPIPH_2$) au niveau du Cyt f. Puis, l'activité spécifique du PSI a été estimée par la mesure du changement d'absorbance à 820 nm suite à la photooxydation de la chlorophylle spéciale P700 par un flash de lumière rouge lointain. Nos résultats montrent que l'application d'une forte intensité de lumière sur des extraits de membranes thylacoïdales durant 30 minutes induit une diminution importante de la consommation d'O_2, qui atteint 75 % à la fin du traitement (Figure 1A, chapitre II). Parallèlement, le taux de photooxydation de P700 ainsi que la quantité de P700 photooxydable ont été clairement réduits (Figures 2A et 2B, chapitre II). Cette réduction de l'activité photochimique du PSI est une caractéristique de la perturbation du fonctionnement générale du PSI sous l'effet de la photoinhibition [1].

L'analyse de l'état du stress oxydatif dans l'échantillon photoinhibé révèle que l'inactivation du PSI est accompagnée d'une accumulation excessive de plusieurs ROSs tels que le $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 et $OH^{\cdot}$ mesurés par la photoréduction du nitro-bleu de tétrazolium et la fluorescence du dichlorofluoréscine (Figure 3, chapitre II et Figure 4.1). L'inhibition de l'activité du PSI est donc expliquée par l'oxydation de ses polypeptides, notamment les protéines du côté accepteur (PsaC, PsaD, PsaE) et les cofacteurs d'oxydoréduction (P700, A_0, A_1, Fx, F_A et F_B) par ces ROSs. Dans les conditions de stress extrême, survient alors la dégradation des protéines du cœur (PsaA et PsaB) aboutissant à un endommagement total du PSI [2,3]. Nos résultats constituent une

preuve directe de l'implication des ROSs dans l'inactivation de PSI et confirment donc les données de la littérature.

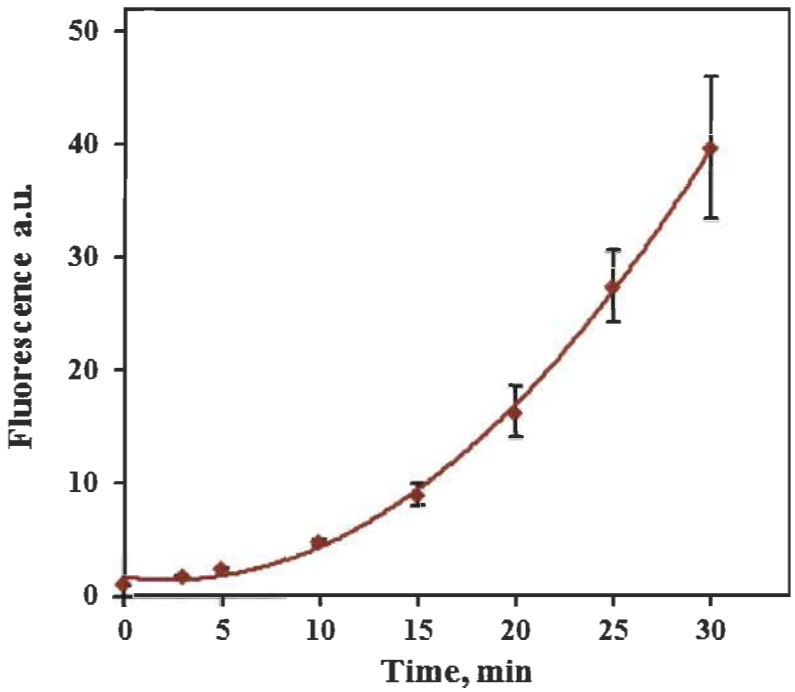


Figure 4.1 Accumulation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et du radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$) durant la photoinhibition des membranes des thylacoïdes, mesuré par fluorescence du dichlorofluoréscine.

Avant d'aborder l'investigation de l'effet photoprotecteur de la Spm sur le PSI, nous avons examiné la réponse de ce photosystème à des concentrations croissantes de cette PA dans les conditions standards (à l'obscurité). Il est intéressant de mentionner que les résultats obtenus révèlent que l'ajout de fortes concentrations (5-7 mM) de Spm, à la solution des thylacoïdes, n'affecte pas négativement le fonctionnement du PSI (Figure S1, chapitre II). Ces résultats diffèrent de ce qui a été rapporté avec l'étude de l'impact de ces mêmes doses de PA sur le complexe du PSII. On en déduit que le PSI est plus résistant aux variations des niveaux de PAs dans le chloroplaste que le PSII.

Ensuite, nous avons étudié l'influence de l'ajout d'une dose physiologique (1 mM) et non-physiologique (2 mM) de Spm sur des échantillons de membranes de thylacoïdes exposés à une forte lumière pendant 30 minutes. Les résultats obtenus montrent que le

prétraitement des échantillons avec la Spm réduit l'inhibition de la consommation d'O_2 (Figure 1A, chapitre II) et de la photooxydation du P700 (Figure 2A, chapitre II). Elle induit aussi une diminution des taux de génération de l'$O_2^{\cdot}$ dans les thylacoïdes photoinhibés (Figure 3, chapitre II), ce qui révèle que la présence de Spm dans la solution des thylacoïdes a pu préserver le fonctionnement d'une fraction des PSI suite à la stabilisation de leurs constituants contre les dommages de la photoinhibition. Ceci concorde bien avec la tendance générale de l'implication des PAs dans la protection de l'appareil photosynthétique [4,5].

Vu le manque de connaissances dans la littérature concernant l'effet des PAs sur le PSI, nous avons cherché à identifier la concentration optimale de Spm qui fournirait une protection maximale de son activité. Pour cela, nous avons évalué la réponse du PSI dans des échantillons de membranes thylacoïdales incubés avec des concentrations croissantes de Spm, puis exposés à une forte illumination dans les mêmes conditions. Les résultats obtenus montrent que la protection de la consommation d'O_2 (Figure 1B, chapitre II) et de la photooxydation du P700 (Figure 2B, chapitre II) s'accroit au fur et à mesure que la dose de Spm ajoutée à l'échantillon augmente. La protection de l'activité du PSI atteint un maximum à une concentration de 7 mM Spm. Cette réponse est associée à une diminution considérable de l'accumulation de $O_2^{\cdot}$ (Figure 4B, chapitre II) et par conséquent des ROSs qui en dérivent (H_2O_2 et $OH^{\cdot}$). Ainsi, la protection du PSI peut être expliquée par la stabilisation de ses protéines suite à la réduction des dommages induits par le stress oxydatif. Toutefois les résultats rapportés dans cette étude montrent clairement que les degrés de photoprotection du PSI induits par la Spm sont de loin supérieurs à ceux observés pour le PSII photoinhibé dans des conditions similaires [5]. Il en est de même pour les niveaux de concentration appliqués sur l'échantillon et qui dépassent les limites physiologiques.

D'autre part, pour voir si cette réponse est spécifique à la Spm ou elle constitue une caractéristique générale aux PAs biogéniques, nous avons comparé l'effet protecteur de la Spm à celui de la Spd et de la Put sur le PSI dans des thylacoïdes photoinhibés. Il s'est avéré que l'ajout de Spd aux mêmes doses que la Spm induit une réponse

comparable, mais d'une moindre importance (Figures 1B et 2B, chapitre II). La protection du fonctionnement du PSI en présence de Spd est aussi due à la réduction des effets du stress oxydatif (Figure 6B, chapitre II). Cependant, l'addition de Put aux membranes de thylacoïdes n'induit pas d'effet protecteur significatif pour toute la gamme de concentrations testée (Figure 4.2). Ainsi, on peut considérer la Spm comme la meilleure pour la protection du fonctionnement du PSI. D'ailleurs, à 7 mM, seule la Spm a pu préserver totalement l'activité de photooxydation du P700. Ceci laisse suggérer que la différence dans l'action de ces PAs peut être reliée à certaines de leurs propriétés physicochimiques (qui seront détaillées dans une section ultérieure).

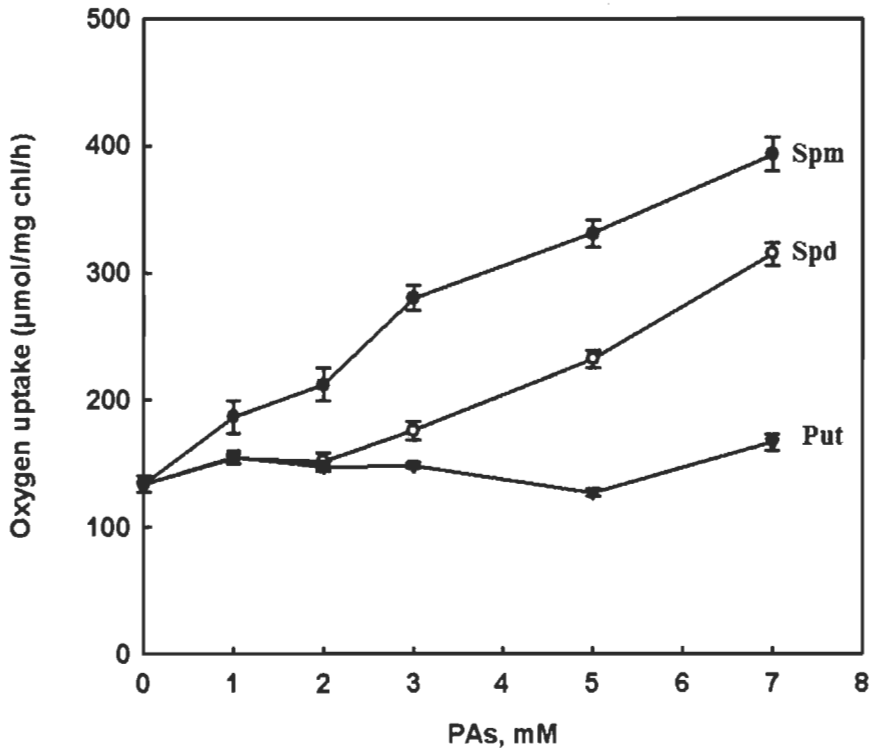


Figure 4.2 **Comparaison de l'effet protecteur de la spermine (Spm), la spermidine (Spd) et de la putrescine (Put).**
La figure montre les taux de consommation d'oxygène mesurés dans les membranes de thylacoïdes photoinhibées en présence de concentrations croissantes de ces trois polyamines.

En conclusion à cette partie, nos résultats rapportent pour la première fois une protection spectaculaire de l'activité du PSI contre la photoinhibition *in vitro*, avec des concentrations non physiologiques de Spm et de Spd. L'importance de la réponse de

protection du PSI dans des membranes de thylacoïdes nous a incités à investiguer davantage les mécanismes de protection de ces PAs et de comprendre le rôle de la concentration. Cela permettra de savoir si la protection à forte concentration résulte de l'effet d'un seul mécanisme ou si elle en implique plusieurs.

4.1.1.2 Caractérisation des mécanismes d'action de la Spm et de la Spd dans la photoprotection du PSI

La protection de l'activité du PSI dans les membranes de thylacoïdes par la Spm et la Spd est accompagnée par une réduction de l'accumulation des ROSs générés par l'excès de lumière au niveau du PSI. Plus précisément, l'ajout de dose physiologique (1 mM) de Spm ou de Spd a réduit la génération de $O_2^{\cdot}$ (Figure 3, chapitre II) qui constitue le précurseur de formation d'autres espèces telles que H_2O_2 et $OH^{\cdot}$. Ce résultat montre que l'action protectrice de ces PAs est due à une amélioration du système de défense antioxydant. Cette amélioration est, probablement, attribuée au caractère antioxydant des PAs comme il est rapporté dans la littérature [6]. Par ailleurs, on n'exclut pas la possibilité que la réduction des ROSs pourrait être due à la protection, par les PAs, de l'activité des enzymes antioxydantes associées aux PSI (SOD et APX). En effet, ces enzymes sont souvent désactivées par l'excès de lumière, et constituent la cause de l'augmentation du stress oxydatif dans le matériel photosynthétique [7].

La préservation du fonctionnement du PSI en présence de doses non physiologiques de Spm et de Spd est aussi associée à une réduction importante de l'état du stress oxydatif dans l'échantillon photoinhibé (Figure 4B et 6B, chapitre II). Toutefois, la réduction de l'accumulation d'$O_2^{\cdot}$ implique un autre mécanisme différent du précédent, dont le degré de participation dépend de la dose de PA ajouté. Ce mécanisme consiste à inhiber le transport d'électrons du PSII vers le PSI par les PAs, ce qui diminue la source de génération d'$O_2^{\cdot}$. Cette constatation a été fondée sur le fait de l'implication du PSII dans le fonctionnement du PSI (grâce aux électrons qu'il lui fournit) mais aussi, sur la sensibilité du PSII aux fortes concentrations de Spm et de Spd observée dans des membranes enrichies en PSII [8]. Cette suggestion est confirmée aussi par l'analyse de la corrélation des résultats de l'inhibition du PSII par les deux PAs

(mesurée dans des membranes de thylacoïdes à l'obscurité) avec la protection du PSI (exprimée en photooxydation du P700 et en consommation d'O_2) et l'inhibition de l'accumulation du O_2^- (Figures 4 et 6, chapitre II). Cette analyse a été réalisée pour une même gamme de concentration (1-7 mM). La corrélation a permis de distinguer deux phases correspondantes aux mécanismes suggérés dans la protection du PSI : antioxydant direct (à concentration physiologique ≈1 mM) et inhibiteur de PSII (à concentration non physiologique ≥ 1,5 mM). Toutefois, pour les concentrations d'ordre non physiologique, on n'exclut pas le fait que le mécanisme antioxydant soit aussi impliqué dans la protection du PSI, en plus de l'inhibition du PSII (à l'exception de la dose 7 mM Spm). En ce qui concerne les résultats de l'accumulation de O_2^-, les deux phases sont séparées par une zone intermédiaire où on a noté une augmentation de la génération de O_2^- à des concentrations aux alentours de 2 mM Spm. Cette augmentation semble être une perturbation due au chevauchement des deux mécanismes suggérés.

L'implication de l'inhibition du PSII dans la protection du PSI contre les effets de la photoinhibition a été confirmée par l'utilisation du 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU) comme inhibiteur artificiel du transport d'électron au niveau du PSII. En effet, le prétraitement des thylacoïdes avec 1 mM DCMU a induit la préservation totale de l'activité du PSI pendant une période d'illumination de 30 minutes (Figure 5, chapitre II). Ces mesures ont permis de déduire que la protection de la photooxydation du P700 à 7 mM Spm est due à l'inhibition totale du transport d'électrons en provenance du PSII (Figure 4A, chapitre II). L'effet indirect de la Spm dans la protection du PSI peut être considéré comme une forme de régulation de transfert d'électrons entre les deux photosystèmes.

4.1.1.3 Importance du nombre de charges positives dans la photoprotection du PSI

La différence dans l'efficacité de protection entre les trois PAs (Spm, Spd et Put) est probablement reliée à la différence de leurs propriétés intrinsèques à savoir le nombre de charges positives, comme il a été rapporté par Hamdani et ses collaborateurs

[5]. Ces auteurs ont suggéré que plus le nombre de charges positives de la PA est élevé, plus sa liaison avec les protéines est forte et, par conséquent, sa réactivité est importante. Par analogie, on rapporte que la Spm avec quatre charges positives (4+) est plus efficace que la Spd à trois charges (3+) et la Put à deux charges (2+).

Pour confirmer l'influence de la charge positive sur la protection du PSI, nous avons comparé l'effet protecteur de la Spm à celui de deux PA artificielles qui sont la Dd et la Da. En effet, ces trois PAs sont des analogues de taille (10 carbones) qui diffèrent seulement par le nombre de charges positives : 4+, 2+, et 1+ respectivement pour la Spm, la Dd et la Da. Les échantillons membranaires ont été prétraités par une concentration physiologique de 1 mM pour les trois PAs, puis photoinhibés dans les mêmes conditions. Les résultats obtenus montrent que la Dd ne présente pas d'effet protecteur intéressant contre la photoinhibition (≈5 %), alors que l'effet de la Da est complètement nul. On en déduit que le pouvoir protecteur de la PA, dans cette étude, peut être relié au nombre de charges positives. Plus précisément, on suggère que la distribution spatiale de la charge sur la PA constitue un facteur déterminant pour l'efficacité de protection. Car, malgré la présence de deux charges positives sur la Put et la Dd, les deux PAs se révèlent inefficaces. En effet, la répartition de la charge sur l'amine peut renforcer son interaction avec des sites spécifiques dans la membrane thylacoïdale, y compris les protéines du PSI, et facilite ainsi l'exécution de son rôle antioxydant ou stabilisateur de protéines.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

De même, pour les concentrations d'ordre non physiologique (>1.5 mM), il semble que la charge positive joue un rôle important dans les niveaux d'inhibition du PSII (Figures 4A et 6A, chapitre II). En effet, des études effectuées au sein de notre équipe de recherche révèlent que le degré d'inhibition de ce photosystème est proportionnel au nombre de charges positives de l'amine utilisée [9]. Ainsi, il a été rapporté que la Spm (4+) est plus efficace que la Put (2+), elle-même plus efficace que la méthylamine (1+) dans la réduction de l'activité du PSII.

D'autre part, pour confirmer que la variation de la taille de l'amine n'a pas d'influence sur l'inhibition du PSII, des expériences comparant l'effet de PAs ayant le même nombre de charges positives, mais des tailles différentes ont été réalisées. Les trois PAs testées sont la diaminopropane, la Put et la cadaverine formées de 3, 4, et 5 carbones respectivement et portant toutes 2+ [10]. Les résultats obtenus montrent que la variation de la taille des amines n'affecte pas le degré d'inhibition de l'activité du PSII. Ce qui confirme bien que c'est le nombre de charges positives qui est à l'origine de cet effet. Ainsi, on peut conclure que dans tous les cas, la réactivité de la Spm et de la Spd est en étroite relation avec leur caractère polycationique, et que la Spm avec ses 4+ est la meilleure candidate pour la protection du PSI parmi toutes les PAs testées.

4.1.2 Action protectrice de la Spm sur des membranes enrichies en PSI

Puisqu'une importante fraction de la protection observée sur le PSI dans les membranes de thylacoïdes est attribuée à l'inhibition du transport d'électron au niveau du PSII, nous avons trouvé intéressant de vérifier si la Spm est capable de protéger directement le PSI, indépendamment de son effet sur le PSII. Pour confirmer le rôle protecteur de la Spm sur le complexe du PSI, nous avons testé l'impact de l'augmentation de sa concentration sur des membranes enrichies en PSI. Ce matériel photosynthétique est formé de fractions de membranes thylacoïdales comportant le complexe PSI, le Cyt b_6f et la PC, et dépourvu des complexes du PSII.

L'étude de l'effet de la photoinhibition sur l'activité du PSI, avant l'ajout de Spm montre que la cinétique d'inhibition de l'activité du PSI dans les membranes enrichies diffère de celle dans les membranes thylacoïdales étudiées au début (Figure 2A, chapitre III et Figure 1A, chapitre II). De plus, pour une même période d'illumination (30 minutes), l'activité du PSI est moins affectée dans les membranes enrichies (27 %) que dans les thylacoïdes (75 %). Ceci confirme bien l'influence de la présence du PSII sur le fonctionnement du PSI et sur son inhibition. En effet, le PSII fournit la principale fraction des électrons qui traversent le PSI et qui constituent l'origine de la formation des ROSs. De plus, l'inactivation du PSII dans les membranes de thylacoïdes (lors de

Rapport-Gratuit.com

l'inhibition du PSI) induit une réduction prolongée de l'accepteur Q_B, qui constitue une autre source de génération d'O_2^- dans le milieu. Cette augmentation de la quantité des ROSs accumulés amplifie le niveau du stress oxydatif dans les membranes de thylacoïdes et affecte davantage l'activité du PSI [5].

En ce qui concerne l'étude de l'impact de la Spm sur l'activité du PSI dans des membranes enrichies en PSI exposées à la photoinhibition, le fonctionnement du PSI a été estimé par la consommation d'O_2 et la photooxydation du P700. La mesure de la consommation d'O_2 a été réalisée en présence du donneur d'électron N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD réduit). Nos résultats montrent une légère protection de la consommation d'O_2 pour des faibles concentrations (aux alentours de 0,5 mM). Cependant, l'augmentation des concentrations ajoutées aux échantillons n'induit pas seulement la perte de l'effet positif observé à 0,5 mM, mais aussi l'aggravation de l'inhibition du transport d'électrons à travers le PSI (Figure 2B, chapitre III). Ces résultats vont à l'encontre de ceux observés avec les membranes de thylacoïdes où une protection importante de la consommation d'O_2 a été rapportée (Figure 1B, chapitre II). Pour mieux vérifier l'action de la Spm sur l'activité photochimique du complexe PSI, dans les mêmes conditions, l'oxydation du P700 a été mesurée après prétraitement de l'échantillon par 5 mM Spm. Les résultats obtenus montrent que cette concentration (non physiologique) réduit clairement l'effet inhibiteur de la photoinhibition sur l'activité photochimique du PSI (Figure 3A, chapitre III). Cet effet protecteur de la Spm concorde avec les résultats des membranes thylacoïdales. La protection du fonctionnement de PSI par la Spm est cette fois-ci directe; sans l'influence de l'inhibition du PSII. Aussi, elle est supérieure à celle observée sur les membranes de thylacoïdes en présence d'une concentration physiologique. On en déduit que la Spm peut jouer un rôle important dans la préservation de l'intégrité des constituants du complexe protéique du PSI contre l'effet du stress oxydatif.

4.1.3 Détermination du site d'action de la Spm dans le complexe PSI

Dans le but de déterminer le site d'action de la Spm lors la protection du PSI, nous avons étudié l'influence de cette PA sur la composition des protéines en structures secondaires. Pour cela, des échantillons de membranes enrichies en PSI prétraités ou non avec la Spm ont été analysés grâce à la technique de FTIR. Les résultats de FTIR montrent que l'ajout de 1 mM de Spm est suivi d'une modification de la structure des protéines dans la préparation membranaire (Tableau 1, chapitre III). Ce changement conformationnel révèle l'interaction de la Spm avec certains polypeptides de l'échantillon analysé. Toutefois, l'augmentation de la concentration de Spm ajouté (5 et 10 mM) induit une perturbation importante de la structure secondaire des protéines (Figure 4, chapitre III). Cette perturbation majeure est reflétée par la diminution des hélices α et l'augmentation des feuillets β et des coudes suite aux dépliements de certaines structures protéiques. Dans les mêmes conditions expérimentales, ces concentrations n'affectent pas l'activité photochimique du PSI mesuré par la photooxydation du P700 (Figure 1, chapitre III). Ce qui révèle que la perturbation structurale observée par la FTIR, ne semble pas due à la dénaturation des protéines du complexe du PSI après interaction avec la Spm. Plus tôt, elle devrait résulter de la sensibilité d'un ou de plusieurs transporteurs d'électrons du côté donneur du PSI.

Puisque l'inhibition de la consommation d'O_2 en présence de Spm a été réalisée en présence du TMPD réduit qui donne ses électrons à la PC (Figure 2B, chapitre III), on conclut que la PC est une cible certaine pour la Spm, sans toutefois exclure la possibilité de l'inhibition du complexe Cyt b_6f. Le degré d'inhibition de l'activité de transport d'électron à partir de la PC (à 5 mM Spm) concorde bien avec le changement conformationnel majeur induit par l'interaction de la Spm avec les membranes enrichies en PSI (Figure 4, chapitre III). Ceci explique mieux les contradictions observées et qui se rapportent à la perturbation structurale des protéines d'une part et la préservation de l'activité photochimique du PSI d'autre part.

Fait intéressant, c'est que la mesure de la consommation d'O_2 dans les membranes de thylacoïdes ne révèle pas d'inhibition même à fortes doses de Spm et de Spd, bien

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

que cette mesure ait été réalisée en utilisant la $DCPIPH_2$ (Figure 1B, chapitre II). Il est connu que ce dernier donne ses électrons au Cyt f qui les transfèrent ensuite au PSI à travers la PC. De plus, dans les conditions standards, la consommation d'O_2 n'a pas été inhibée, au contraire, elle a été légèrement stimulée (Figure S1, chapitre II). Ceci prouve que la préservation du fonctionnement de la PC dans ces conditions est, probablement, attribuée à la conservation de l'architecture des thylacoïdes comparativement aux membranes enrichies. En effet, l'organisation des thylacoïdes permet la compartimentation efficace de différentes protéines membranaires, dont la PC qui se trouve dans le lumen. Toutefois, la sensibilité de la PC augmente lorsque celle-ci est exposée directement à de fortes concentrations de Spm, tel est le cas dans les fragments membranaires enrichis en PSI. D'ailleurs, il a été montré que l'activité de la PC peut être affectée par les variations physicochimiques de son microenvironnement [11].

Pour déterminer d'éventuel site de fixation de la Spm sur le complexe PSI, on a poussé l'investigation en utilisant l'expérience de modélisation moléculaire. Cette technique nous a permis de localiser l'interaction de Spm sur la structure cristalline de PSI de plante supérieure (Figure 5A, chapitre III). L'analyse des résultats montre que le site préférentiel de fixation de la Spm sur le PSI est situé entre les protéines stromatiques hydrophiles (PsaC, PsaD et PsaE), porteuses des accepteurs finaux d'électrons, et les protéines du cœur du PSI. La Spm interagit avec les polypeptides du PSI via des liaisons hydrogènes avec une énergie libre de liaison (ΔG) de -6,68 kcal/mol, ce qui montre que cette interaction est spontanée. Aussi, l'interaction de la Spm se fait avec des acides aminés de nature hydrophile et hydrophobe à trois sites différents Glu-1141; Leu-1140; Tyr-1694 (Figure 5B et Tableau 2, chapitre III). Ce qui augmente la stabilité des polypeptides du côté accepteur du PSI. Toutefois, cette interaction n'est pas sensée induire une modification structurale majeure (telle qu'observé par FTIR à 5 mM Spm) puisqu'elle n'inhibe pas l'activité du PSI à l'obscurité (Figure 1, chapitre III). Au contraire, elle s'est avérée bénéfique pour la protection de l'activité photochimique du PSI sous condition de photoinhibition (Figure 3A, chapitre III).

On rapporte aussi que la position de fixation de la Spm sur le complexe du PSI déterminée par modélisation (Figure 4.3) est située à proximité du site de génération des ROSs proposé dans la littérature [12]. Ce qui facilite, probablement, l'élimination de ces espèces par la Spm, comme il a été démontré par les résultats dans la figure 3 du chapitre II. De plus, la localisation de l'interaction de la Spm à ce niveau-là (avec les protéines stromatiques) permet d'envisager une autre possibilité pour son mode d'action. C'est que, par cette interaction, la Spm peut constituer un bouclier masquant les sites d'oxydation du radical $OH^{\cdot}$ sur les accepteurs d'électron finaux (Fx, FA et FB). Ce qui réduit les dommages oxydatifs dans les structures protéiques du complexe, empêchant ainsi l'accès des protéases qui dégradent les protéines du cœur.

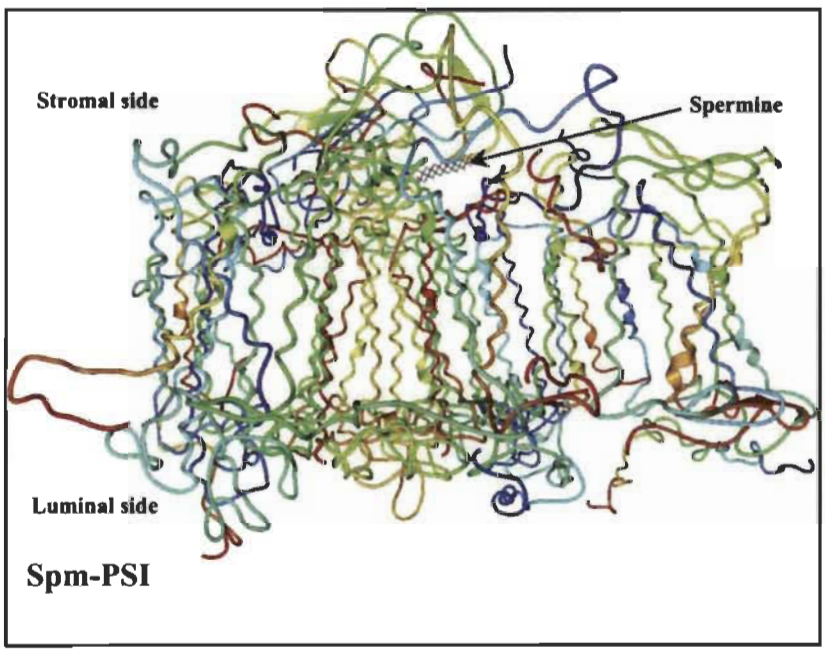


Figure 4.3 Meilleure conformation pour la complexation de la spermine avec la structure cristalline du photosystème I, réalisée par modélisation moléculaire. La spermine interagit avec les acides aminés à distance de 3.5Å.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats confirme bien l'interaction directe de la Spm avec les polypeptides du côté accepteur du PSI. Par analogie au site de fixation de la Spm observé sur la structure cristalline du PSI (Figure 4.3), le schéma de la figure 4.4 montre l'interaction de cette PA avec les polypeptides correspondants et ses conséquences sur le PSI en condition de stress lumineux. En effet, cette interaction a pu

limiter les dommages causés par la photoinhibition suite à l'augmentation de la stabilité des protéines stromatiques, grâce à l'influence des liaisons hydrogènes. Mais aussi, à la réduction de la génération des ROSs source de l'oxydation des lipides et des protéines au niveau de la membrane thylacoïdale. Le rôle protecteur de la Spm sur l'appareil photosynthétique est favorisé par sa propriété d'antioxydant et par sa nature polycationique.

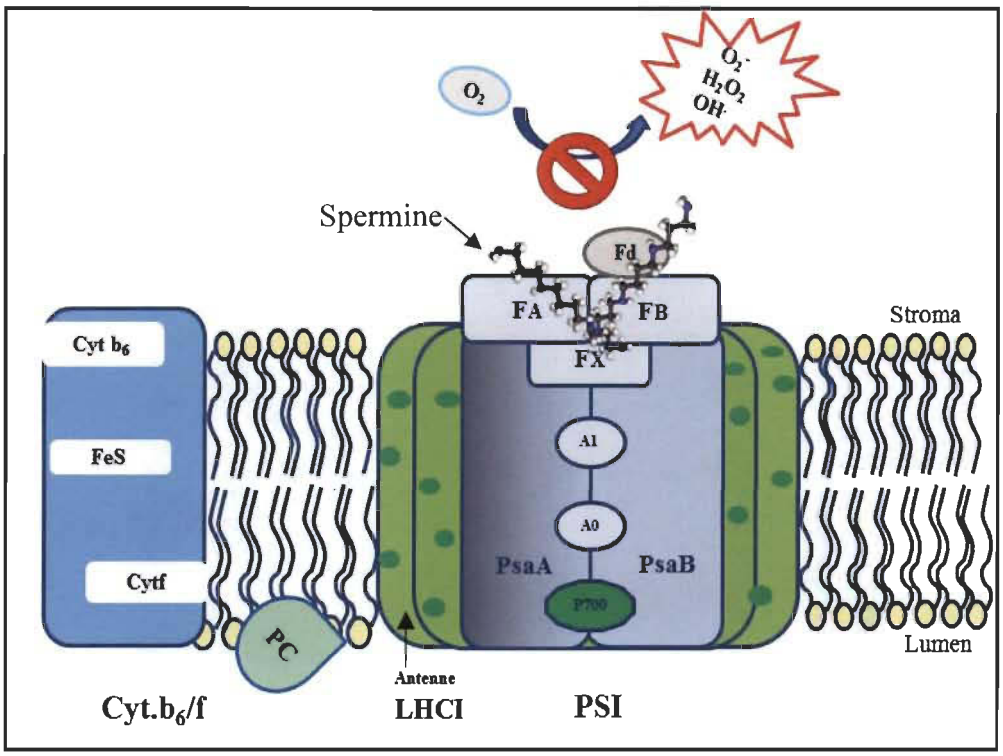


Figure 4.4 **Schéma du modèle proposé pour l'action de la spermine au niveau du complexe du photosystème I.**
La figure montre le site d'interaction de la spermine avec les protéines stromatiques porteuses des accepteurs finaux d'électrons (FA et FB) ainsi que Fx, et les mécanismes de protection proposés sous conditions de photoinhibition: stabilisation des protéines stromatiques et inhibition de la génération des espèces oxygénées réactives.

4.2 Synthèse sur le phénomène de la photoprotection du PSI par la Spm

Les résultats obtenus au cours de cette thèse montrent que la Spm peut agir, au moins, à trois niveaux dans la membrane des thylacoïdes : le PSI, le PSII et la PC. L'impact de ces interactions sur le fonctionnement de la membrane dépend de la dose de

Spm appliquée sur le matériel photosynthétique. En effet, pour des concentrations physiologiques (1 mM), l'ajout de Spm s'avère bénéfique pour la protection de l'activité des deux photosystèmes (PSI et PSII) comme il a été prouvé dans cette étude et celle de Hamdani et ses collaborateurs [5]. Pour des fortes doses (non physiologiques), la Spm continue de protéger le PSI tout de même, mais elle induit des effets inhibiteurs sur le fonctionnement du PSII et de la PC. La sensibilité du PSII logé majoritairement à l'intérieur de l'empilement granaire des thylacoïdes, et de la PC logé dans le lumen (Figure 4.5), est probablement due à l'application aléatoire de la Spm (dans les conditions expérimentales de cette étude). Pour cela, la régulation des niveaux d'accumulation des PAs dans les différents compartiments du chloroplaste semble primordiale pour la préservation du fonctionnement du PSII et de la PC.

Cependant, le PSI n'est pas affecté par les niveaux élevés de Spm dans les conditions standards, et il est protégé contre les dommages dans des conditions de photoinhibition. Ceci coïncide avec la présence de ce photosystème sur les membranes externes des granas et des thylacoïdes inter-granaires (Figure 4.5) naturellement exposés au stroma : milieu de biosynthèse et d'accumulation des PAs. Ces résultats prouvent que l'organisation structurale des thylacoïdes, basée sur la séparation de ses constituants entre le lumen et le stroma, joue un rôle important dans la préservation de certaines composantes sensibles. La protection de ces composantes contre l'excès de PAs dans la cellule est, probablement, régulée au niveau de la biosynthèse et du transport des PAs entre les deux milieux. Pour cela, l'accumulation de la Spm dans le stroma et l'action protectrice qu'elle induit sur le PSI, dans les conditions *in vitro*, peuvent être considérées comme une stratégie naturelle de défense contre la photoinhibition *in vivo*. Une stratégie dont le PSI se prive lorsqu'il est extrait des chloroplastes, ce qui le rend sensible à la photoinhibition même s'il est isolé d'une plante tolérante. Ce mécanisme de protection de l'appareil photosynthétique (PSI) pourrait expliquer la résistance du PSI chez les plantes tolérantes contre les différentes conditions de stress dans la nature.

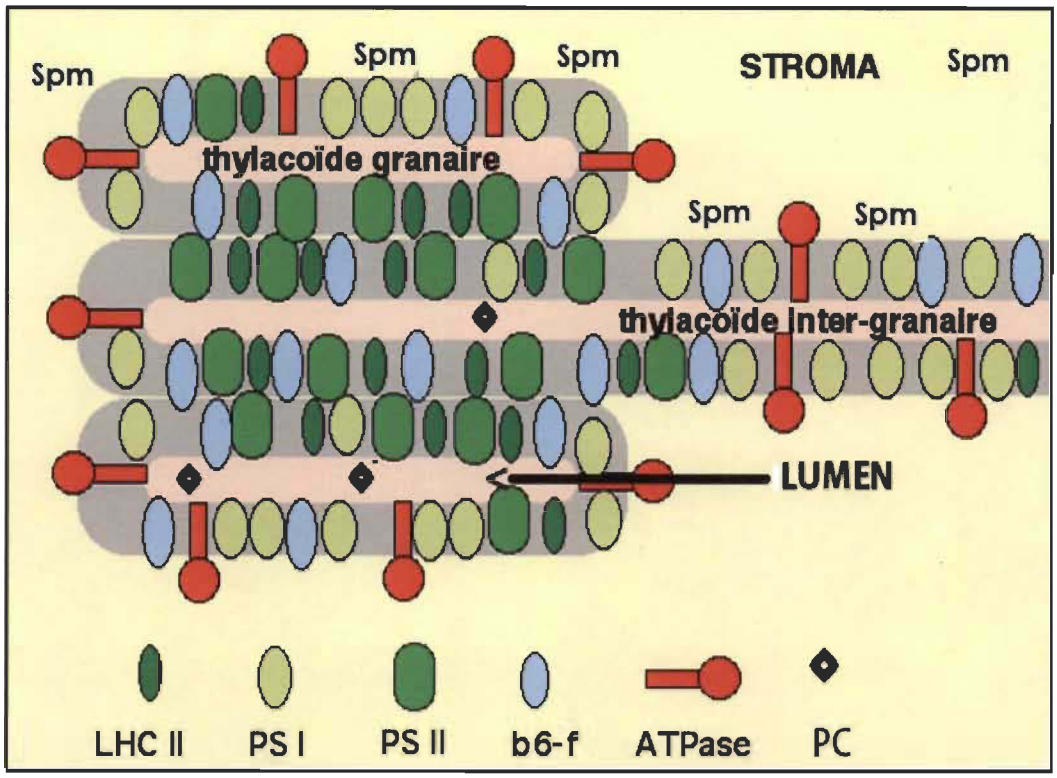


Figure 4.5 **Schéma récapitulatif expliquant la position du photosystème I par rapport au site d'accumulation de la spermine dans le chloroplaste.** La figure montre la répartition des différents constituants de la membrane des thylacoïdes (LHCII, PSI, PSII, Cyt b_6f, ATPase et PC) dans la structure des chloroplastes. Le photosystème I (PSI) est situé sur les membranes extèrnes des thylacoïdes exposées au stroma; lieu de biosynthèse des polyamines.

4.3 Contributions à l'avancement des connaissances

Les résultats obtenus dans cette thèse ont permis de déterminer pour la première fois le site d'interaction de la Spm avec le complexe du PSI et apportent une évidence directe de l'implication de cette PA dans l'augmentation de la stabilité du PSI contre les dommages du stress lumineux. Ces données constituent une base pour l'avancement des connaissances concernant les mécanismes de protection contre différents stress environnementaux chez les plantes et l'amélioration de leur tolérance.

Par ailleurs, les propriétés photoprotectrices de la Spm mises en évidence dans cette thèse pourraient être explorées dans d'autres secteurs d'activités qui tentent

d'utiliser les pigments et les complexes photosynthétiques comme photosensibilisateurs pour l'élaboration des cellules solaires organiques [13,14], des diodes électroluminescentes organiques [15] et des nanodispositifs pour la bioproduction d'hydrogène [16].

4.4 Perspectives

L'originalité des résultats obtenus dans cette étude ouvre certaines perspectives pour mieux comprendre les modes d'action de la Spm dans la photoprotection du PSI chez les plantes tolérantes. Cela pourra aider à optimiser les systèmes de défense contre les stress chez les plantes sensibles.

4.4.1 Détermination du mode d'action antioxydant de la Spm

Les résultats de recherche de cette thèse ont permis de montrer que la Spm est capable de protéger considérablement l'activité du PSI contre les effets du stress oxydatif induits par la photoinhibition. L'explication des mécanismes de protection du PSI est basée sur l'importance du rôle antioxydant que peut jouer la Spm. Cependant le mode d'action exacte de cette PA dans la diminution de l'accumulation d'$O_2^{\cdot-}$ reste incompris. Dans le but d'éclaircir ce point, il serait intéressant, dans la prolongation des travaux de recherche, d'approfondir l'investigation sur le mode d'interaction entre la Spm et l'$O_2^{\cdot-}$. Cette étude pourrait se compléter en déterminant les produits d'oxydation de la Spm suite à son interaction avec l'$O_2^{\cdot-}$ grâce à la technique de spectroscopie de masse.

Une autre alternative prometteuse pourra être examinée, celle de l'implication de la Spm dans la chélation des atomes de fer dans les centres [4Fe4S] au niveau du PSI. Ce mode d'action a été proposé dans les granulocytes humains ou la Spm forme un complexe non réactif avec le fer empêchant ainsi la réaction de génération du radical $OH^{\cdot}$ nocif pour les cellules [17].

4.4.2 Influence de la température sur l'efficacité du rôle protecteur de la Spm

Comme il est connu que le PSI est sensible à la photoinhibition chez certaines espèces végétales dans des conditions de basses températures [18], il est important de vérifier l'influence de la variation des températures sur l'action protectrice de la Spm, dans les conditions *in vitro*. Ce qui permettra probablement de comprendre les causes de la sensibilité de ces plantes. Deux possibilités sont envisagées : (i) la basse température pourrait affecter le métabolisme des PAs, ce qui inhibe l'augmentation des niveaux de PAs intracellulaires sous conditions de stress; (ii) la diminution de la fluidité des membranes thylacoïdales par les basses températures [19] pourrait limiter l'accès des PAs vers leurs sites d'action au niveau du PSI.

4.4.3 Utiliser la Spm comme supplément pour améliorer la croissance des plantes en condition de photoinhibition

Puisque les plantes sont capables d'absorber les PAs et de les métaboliser [20], il est intéressant de tester l'impact d'un apport supplémentaire de ces polycations, sur la croissance des plantes sensibles, exposées à de fortes intensités de lumière dans les conditions de basses températures. L'ajout de PAs peut se faire soit dans le milieu nutritif soit par pulvérisation sur les parties aériennes de la plante. L'amélioration des performances photosynthétiques dans des conditions pareilles reflète l'efficacité réelle de l'utilisation de la Spm pour augmenter la tolérance des plantes à la photoinhibition à basse température.

4.5 Références

[1] Sonoike K. (1995) Selective photoinhibition of photosystem I in isolated thylakoid membranes from cucumber and spinach. Plant Cell Physiol. 36: 825-830.

[2] Sonoike K., Kamo M., Hihara Y., Hiyama T. and Enami I. (1997) The mechanism of the degradation of PsaB gene product, one of the photosynthetic reaction centre subunits of photosystem I, upon photoinhibition. Photosynth. Res. 53: 55-63.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

[3] Hui Y., Jie W. and Carpentier R. (2000) Degradation of the photosystem I complex during photoinhibition. Photochem. Photobiol 72: 508-512.

[4] Hu L., Xiang L., Zhang L., Zhou X., Zou Z. and Hu X. (2014) The photoprotective role of spermidine in tomato seedlings under salinity-alkalinity stress. PLOS ONE 9 (10): 1-9.

[5] Hamdani S., Gauthier A., Msilini N. and Carpentier R. (2011) Positive charges of polyamines protect PSII in isolated thylakoid membranes during photoinhibitory conditions. Plant Cell Physiol. 52 (5): 866-873.

[6] Jang S.J., Wi S.J., Choi Y.J., An G. and Park K.Y. (2012) Increased polyamine biosynthesis enhances stress tolerance by preventing the accumulation of reactive oxygen species: T-DNA mutational analysis of Oryza sativa lysine decarboxylase-like protein 1. Mol. Cells 34: 251-262.

[7] Zhang W., Jiang B., Li W., Song H., Yu Y. and Chen J. (2009) Polyamines enhance chilling tolerance of cucumber (Cucumis sativus L.) through modulating antioxidative system. Scientia Horticult. 122: 200-208.

[8] Beauchemin R., Gautier A., Harnois J., Boisvert S., Govidachary S. and 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 QA to QB, Biochim. Biophys. Acta 1767: 905-912.

[9] Hamdani S., Yaakoubi H. and Carpentier R. (2011 Review) Polyamines interaction with thylakoid proteins during stress. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 104: 314-319.

[10] Beauchemin R., Harnois J., Rouillon R., Tajmir-Riahi H.A. and Carpentier R. (2007) Interaction of polyamines with proteins of photosystem II: cation binding and photosynthetic oxygen evolution, J. Mol. Struct. 833: 169-174.

[11] Sigfridsson K. (1997) Ionic strength and pH dependence of the reaction between plastocyanin and Photosystem 1. Evidence of a rate-limiting conformational change, Photosynth. Res. 54: 143-153.

[12] Asada K. (1999) The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Annu .Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 50: 601-639.

[13] Hug H., Bader M., Mair P. and Glatzel T. (2014) Biophotovoltaics: Natural pigments in dye-sensitized solar cells. Applied Energy 115: 216–225.

Rapport-Gratuit.com

[14] Gordiichuk P.I., Wetzelaer Gert-Jan A. H., Rimmerman D., Gruszka A., de Vries J.W., Saller M., Gautier D. A., Catarci S., Pesce D., Richter, Blom Paul W. M., and Herrmann A. (2014) Solid-State Biophotovoltaic Cells Containing Photosystem I. Adv. Mater. 26: 4863-4869.

[15] Ohtani N., Kitagawa N. and Matsuda T. (2011) Fabrication of Organic Light-Emitting Diodes Using Photosynthetic Pigments Extracted from Spinach. Jap. J. Appl. Physics 50: 1S2.

[16] Krassen H., Schwarze A., Friedrich B., Ataka K., Lenz O. and Heberle J. (2009) Photosynthetic Hydrogen Production by a Hybrid Complex of Photosystem I and [NiFe]-Hydrogenase. ACS NANO 3 (12) 4055-4061.

[17] Løvaas E. and Carlin G. (1991) Spermine: An anti-oxidant and anti-inflammatory agent. Free Rad. Biol. Med. 11(5): 455-461.

[18] Terashima I., Funayama S. and Sonoike K. (1994) The site of photoinhibition in leaves of Cucumis sativus L. at low temperatures is photosystem I, not photosystem II. Planta 193: 300-306.

[19] Los D.A. and Murata N. (2004) Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. Biochim. Biophys. Acta. 1666 (1-2): 142-57.

[20] Wang X., Shi G., Xu Q., and Hu J, (2007) Exogenous polyamines enhance copper tolerance of Nymphoides peltatum. J. Plant Physiol. 164 (8) 1062-1070.

ANNEXE A

MATÉRIELS ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

A.1 Extraction du matériel végétal

Le matériel végétal a été obtenu à partir de feuilles d'épinards (*Spinacea oleracea L.*) achetées commercialement et utilisées pour l'isolation des matériels photosynthétiques (Figure A.1). Les membranes de thylacoïdes ont été purifiées selon la procédure de Joly *et al.* [1] et détaillée dans la méthodologie du chapitre II. Alors que les membranes enrichies en PSI ont été purifiées selon la méthode définie par Harnois *et al.* [2] et détaillée dans la méthodologie du chapitre III.

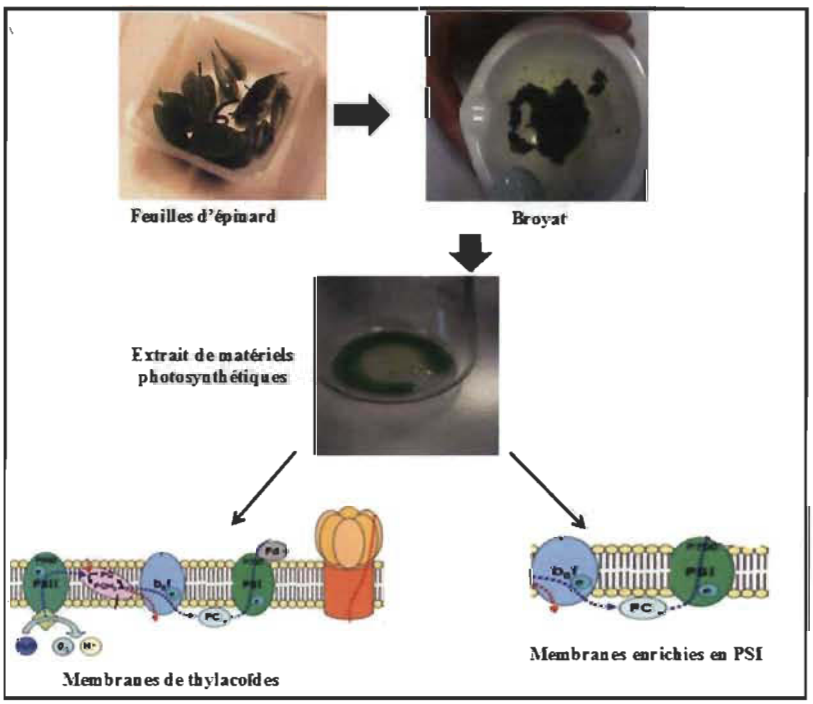


Figure A.1 Représentation schématique des étapes d'extraction de matériels photosynthétiques.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Les membranes des thylacoïdes contiennent toutes les composantes de la chaîne de transport d'électrons : PSII, PQ, Cyt b_6f, PC, PSI et ATPase alors que les membranes enrichies contiennent juste : Cyt b_6f, PC et PSI, et sont dépourvus des restes des composantes.

A.2 Traitement de photoinhibition

Pour simuler des conditions artificielles de la photoinhibition, une forte intensité de lumière (2000 $\mu mol/m^2/s$) a été appliquée sur des échantillons d'extraits membranaires incubés ou non en présence de différentes concentrations de Pas (Spm, Spd, Put, Dd et Da). Le prétraitement des échantillons avec les PAs a été réalisé pendant 3 minutes avant l'illumination (à l'obscurité totale). Durant l'illumination, la température de l'échantillon est maintenue constante grâce à un thermorégulateur. Le milieu est mélangé en permanence par un agitateur magnétique afin d'homogénéiser la solution (Figure A.2).

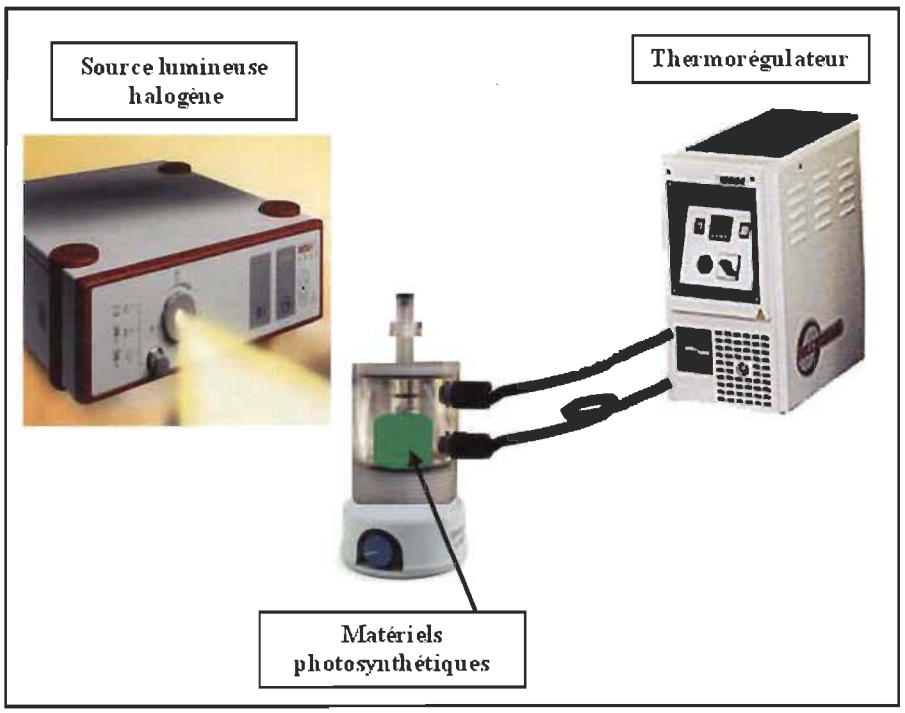


Figure A.2 Représentation schématique du dispositif utilisé pour la photoinhibition.

A.3 Structure des polyamines

Les polyamines biogéniques : Put, Spd et Spm ainsi que les polyamines artificielles Dd et Da (analogues de taille de la Spm) sont achetées de la compagnie Sigma Aldrich et utilisées sans purification supplémentaire.

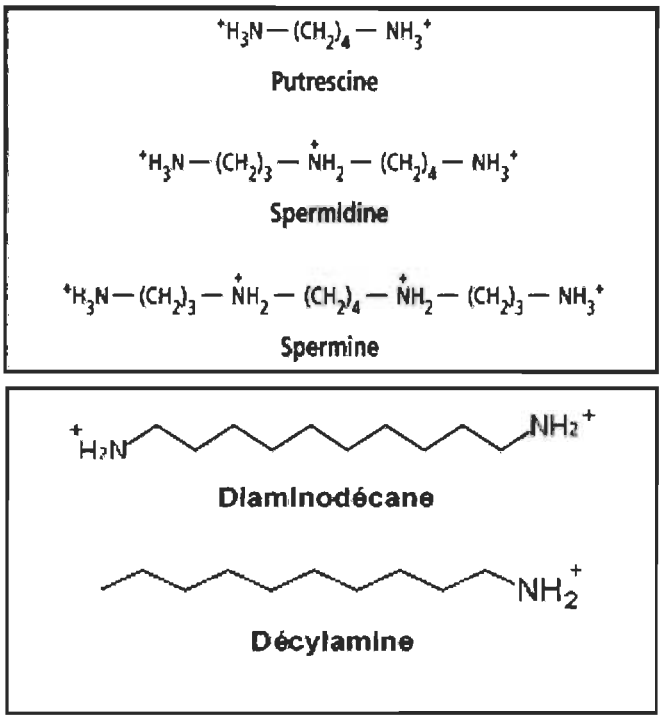


Figure A.3 Structure des polyamines biogéniques et artificièlles.

A.4 Mesure de la consommation d'oxygène

Les taux de consommation d'O_2 ont été mesurés à l'aide d'une électrode à oxygène type Clarck (Hansatech Instruments, Norfolk, England) branché à un ordinateur (Figure A.4a). La cellule de l'électrode contient deux compartiments qui sont la chambre de l'échantillon et l'électrode en dessous. Les deux parties sont séparées par une membrane de téflon perméable uniquement à l'O_2 (Figure A.4b).

L'électrode est formée d'une cathode de platine et d'une anode d'argent entre lesquelles on maintient une différence de potentiel de 0.7 V. Lors du montage du système, l'électrode est imbibée d'une solution de KCl. Sous l'influence du potentiel

rédox, l'O_2 dissous dans cette solution est ionisé en hydroxyle au contact de la cathode suivant la réaction :

$$O_2 + 2\ H_2O + 4\ e^- \longrightarrow 4\ OH^-$$

Les électrons utilisés pour la consommation d'O_2, dans la réaction précédente, proviennent d'une autre réaction au niveau de l'anode

$$4\ Cl^- + 4\ Ag \longrightarrow 4\ AgCl + 4\ e^-$$

Il en résulte un courant très faible, proportionnel à la concentration en O_2 du milieu dans lequel baigne l'électrode. C'est ce courant qui est amplifié et mesuré. Toutefois, la concentration mesurée dépend de la vitesse de renouvellement de l'O_2 sous la membrane, et qui provient de l'échantillon testé.

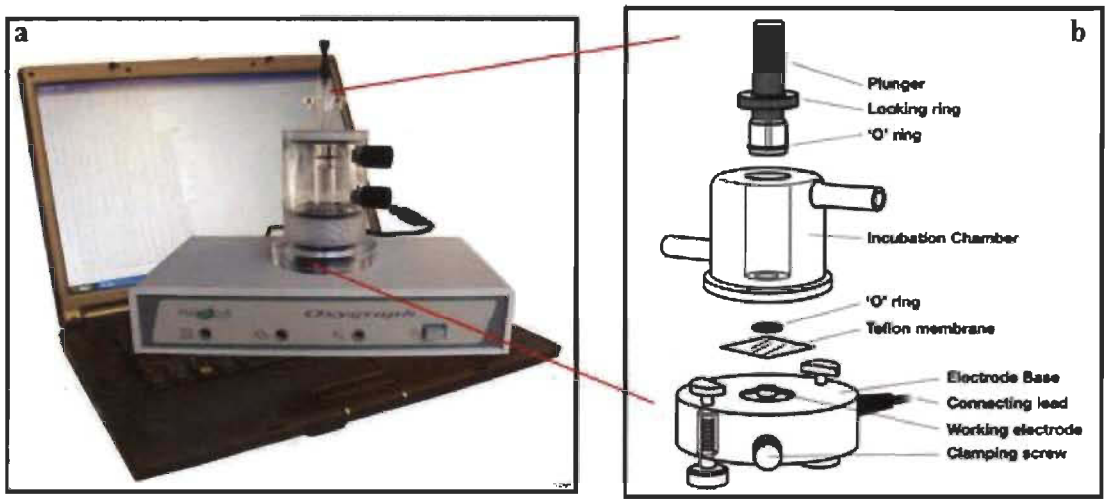


Figure A.4 (a) Image de l'électrode à oxygène, type Clark et (b) représentation schématique de ses composantes.

A.5 Localisation des sites de fixation des donneurs et accepteur artificiels d'électrons

Afin de déterminer d'éventuels sites d'action des PAs au niveau de la membrane thylacoïdale, la consommation d'O_2 a été mesurée en utilisant divers composés comme donneurs d'électrons artificiels au PSI. Notamment la $DCPIPH_2$ qui donne ses électrons

au niveau du Cyt f, et le TMPD réduit qui donne ses électrons à la PC. Le schéma de la figure A.5 montre les sites des différents donneurs artificiels au niveau de la chaîne des transporteurs d'électrons dans la membrane thylacoïdale. Le DCMU sert pour inhiber le flux d'électrons en provenance du PSII et délimite la fraction de la membrane étudiée. Alors que le methyl viologen (MV) fixé au niveau du côté accepteur du PSI, sert d'accepteur final pour les électrons en provenance du donneur artificiel.

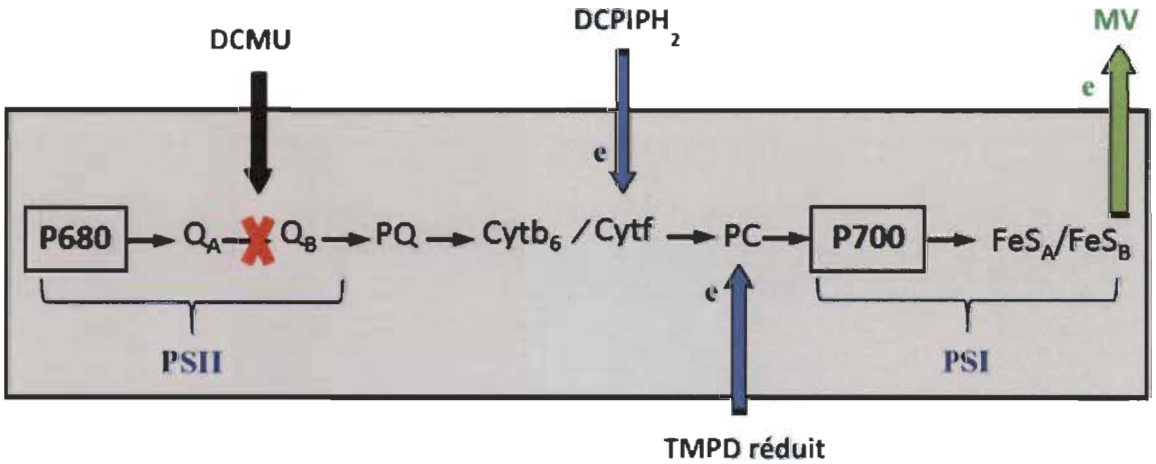


Figure A.5 Chaîne des transporteurs d'électrons dans les membranes des thylacoïdes et sites de fixation de l'inhibiteur du PSII, des donneurs et accepteur artificiels d'électrons.

A.6 Photooxydation de P700

La mesure de la photooxydation de P700 a été effectuée à l'aide d'une unité ED-P700DW connectée au fluorimètre PAM-101 (Pulse Amplitude Modulated ChI Fluorimeter de Walz) (Figure A.6a). Le principe de la technique consiste à placer le matériel photosynthétique, contenant le PSI, dans une porte-échantillon, puis à l'exciter avec un flash de lumière rouge lointain (FR light). Suite à l'excitation de l'échantillon, la chlorophylle spéciale du PSI (P700) passe à un état d'énergie plus élevé (P700*) qui lui permet de libérer un électron (Figure A.6b).

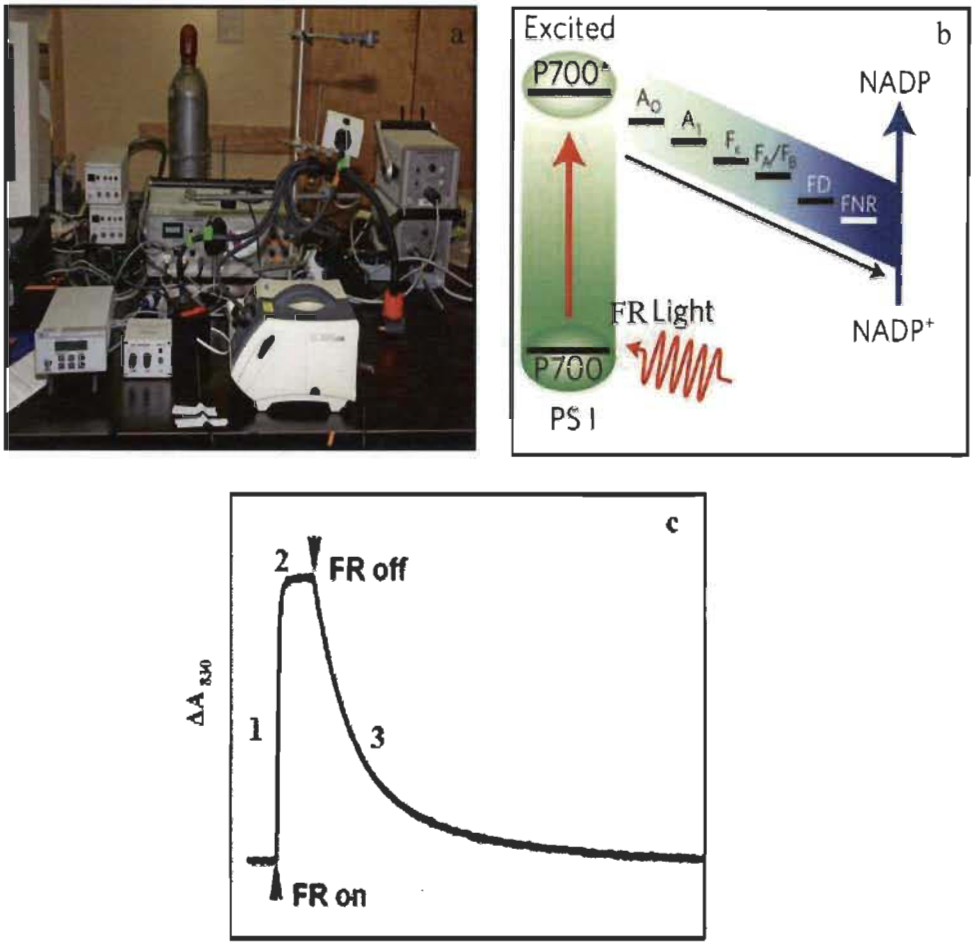


Figure A.6 (a) Image du fluorimètre PAM 101, (b) représentation schématique de l'excitation du P700 et du transfert d'électrons dans le PSI, et (c) le spectre typique de la photooxydation du P700.

Ensuite, l'électron va être transféré à travers les cofacteurs d'oxydoréductions du PSI (A_0, A_1, F_X, F_A, F_B) pour réduire la Fd et puis l'accepteur final. Le $NADP^+$ est l'accepteur naturel des électrons, alors que dans nos expériences l'accepteur artificiel utilisé est le MV.

Ce transfert d'électron induit la formation de l'entité $P700^+$ dont les changements d'intensité d'absorption ont été mesurés en utilisant le système d'acquisition de données DA 100 de Walz. Le spectre typique de la variation d'absorbance (Figure A.6c) présente une phase rapide dite d'oxydation (1), une phase stationnaire (2) correspond à la quantité du P700 photooxydable et une phase de relaxation (3) qui correspond à la réduction du $P700^+$.

A.7 Estimation du stress oxydatif

A.7.1 Mesure du O_2^- par absorbance du nitro-bleu de tétrazolium

La génération du O_2^- a été estimée par la réduction du nitro-bleu de tétrazolium (NBT) selon la procédure de Beauchamp et Fridovich [3]. Le NBT est un produit incolore qui se transforme en formazane, de couleur bleu foncée, après réaction avec O_2^- (Figure A.7). L'accumulation du O_2^-, générés dans la solution de thylacoïdes illuminée, est mesurée par absorbance à 560 nm à l'aide d'un spectromètre (Perkin-Elmer lambda 40). La variation des taux de la photo-réduction du NBT reflète l'augmentation de la formation de cette espèce oxygénée dans la solution.

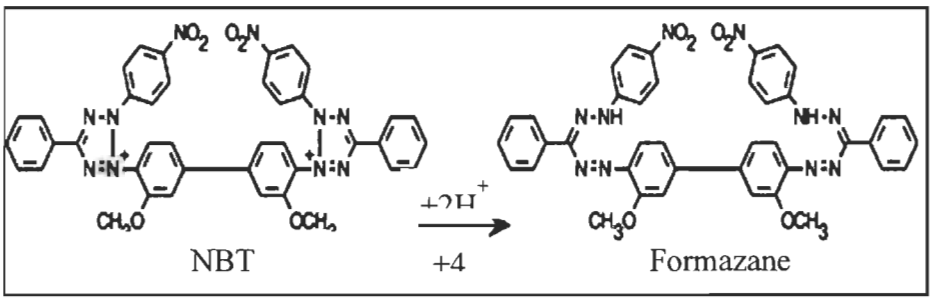


Figure A.7 Structure chimique du nitro-bleu de tétrazolium et du formazane.

A.7.2 Mesure de H_2O_2 et $OH^{\cdot}$ par la fluorescence du dichlorofluoréscine

L'accumulation du H_2O_2 et du $OH^{\cdot}$ a été détecté par la mesure du changement de la fluorescence d'une sonde de ROSs appelée dichlorofluoréscine (DCFH) selon le protocole de Lebel *et al.* [4]. Le DCFH est un composé non ou très peu fluorescent à l'état standard. Lorsqu'il interagit avec le H_2O_2 et le $OH^{\cdot}$, il produit le DCF hautement fluorescent (Figure A.8a). L'excitation du DCF à une longueur d'onde de 490 nm induit l'émission d'une fluorescence détectée à 530 nm par un spectrofluorimètre (Perkin-Elmer LS55). La variation des niveaux de la fluorescence est proportionnelle à la quantité des espèces oxygénées générées dans la préparation membranaire (Figure A.8b).

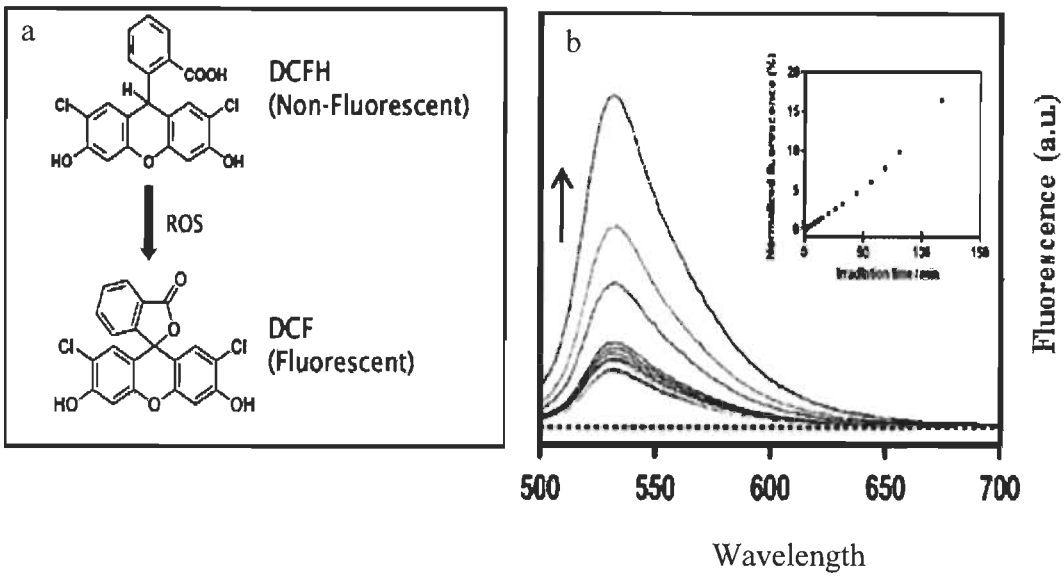


Figure A.8 (a) Structure chimique du DCFH et du DCF et (b) augmentation de la fluorescence du DCF après excitation à 490 nm.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

A.8 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

L'analyse de la structure secondaire des protéines des membranes enrichies en PSI et de leur complexe avec la Spm par FTIR a été réalisée selon la procédure précédemment décrite [5]. Selon cette méthode, l'interaction entre une protéine et une molécule peut être identifiée à partir de la déformation de la bande de l'amide I situé autour de 1650-1660 cm^{-1}. En effet, la bande de l'amide I est très susceptible aux variations chimiques de l'environnement dans lequel est située la protéine. C'est pourquoi on se sert de ce changement pour étudier les interactions entre les protéines et les petites molécules. Pour cela, la résolution du spectre de l'amide I a été augmentée dans la région du 1700-1600 cm^{-1} par auto-déconvolution et augmentation de la dérivée seconde. Ce qui a permis de révéler les différentes composantes de la bande de l'amide I et de les quantifier. Les structures secondaires sont déterminées selon la fréquence de leur maximum : feuillet-β antiparallèle : 1679-1685, coude : 1663–1678, hélice-α : 1650-1658, structure désordonnée : 1641–1648 et feuillet-β parallèle : 1613-1640.

A.9 Références bibliographiques

[1] Joly D., Bigras C., Harnois J., Govindachary S. and Carpentier R. (2005) Kinetic analyses of the OJIP chlorophyll fluorescence rise in thylakoid membranes, Photosynth. Res 84: 107-112.

[2] Harnois J., Msilini N. and Carpentier R. (2011) Isolation of photosystem I submembrane fractions, in: Photosynth. Res. Prot. 2nd ed. 1-15.

[3] Beauchamp C. and Fridovich I. (1971) Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal. Biochem. 44: 276-287.

[4] LeBel C.P., Ischiropoulos H. and Bondy S.C. (1992) Evaluation of the Probe 2,7-Dichiorofluorescin as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress. Chem. Res. Toxicol. 5: 227-231.

[5] Byler D.M. and Susi H. (1986) Examination of the secondary structure of proteins by deconvoluted FTIR Spectra. Biopolymers 25: 469-486.

Rapport-Gratuit.com