

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

INHIBITION DE LA PHOTOCHEMIE DES PHOTOSYSTÈMES II ET I ET
MODIFICATION DE LA DISSIPATION D'ÉNERGIE INDUITES PAR LE
DICHROMATE ET L'ALUMINIUM CHEZ DES ALGUES VERTES

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE (BIOCHIMIE)

PAR
FRANÇOIS PERREAULT

OCTOBRE 2008

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

Ce manuscrit est dédié à la mémoire de Jérôme Dionne (1978-2007). Sans ton apport, une grande partie de ce travail aurait été impossible. J'espère que tu pourras être fier de tes premières publications.

« Quand le dernier arbre sera abattu, la dernière rivière empoisonnée, le dernier poisson capturé, alors seulement vous vous apercevrez que l'argent ne se mange pas. »

- Proverbe amériendien.

REMERCIEMENTS

La réalisation d'une maîtrise en sciences a été pour moi une grande aventure et pour y réussir, j'ai eu l'appui de nombreux compagnons qui m'ont soutenu dès les premiers temps. Je prends ici quelques lignes pour les remercier.

En premier lieu, je remercie grandement mon directeur et ami le Pr. Radovan Popovic pour son appui, ses conseils et sa foi en mes capacités. Sa bonne humeur constante et son enthousiasme pour la recherche ont été les premiers éléments qui m'ont permis de réaliser mes études de maîtrise.

Je remercie aussi le Pr. Philippe Juneau pour son aide, ses conseils et pour l'ouverture de son laboratoire. Ses connaissances de la photosynthèse et sa rigueur scientifique m'ont grandement aidé durant toutes mes études et, sans ses conseils et sa présence, le travail aurait été beaucoup plus pénible.

Je remercie tous mes collègues de laboratoire pour leurs apports respectifs; merci à David Dewez pour son enseignement sur les techniques au laboratoire, pour endurer mes incessantes questions; merci à Nadia Ait Ali, ce fut un grand plaisir de travailler ensemble dans de nombreux projets et je me rapellerai toujours tes sages conseils; merci à Cyril Saison pour l'entraide constante au laboratoire et dans les herbiers du fleuve, un jour je l'aurai mon poisson de l'Île St-Hélène; merci à Olivier Didur pour ses conseils et son apprentissage sur la biochimie et la cytométrie; merci à Nicolas Besnier, qui a mis en doute plus d'une fois mes protocoles et par cela m'a poussé à me remettre en question.

Je remercie également tout le laboratoire Juneau : Annie Chalifour, Charle Deblois, Liane Durand et Gabrielle Vernouillet. Toutes les rencontres de groupe furent beaucoup plus agréables avec votre présence.

J'ai eu la chance de collaborer avec des professeurs d'autres universités. Ces collaborations m'ont permis d'apprendre de nouveaux domaines et des méthodes qui m'ont été fort utiles. Je remercie donc les Pr. Amirou Diallo (CERE, Université de Conakry, Guinée), Claude Fortin (INRS-ETE) et Laszlo Kovacs (BRC, Université de Szeged, Hongrie).

Je remercie tous les gens du département de Chimie de l'UQAM, trop nombreux pour que je les nomme ici. Ce fut un grand plaisir de travailler avec vous tous.

Je remercie aussi mes parents, qui m'ont soutenu durant toutes mes études. Effectivement papa, étudiant est le plus beau métier du monde. Je remercie enfin Sabrina, pour tout, pour son amour et sa patience. Ça compte plus que tout pour moi.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	iv
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xiv
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xv
RÉSUMÉ	xviii
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
CHAPITRE I.....	3
LA PHOTOSYNTHÈSE	3
1.1 L'activité photosynthétique	3
1.2 Aspects structuraux du photosystème II	6
1.2.1 Le complexe antennaire du photosystème II.....	6
1.2.2 Le centre réactionnel du photosystème II	7
1.2.3 Le complexe de dégagement d'oxygène	8
1.3 Aspects fonctionnels du photosystème II.....	8
1.3.1 Absorption de l'énergie lumineuse	8
1.3.2 Dissipation d'énergie au niveau du photosystème II	11
1.3.3 Séparation de charge dans la réaction photochimique primaire du PSII.....	11
1.3.4 Le transport transmembranaire des électrons.....	13
1.3.5 La photophosphorylation liée à la formation du gradient de protons dans le lumen	15
1.3.6 Dissipation d'énergie sous forme de chaleur	16
1.3.7 Dissipation d'énergie sous forme de fluorescence.....	18

1.3.8 La cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne.....	19
1.3.9 La fluorescence chlorophyllienne modulée	22
1.3.10 Formation de ERO dans le transport d'électrons des photosystèmes II et I.....	25
1.4 Aspects structuraux du photosystème I.....	28
1.4.1 Les antennes collectrices de lumière du photosystème I.....	28
1.4.2 Le centre réactionnel du photosystème I.....	28
1.5 Aspects fonctionnels du photosystème I.....	29
1.5.1 Absorption et transfert de l'énergie lumineuse du photosystème I.....	29
1.5.2 Mesure de l'activité du P700	31
1.6 Distribution de l'énergie entre les deux photosystèmes.....	34
1.7 Les réactions biochimiques de la photosynthèse	36
1.8 Effets des métaux sur la photosynthèse	38
1.8.1 Effets des métaux sur les pigments photosynthétiques	38
1.8.2 Effets des métaux sur la photochimie des photosystèmes II et I.....	40
1.8.3 Effets des métaux sur les réactions biochimiques de la photosynthèse	41
1.8.4 Effets des métaux sur la dissipation d'énergie associée aux photosystèmes II et I.....	41
1.8.5 Production de ERO dans les chloroplastes par les métaux	42
 CHAPITRE II	 43
 PROJET DE RECHERCHE : INHIBITION DE LA PHOTOCHEMIE DES PHOTOSYSTÈME II ET I ET MODIFICATION DE LA DISSIPATION D'ÉNERGIE INDUITES PAR LE DICHROMATE ET L'ALUMINIUM CHEZ DES ALGUES VERTES....	 43
2.1 Problématiques abordées dans notre projet de recherche	43
 CHAPITRE III.....	 47
 INHIBITION OF PHOTOSYNTHETIC ELECTRON TRANSPORT IN CHLAMYDOMONAS REINHARDTII BY DICHROMATE EFFECT ALTERS ENERGY DISSIPATION PROCESSES DEPENDANT TO PSII AND PSI ACTIVITIES	 47
3.1 Résumé.....	48

3.2 Abstract.....	49
3.3 Introduction.....	50
3.4 Materials and methods.....	51
3.4.1 Algae culture.....	51
3.4.2 Dichromate treatment.....	52
3.4.3 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting.....	52
3.4.4 Chlorophyll <i>a</i> fluorescence and PSI transmittance measurement.....	52
3.4.5 HPLC analysis.....	54
3.4.6 Data analysis and statistic.....	54
3.5 Results and discussion.....	55
3.6 Acknowledgements.....	58
3.7 References.....	58
 CHAPITRE IV.....	 67
 EFFECT OF DICHROMATE ON PHOTOSYSTEM II ACTIVITY IN XANTHOPHYLL- DEFICIENT MUTANTS OF CHLAMYDOMONAS REINHARDTII.....	 67
4.1 Résumé.....	68
4.2 Abstract.....	69
4.3 Introduction.....	70
4.4 Materials and methods.....	72
4.4.1 Algae culture.....	72
4.4.2 Dichromate treatment.....	72
4.4.3 Cell growth and chlorophyll determination.....	72
4.4.4 Determination of Chlorophyll <i>a</i> fluorescence parameters.....	73
4.4.5 Data analysis and statistic.....	74
4.5 Results and discussion.....	74
4.5.1 Growth inhibition and chlorophyll content.....	74
4.5.2. Effect of light intensity on PSII function and energy dissipation when algal genotypes have been exposed to dichromate toxicity effect.....	75
4.6 Acknowledgements.....	79

4.7 References.....	79
CHAPITRE V.....	91
ALTERATION OF ENERGY DISSIPATION BY DICHROMATE IN XANTHOPHYLL DEFICIENT MUTANT OF CHLAMYDOMONAS REINHARDTII.....	91
5.1 Résumé.....	92
5.2 Abstract.....	93
5.3 Introduction.....	94
5.4 Materials and methods.....	95
5.4.1 Algae culture.....	95
5.4.2 Western blot analysis.....	95
5.4.3 Chlorophyll <i>a</i> fluorescence measurements.....	95
5.5 Results and discussion.....	96
5.6 References.....	98
CHAPITRE VI.....	102
EFFECTS OF ALUMINIUM ON CELLULAR DIVISION AND PHOTOSYNTHETIC ENERGY DISSIPATION IN EUGLENA GRACILIS AND CHLAMYDOMONAS ACIDOPHILA.....	102
6.1 Résumé.....	103
6.2 Abstract.....	104
6.3 Introduction.....	105
6.4 Materials and methods.....	106
6.4.1 Algae culture.....	106
6.4.2 Aluminium treatment.....	106
6.4.3 Cellular density, dry weight, chlorophyll and aluminium content.....	107
6.4.4 Chlorophyll <i>a</i> fluorescence measurements.....	108
6.4.5 Data analysis and statistics.....	109
6.5 Results and discussion.....	109

6.6 Acknowledgments	112
6.7 References.....	112
CONCLUSION.....	121
AUTRES CONTRIBUTIONS.....	125
RÉFÉRENCES	126

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : A) Structure schématique d'un chloroplaste. B) Micrographie électronique d'un chloroplaste (d'après Buchanan, 2000 ; Staehelin et van der Staay, 1996).....	4
Figure 1.2 : Disposition schématique des transporteurs d'électrons dans la membrane du thylacoïde. Les complexes membranaires sont les photosystèmes II et I, le cytochrome b ₆ f, la plastocyanine et l'ATP synthétase. Les flèches rouges indiquent le transfert des électrons et les flèches bleues la translocation de protons (d'après Malkin et Niyogi, 2000).....	5
Figure 1.3 : Modèle structurel du centre réactionnel du PSII. (D1 et D2 : protéines dominantes du PSII; Mn : tétramère de manganèse; CP43 et CP47 : protéines de l'antenne interne; Lhcb 1,2,3,4,5 et 6 : protéines de l'antenne périphérique; cyt b559 : cytochrome b559; PQH ₂ : plastoquinone réduite; Q _A = quinone a; Q _B = quinone b; E et F sont des protéines formant le cytochrome b559; J,K,W,I,L,S,N,H,M et X sont des sous-unités structurelles du PSII) (d'après Rawn, 1990).....	7
Figure 1.4 : Structure moléculaire des molécules des pigments (A) chlorophylle et (B) carotène.....	9
Figure 1.5 : Spectre d'absorption de différents pigments photosynthétiques (d'après Rawn, 1990).....	9
Figure 1.6 : A) Niveau d'énergie des états singulets excités d'une molécule de chlorophylle et les mécanismes de dissipation d'énergie (Fluo = Fluorescence) (d'après Buchanan <i>et al.</i> , 2000). B) Organisation schématique des pigments des antennes collectrices de lumière participant au transfert d'énergie dans le PSII. La flèche indique un cheminement aléatoire d'un photon parmi les pigments jusqu'au centre réactionnel du PSII (d'après Jupin et Lamant, 1999).....	10
Figure 1.7 : Voies de dissipation d'énergie de la chlorophylle excitée du PSII (d'après Müller <i>et al.</i> , 2001).....	11

- Figure 1.8 : Schéma de la formation des états S et la production de protons pendant la photooxydation de l'eau conduisant au dégagement d'O₂ (d'après Buchanan, 2000). ... 13
- Figure 1.9 : Schéma en Z des réactions de transfert d'électrons photosynthétique en fonction de leur potentiel d'oxydoréduction. P680 et P700 sont respectivement les centres réactionnels du PSII et du PSI. P680* et P700* sont leur forme excitée par l'absorption de l'énergie lumineuse (hv). Pheo, Q_A, Q_B et PQ sont les accepteurs d'électrons du PSII. Cyt b_H, Cyt b_L, FeS et Cyt f sont les différentes sous-unités et cofacteurs du cytochrome b₆f. PC est la plastocyanine qui transporte les électrons du cytochrome b₆f au PSI. A₀, A₁, F_x, F_a/F_B et F_D sont les accepteurs d'électrons du PSI. NADPF est l'enzyme ferrédoxine NADP-réductase qui réduit le NADP⁺ en NADPH. (d'après Whitmarsh, 1998)..... 14
- Figure 1.10 : Modèle de la structure du complexe ATP synthétase. Le CF₁ se compose des cinq sous-unités polypeptidiques α, β, γ, δ, ε. Le CF₀ est constitué des sous-unités I, II et III (d'après Mallkin et Niyogi, 2000). 15
- Figure 1.11 : Cycle des xanthophylles lors de la régulation de la dissipation d'énergie lumineuse. Les pH 7.0 et 5.0 sont les pH optimaux des enzymes zéaxanthine époxydase et violaxanthine dé-époxydase, respectivement (d'après Niyogi *et al.*, 1997a). 17
- Figure 1.12 : Schéma du transport cyclique du PSII impliquant le cytochrome b559 (Cyt b559) participant à la régulation de la dissipation d'énergie (élaboré d'après Critchley, 1998)..... 17
- Figure 1.13 : Cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne montrant les transitions O-J-I-P, mesurée sur une échelle de temps logarithmique. Q_A et Q_B sont les accepteurs primaire et secondaire du PSII; PQH₂ est la plastoquinone à l'état réduite (D'après Strasser *et al.*, 1995). 20
- Figure 1.14 : Modèle du flux d'énergie lumineuse absorbée par les LHCI (ABS/RC), utilisée pour la séparation de charge (TR₀/RC) et le transport d'électrons (ET₀/RC) ou dissipée sous forme de chaleur (DI₀/RC) (d'après Zrýd *et al.*, 2002). 22
- Figure 1.15 : Cinétique de fluorescence modulée mesurée à l'aide d'un fluorimètre PAM. F₀ et F'₀, fluorescence de base pour une plante adaptée à l'obscurité et à la lumière, respectivement; F_v et F'_v, fluorescence variable pour une plante adaptée à l'obscurité et à la lumière, respectivement; F_M et F'_M, fluorescence maximale pour une plante adaptée à l'obscurité et à la lumière, respectivement; Q_N, «*quenching*» non photochimique; Q_P, «*quenching*» photochimique (élaboré d'après Schreiber *et al.*, 1986) 23

- Figure 1.16 : Sites de formation d'ERO pendant la photosynthèse. (A) Pendant le transport des électrons entre le PSII et PSI. (B) Détails de la formation des ERO pendant le transport d'électrons au niveau du PSI (d'après Asada, 1994; McKersie et Leshem, 1994). Les abréviations sont décrites p. 14..... 27
- Figure 1.17 : Schéma de l'organisation structurale du PSI. A à F : Les sous-unités protéiques PsaA à PsaF constituant le centre réactionnel du PSI ; Lhca 1 à 4 : Sous-unités protéiques constituant le LHCI. (d'après Jansen *et al.*, 2007). 29
- Figure 1.18 : Schéma du transport d'électrons via le PSI Les transporteurs d'électrons associés au PSI sont les PC, P700, A₀, A₁, F_x, F_A, F_B et Fdx. Les sous-unités protéiques constituant le centre réactionnel du PSI sont indiquées par les lettres. (Malkin et Niyogi, 2000)..... 30
- Figure 1.19 : Spectre de différence entre l'absorption de la forme oxydée et réduite du P700. Les lettres a et b indiquent la ligne de base et le spectre de différence entre P700⁺ et P700, respectivement (d'après Mathis *et al.*, 1988). 31
- Figure 1.20 : Détermination de la photochimie et de la dissipation d'énergie du PSI par mesure du changement d'absorption à 830 nm. L'oxydation du P700 est caractérisée par un changement positif d'absorbance. 100%P700 red. : P700 à l'état maximum réduit après adaptation à l'obscurité ; 100%P700 ox. : P700 à l'état maximum oxydé quand la plante est exposée au flash saturant en présence d'illumination rouge lointain (735 nm) ; P700 ox.: portion des centres réactionnels à l'état oxydé ; P700red.A et P700 red.A⁻ : centres réactionnels P700 qui peuvent et ne peuvent pas être réduit, respectivement, quand la plante est exposée à un flash saturant en présence de lumière actinique. P₀ : niveau d'absorption lorsque les P700 sont à un maximum réduit (100% P700 red.) ; P_m : niveau d'absorption lorsque les P700 sont à un maximum oxydés (100% P700 ox.) ; P : niveau d'absorption induit par une illumination actinique ; P_m' : niveau d'absorption induit par un flash saturant en présence de lumière actinique ; FS : flash saturant ; RL ; illumination rouge lointain (735 nm) ; LA : illumination actinique (d'après Klughammer et Screiber, 2008)..... 32
- Figure 1.19 : Schéma de la régulation des changements d'état I et II par l'induction de la phosphorylation des LHCI (Jupin et Lamant, 1999). 35
- Figure 1.20 : Schéma représentant les réactions biochimiques de la fixation du CO₂ pendant les différentes étapes du cycle de Calvin (d'après Hall et Rao, 1994). 37

- Figure 3.1 : Chromium effect on D1 protein content, quantum yield of PSII (Φ_{MII}) and PSI (Φ_{MI}) when *C. reinhardtii* was exposed 24 hours to dichromate. Letters indicate significantly different results ($p > 0.05$). 64
- Figure 3.2 : Change of rapid chlorophyll rise of dark adapted samples of *C. reinhardtii* exposed to dichromate for 24h. (A): Rapid rise of fluorescence with transitions O, J, I and P level of fluorescence; numbers represent dichromate concentration used for treatments. Deconvolution of O-P chlorophyll fluorescence rise according to Pospisil and Dau (2002) for control (B), 6 μ M (C) and 12.5 μ M (D). 65
- Figure 3.3 : The change of steady state energy dissipation when *C. reinhardtii* was exposed 24h to dichromate. The values of parameters are presented as percentage value participating in PSII and PSI energy dissipation considered as 100%. For more details, see material and methods. Letters indicate significantly different results ($p > 0.05$). 66
- Figure 4.1 : Effect of increased light intensity on non photochemical energy dissipation estimated by non photochemical quenching (NPQ) of variable chlorophyll fluorescence. 85
- Figure 4.2 : The change of photochemical quenching (qP) of variable chlorophyll fluorescence in relation to light intensities when *C. reinhardtii* genotypes were exposed 24h to dichromate. For more details, see material and methods..... 86
- Figure 4.3 : The change of the effective quantum yield Y(II) of photochemical energy conversion in PSII in relation to light intensities when *C. reinhardtii* genotypes were exposed 24h to dichromate. 87
- Figure 4.4 : The change of non photochemical energy dissipation pathways in relation to light intensities, noted as Y(NPQ) for the quantum yield of regulated energy dissipation in PSII and Y(NO) for the quantum yield of non-regulated energy dissipation in PSII, when *C. reinhardtii* genotypes were exposed 24h to dichromate. 88
- Figure 4.5 : Effect of low and high light intensity on PSII energy dissipation pathways when *C. reinhardtii* genotypes were exposed 24h to dichromate. Numbers represent percentage of the total energy dissipation..... 89
- Figure 4.6 : Photochemical energy conversion (white), non-photochemical energy dissipation via regulatory (open grey) and non-regulatory (dark grey) mechanisms of PSII for *C. reinhardtii* algae having or not functional xanthophylls cycle. 90

- Figure 5.1 : Protein gel blots analysis of thylakoid membranes isolated from *C. reinhardtii* wild type and mutant after being exposed to Cr(VI) during 24h. Proteins were detected by using specific antibodies raised against D1 protein. Numbers represent: 1 control (-Cr); 2: 12.3 and 3: 25 μ M Cr(VI). 100
- Figure 5.2 : The change of the effective quantum yield of PSII (Y(II)) and PSI ((Y(I)), the non photochemical energy dissipation pathways via regulatory Y(NPQ) and non regulatory processes Y(NO) of PSII. Non photochemical quantum of PSI in oxidized state Y(ND) and in reduced state Y(NA)) when *C. reinhardtii* genotypes were exposed 24h to chromium at different light intensities. Numbers represent percent of total measured energy dissipation..... 101
- Figure 6.1 : Total intracellular Al in *E. gracilis* (white bars) and *C. acidophila* (grey bars) after 24h of exposure. 119
- Figure 6.2 : Changes in the rapid polyphasic chl *a* fluorescence rise in *E. gracilis* and *C. acidophila* exposed to increasing concentrations of Al for 24h. Numbers represent Al concentrations in μ M (For more details, see material and methods)..... 120

LISTE DES TABLEAUX

Table 3.1 : The change of growth rate and pigment content of <i>C. reinhardtii</i> when exposed 24 hours to dichromate. Letters indicate significantly different results ($p > 0.05$).....	62
Table 3.2 : The change of rapid chlorophyll a fluorescence induction parameters when <i>C. reinhardtii</i> was exposed 24h to dichromate. For more details, see material and methods. Letters indicate significantly different results ($p > 0.05$).....	63
Table 4.1 : Inhibitory effect of dichromate on cell growth and chlorophyll synthesis when <i>C. reinhardtii</i> genotypes were exposed 24h.....	84
Table 6.1 : Distribution of Al ionic species in exposure media used for algal treatment (pH 3.0) (for more details, see material and methods).....	116
Table 6.2 : Changes in cell density, dry weight and chlorophyll concentration in <i>E. gracilis</i> and <i>C. acidophila</i> cells as a function of Al concentration.....	117
Table 6.3 The change of fluorescence parameters in <i>E. gracilis</i> and <i>C. acidophila</i> exposed to different Al concentrations (for more details, see material and methods).....	118

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A_0, A_1 :	Accepteurs primaire et secondaire d'électrons du PSI
ADP :	Adénosine diphosphate
ATP :	Adénosine triphosphate
CDO :	Complexe de dégagement d'oxygène
Chl <i>a</i> :	Chlorophylle <i>a</i>
Chl <i>b</i> :	Chlorophylle <i>b</i>
$^1\text{Chl}, ^3\text{Chl}, * \text{Chl}$:	Chlorophylle à l'état singulet, triplet et excité
CO_2 :	Dioxyde de carbone
DI_0/RC :	« <i>Non photochemical energy dissipation per reaction center</i> »
ERO :	Espèces réactives de l'oxygène
ET_0/RC :	« <i>Electron transport flux per reaction center</i> »
Fdx	Ferrédoxine
F_s :	Fluorescence variable induite par une illumination actinique continue
F_M :	Fluorescence maximale induite par un flash saturant après adaptation à l'obscurité
F'_M :	Fluorescence maximale induite par un flash saturant sous illumination actinique continue
F_o :	Fluorescence de base ou morte
$F'o$:	Fluorescence de base obtenue par une lumière analytique modulée après illumination dans le rouge lointain (735 nm)
$F_{50\mu s}, F_{2ms}, F_{30ms}$:	Intensité de fluorescence à 50 μs , 2 et 30 ms
F_J, F_I :	Intensité de fluorescence à la transition J et I
FNR :	Ferrédoxine NADP-réductase (ferrédoxine : NADP ⁺ oxydoréductase)
F_v :	Fluorescence variable
F_X, F_A, F_B :	Premier, deuxième et troisième groupement Fe_4S_4 du PSI
h ν	Lumière
KDa :	Kilodalton

LHCI et LHCII :	Complexe collecteur de lumière (<i>Light Harvesting Complexes</i>) du PSI et du PSII
NADP, NADPH :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme oxydée, sous forme réduite
$^1\text{O}_2$	Oxygène singulet
P	Niveau d'absorbance du P700 sous illumination actinique
P ₀	Niveau d'absorbance du P700 dans l'état maximum réduit
P _m	Niveau d'absorbance du P700 dans l'état maximum oxydé
P' _m	Niveau d'absorbance du P700 induit par un flash saturant
PAM :	« <i>Pulse Amplitude Modulated</i> »
PC :	Plastocyanine
Phéo :	Phéophytine
Pi :	Phosphate inorganique
PGA :	3 phosphoglycérates
POR	NADPH-Protochlorophyllide Oxydoréductase
PQ, PQH ₂ :	Plastoquinone à l'état oxydée et réduite (Plastoquinol)
PSI :	Photosystème I
PSII :	Photosystème II
P680, P680*:	Centre réactionnel du PSII à l'état stable et excité
P700 :	Centre réactionnel du PSI
Q _A :	Quinone A, accepteur primaire d'électron du PSII
Q _B :	Quinone B, accepteur secondaire d'électron du PSII
Q _N :	« <i>quenching</i> » non-photochimique
Q _P :	« <i>quenching</i> » photochimique
RUBISCO :	Ribulose biphosphate carboxylate (3-phospho-D-glycérate carboxylase)
RuBP	Ribulose biphosphate
Y(II)	Dissipation d'énergie sous forme photochimique du PSII
Y(I)	Dissipation d'énergie sous forme photochimique du PSI
Y(NA)	Dissipation d'énergie sous forme non-photochimique causée par une limitation du côté accepteur du PSI

Y(ND)	Dissipation d'énergie sous forme non-photochimique causée par une limitation du coté donneur du PSI
Y(NO)	Dissipation d'énergie sous forme non-photochimique non-régulée du PSII
Y(NPQ)	Dissipation d'énergie sous forme non-photochimique régulée du PSII
Z :	Tyrosine, donneur secondaire d'électrons du PSII
ϕ_{MI} :	Efficacité photochimique maximale du PSII pour une plante adaptée à l'obscurité
ϕ_{MII} :	Efficacité photochimique maximale du PSII pour une plante adaptée à l'obscurité
ϕ'_{MII} :	Efficacité photochimique opérationnelle du PSII à l'état stationnaire du transport d'électrons pour une plante adaptée à une illumination actinique continue

RÉSUMÉ

Les effets du dichromate et de l'aluminium sur le transport d'électrons photosynthétique et les mécanismes de dissipation d'énergie des Photosystèmes II et I ont été évalués quand différentes espèces d'algues ont été exposées aux métaux. Les propriétés structurelles du photosystème II ont été étudiées par immunobuvardage de type *Western blot* et par chromatographie liquide à haute performance. Les propriétés fonctionnelles des Photosystème II et I ont été déterminées par la mesure de la cinétique de fluorescence chlorophyllienne et les changements d'absorbance à 830 nm, respectivement. Pour l'étude des effets du dichromate, l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* et des mutants de *C. reinhardtii* déficients du cycle des xanthophylles ont été utilisés comme modèle biologique. Pour l'aluminium, l'étude des effets de la forme ionique libre Al^{3+} a été effectuée dans un milieu acide (pH 3,0) en utilisant deux espèces d'algues tolérantes à de bas pH, *Euglena gracilis* et *Chlamydomonas acidophila*. Nous avons conclu que les rendements photochimiques maximaux des Photosystèmes II et I sont diminués par les effets du dichromate. L'inhibition de la photochimie par le dichromate cause une diminution de la dissipation d'énergie par la voie photochimique du Photosystème II et une augmentation de la dissipation d'énergie sous forme non-photochimique non-régulée. L'absence d'un cycle des xanthophylles fonctionnel rend l'appareil photosynthétique plus sensible à la photoinhibition induite par la toxicité du dichromate. Pour les effets de l'aluminium sur la photochimie du Photosystème II, la dissipation d'énergie par les voies photochimiques et non-photochimiques est affectée différemment chez des espèces d'algues présentant des résistances différentes aux effets des métaux. Cette inhibition va entraîner une diminution de la production d'ATP et de NADPH menant à une diminution de la production de biomasse chez les algues sensible à l'aluminium.

Mots clés : algues, aluminium, *Chlamydomonas acidophila*, *Chlamydomonas reinhardtii*, dichromate, *Euglena gracilis*, métaux, photosynthèse, Photosystème I, Photosystème II, toxicologie.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La photosynthèse est le processus physiologique qui représente la base de la vie sur notre planète. Dans la photosynthèse, les éléments inorganiques sont transformés en sucres en utilisant l'énergie lumineuse absorbée par les pigments photosynthétiques. Dans le processus primaire de la photosynthèse, l'eau est photooxydée par un système enzymatique pour servir de source primaire d'électrons. Dans ce processus, comme sous-produit l'oxygène est libéré, un gaz essentiel pour la biosphère. Dans le passé, l'activité photosynthétique a changé la composition entière de l'atmosphère (Catling et Claire, 2005).

La lumière provenant du soleil représente la source primaire de l'activité photosynthétique. Les plantes ne sont pas uniformément exposées à la lumière concernant son intensité (quantité de photons atteignant la surface) ou sa qualité (spectre énergétique de la lumière). Les variations dans la quantité et la qualité de la lumière peuvent être très grandes et fréquentes. Sous ces conditions, les organismes photosynthétiques doivent donc avoir la capacité de s'ajuster, à court et long terme, aux changements de lumière absorbée par les photosystèmes.

Lorsque l'énergie lumineuse est absorbée par les pigments des antennes collectrices de lumière, elle peut être dissipée selon différentes voies de dissipation d'énergie. Les processus de transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique, utilisée pour la fixation du dioxyde de carbone, constituent la voie photochimique de dissipation d'énergie lumineuse. Cependant, lorsque l'énergie absorbée excède la capacité de dissipation d'énergie sous forme photochimique, l'appareil photosynthétique peut dissiper l'énergie sous forme non-photochimique, en chaleur. Cette régulation de la dissipation d'énergie dans la photosynthèse permet à la plante de s'ajuster rapidement à différentes conditions d'illumination.

Les mécanismes de dissipation d'énergie lumineuse dans la photosynthèse peuvent être affectés par différents facteurs environnementaux comme l'intensité de la lumière, la température, les nutriments et les polluants environnementaux. Les métaux lourds comme

polluants présents dans les écosystèmes peuvent altérer les processus photosynthétiques par l'inhibition de la photoxydation de l'eau, du transport d'électrons ou des processus de fixation du dioxyde de carbone (Bertrand et Poirier, 2005). En conséquence de l'activité industrielle, la société humaine a introduit une pollution par les métaux lourds dans tous les compartiments des écosystèmes : eau, sol et atmosphère (Connell, 2005). En conséquence de cette contamination, la photosynthèse peut être sévèrement affectée par les effets des métaux lourds. L'inhibition par les métaux lourds peut induire une altération de la dissipation d'énergie dans la photosynthèse primaire et conséquemment changer les voies de dissipation d'énergie par les réactions photochimiques et non-photochimiques. Cependant, les effets de l'inhibition de certains métaux lourds ne sont pas encore bien connus. Les métaux comme le chrome et l'aluminium sont reconnus comme inhibiteurs xénobiotiques mais leurs sites et mécanismes d'action ne sont pas encore éclairés. Sans connaissance fondamentale de leur effet sur la photosynthèse, nous ne sommes pas dans la possibilité de déterminer comment ces polluants vont affecter les voies de dissipation d'énergie chez les plantes.

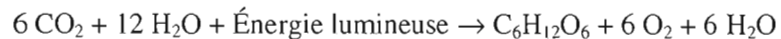
L'objectif global de notre travail de recherche consiste à investiguer les effets du chrome et de l'aluminium, sur les processus de dissipation d'énergie sous formes photochimiques et non-photochimiques des algues. Les effets de l'inhibition de ces métaux sur la dissipation d'énergie dans la photosynthèse vont être investigués pour comprendre la dépendance entre les réactions photochimiques inhibées par les métaux lourds et les différentes voies de dissipation d'énergie. Dans cet objectif, il est important que le rôle de certaines voies de dissipation d'énergie, comme le cycle des xanthophylles, soit investigué lors de l'exposition des algues aux métaux. Dans notre étude, les mutants déficients en certaines enzymes participant dans ce cycle, lorsque exposés à l'inhibition du chrome et de l'aluminium, peuvent offrir un grand avantage dans la détermination de différents mécanismes de régulation de la dissipation d'énergie quand la photosynthèse des plantes est exposée aux métaux.

CHAPITRE I

LA PHOTOSYNTÈSE

1.1 L'ACTIVITÉ PHOTOSYNTÉTIQUE

La photosynthèse est l'ensemble des processus permettant aux organismes photosynthétiques (algues, plantes supérieures et certaines bactéries) d'utiliser l'énergie lumineuse pour la convertir en énergie chimique. Ce processus est couplé d'un mécanisme de dégagement d'oxygène lié à la photolyse de l'eau (H₂O) qui permet, par une chaîne de réactions chimiques et enzymatiques, la réduction du dioxyde de carbone (CO₂) pour la synthèse des glucides (C₆H₁₂O₆). L'équation globale de ces réactions peut être présentée comme (Whitmarsh et Govindjee, 1999) :



L'ensemble de ces réactions se divise en deux phases. La phase lumineuse, dépendante de la participation de la lumière, implique les réactions photochimiques responsables de la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique. Les réactions photochimiques sont liées au transport d'électrons et de protons permettant la synthèse d'adénosine triphosphate (ATP) et de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH). La seconde phase, appelée obscure ou biochimique car elle est indépendante de la lumière, consiste en l'ensemble des réactions biochimiques liées au Cycle de Calvin, où l'ATP et le NADPH sont utilisés pour la transformation du CO₂ en glucides (Blankenship, 2002).

Ces deux phases de la photosynthèse se déroulent en général dans un organe cellulaire appelé chloroplaste, dont la structure et les fonctions sont bien reconnus (Figure 1.1 A et B) (Mustárdy et Garab, 2003 ; Shimoni *et al.*, 2005). Le chloroplaste est entouré

de bicouches lipidiques qui séparent la partie interne du chloroplaste (le *stroma*) du cytoplasme cellulaire (le cytosol). Ce système membranaire permet le transport actif de molécules d'O₂ et CO₂, des ions Mg²⁺, Ca²⁺ et H⁺ ainsi que des molécules de glucides participants aux processus photosynthétiques. L'ensemble des enzymes et cofacteurs impliqués dans la fixation du CO₂ se retrouvent dans le *stroma* du chloroplaste.

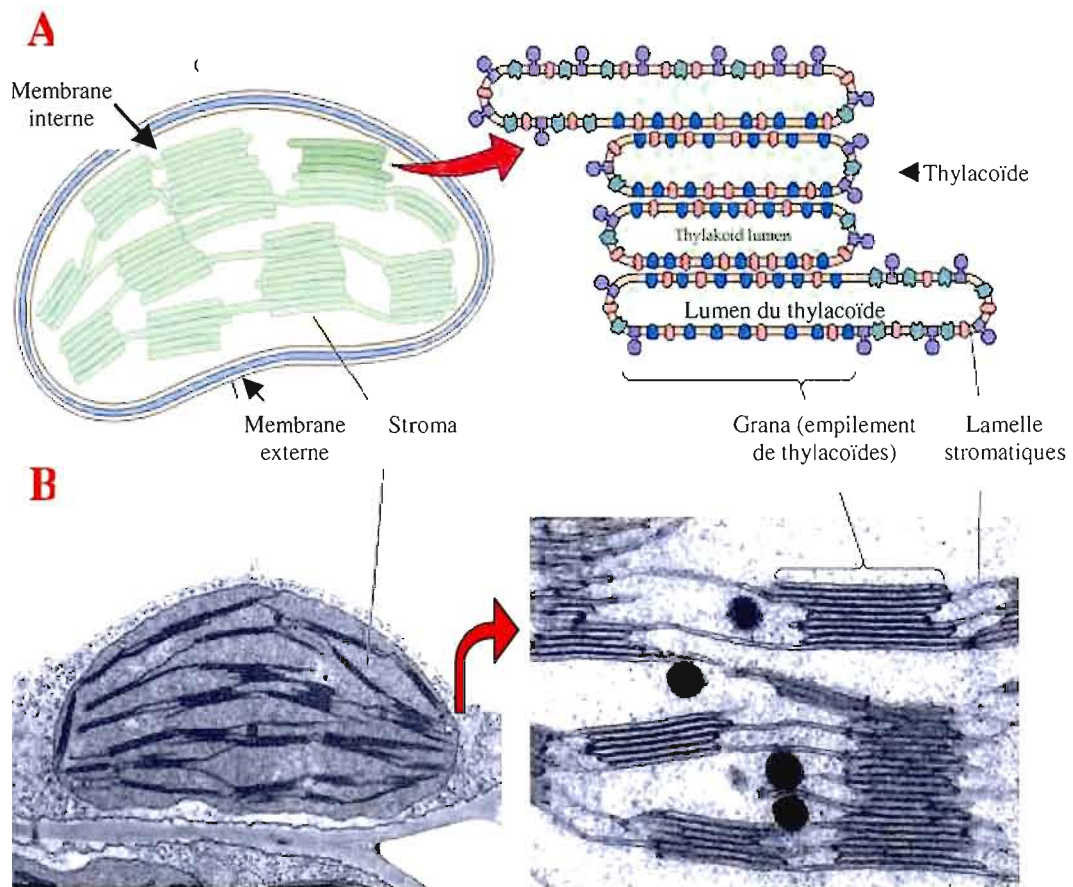


Figure 1.1 : A) Structure schématique d'un chloroplaste. B) Micrographie électronique d'un chloroplaste (d'après Buchanan, 2000 ; Staehelin et van der Staay, 1996).

Dans le stroma du chloroplaste se trouvent des systèmes membranaires, les thylacoïdes, responsables des réactions photochimiques de la photosynthèse. Ce réseau membranaire est organisé en *grana*, des empilements de vésicules aplaties (les lamelles),

reliés entre eux par des thylacoïdes simples, non empilés (les lamelles stromatiques) (Mustárdy et Garab, 2003). Les membranes des thylacoïdes sont composées d'une bichouche de lipides formant un compartiment intérieur appelé *lumen*. On retrouve dans la membrane du thylacoïde quatre types de complexes pigments-protéines responsables de l'absorption de la lumière et du transport d'électrons et de protons photosynthétiques (Dekker et Boekema, 2005). Ces complexes sont présentés sur la Figure 1.2 selon Malkin et Niyogi (2000) : 1. Les antennes collectrices de lumière des Photosystèmes II (LHCII) et I (LHCI) qui sont composées de pigments associés à des protéines membranaires; 2. Les centres réactionnels des photosystèmes II (PSI) et I (PSI) où s'effectuent les réactions photochimiques primaires à partir de l'énergie d'excitation transférée par les LHCII et LHCI; 3. Un ensemble de transporteurs d'électrons entre le PSII et le PSI : les plastoquinones (PQ), les complexes cytochrome b_6f et les plastocyanines (PC); 4. Un système enzymatique transmembranaire, l'ATP synthétase, permettant la synthèse d'ATP par un flux de protons entre le *lumen* et le *stroma*.

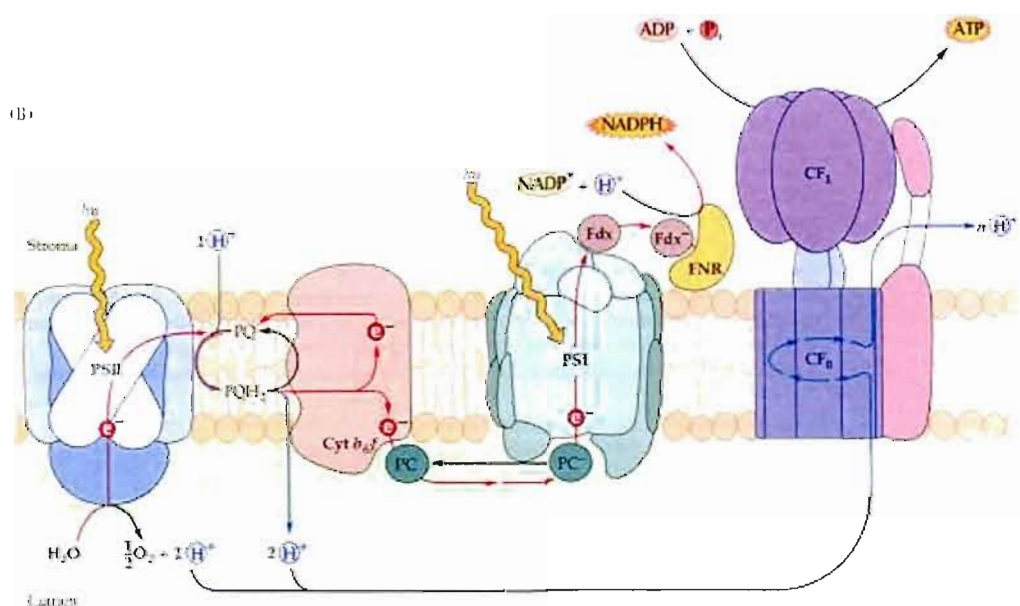


Figure 1.2 : Disposition schématique des transporteurs d'électrons dans la membrane du thylacoïde. Les complexes membranaires sont les photosystèmes II et I, le cytochrome b_6f , la plastocyanine et l'ATP synthétase. Les flèches rouges indiquent le transfert des électrons et les flèches bleues la translocation de protons (d'après Malkin et Niyogi, 2000).

Les complexes du PSII et les LHCII se situent en majorité dans les grana, tandis que les PSI, LHCI et ATP synthétase se situent dans les lamelles stromatiques et les régions marginales du grana. Cependant, les cytochromes b_6/f peuvent être présents dans les grana ainsi que dans les lamelles stromatiques (Hauska *et al.*, 1996).

1.2 ASPECTS STRUCTURAUX DU PHOTOSYSTÈME II

1.2.1 Le complexe antennaire du photosystème II

Le complexe antennaire du PSII est constitué de deux sous-unités, l'antenne interne et l'antenne périphérique. L'antenne interne est étroitement associée au centre réactionnel du PSII (Figure 1.3). Elle est constituée de deux protéines, CP43 et CP47, auxquelles sont liées environ 40 à 50 molécules de chlorophylle (Chl) *a* et une dizaine de molécules de β -carotène (Barber et Kuhlbrandt, 1999). Ces deux complexes permettent le transfert de l'énergie lumineuse des chlorophylles vers le centre réactionnel (P680). L'antenne périphérique est constituée des complexes pigments-protéines CP29, CP26 et CP24 (Figure 1.3). Ces protéines associées à des Chls *a* et *b* ainsi que des molécules de caroténoïdes, comme la lutéine, la néoxanthine, la violaxanthine et la zéaxanthine (Bassi *et al.*, 1997). La composition pigmentaire et la taille des antennes périphériques peuvent varier selon les conditions lumineuses auxquelles les plantes sont exposées (Horton *et al.*, 1996). Le complexe LHCII, au sens strict, constitue l'antenne majeure du PSII, car il contient entre 50 et 60 % de la quantité totale de la Chl (*a* et *b*) (Thornber *et al.*, 1991). Le LHCII est composé de trois types de polypeptides désignés par Lhcb1, 2 et 3 dont le poids moléculaire est compris entre 24 et 29 kilodalton (kDa) (Green et Durnford, 1996). Les complexes pigments-protéines CP29, CP26 et CP24 (aussi connus sous le nom de Lhcb4, Lhcb5 et Lhcb6, respectivement) contiennent une quantité plus faible de Chl *b* que le LHCII. Ils comprennent 5 à 10 % de la Chl totale liée au PSII (Barber et Kuhlbrandt, 1999). Ces protéines sont situées à la périphérie du LHCII et permettent le transfert de l'énergie d'excitation du LHCII au centre réactionnel du PSII via les CP43 et CP47 (Bassi *et al.*, 1997).

1.2.2 Le centre réactionnel du photosystème II

La première réaction photochimique s'effectue au niveau du centre réactionnel, où la séparation de charge va initier le transport d'électrons vers le premier accepteur d'électron, la phéophytine (Dekker et Van Grondelle, 2000). Le centre réactionnel du PSII est constitué de deux protéines majeures, D1 et D2 (dont le poids moléculaire est 32 et 34 kDa, respectivement), qui assurent la stabilité des pigments et des transporteurs d'électrons liés aux PSII. Le cœur du centre réactionnel est une paire spéciale de Chl *a* (P680) qui possède une absorption maximale de la lumière à une longueur d'onde de 680 nm (Govindjee et Coleman, 1990). C'est cette paire spéciale qui permet la séparation de charge et, pour cette raison, le centre réactionnel du PSII est souvent appelé P680.

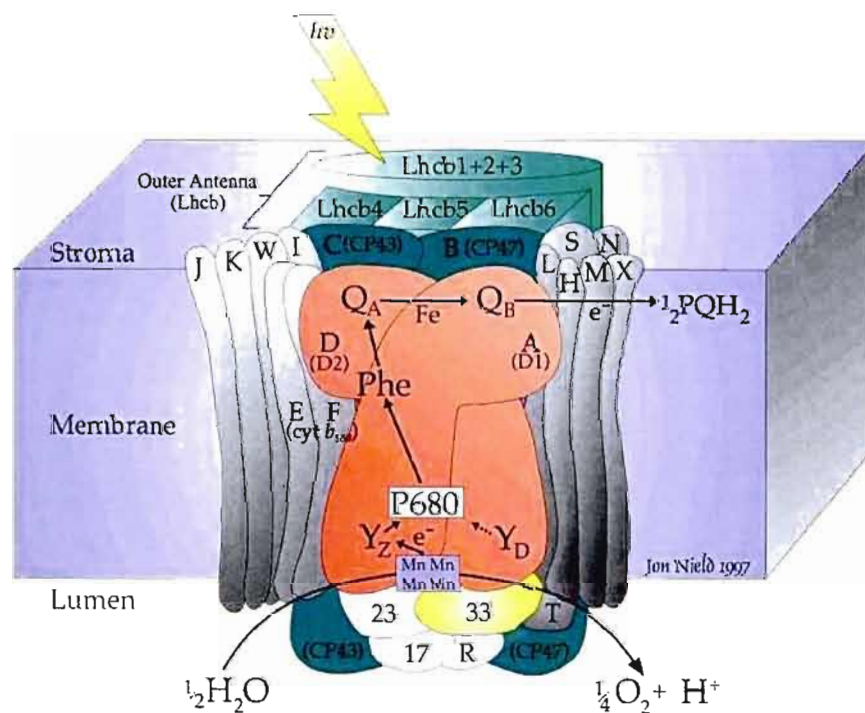


Figure 1.3 : Modèle structural du centre réactionnel du PSII. (D1 et D2 : protéines dominantes du PSII; Mn : tétramère de manganèse; CP43 et CP47 : protéines de l'antenne interne; Lhcb 1,2,3,4,5 et 6 : protéines de l'antenne périphérique; cyt b₅₅₉ : cytochrome b₅₅₉; PQH₂ : plastoquinone réduite; Q_A = quinone a; Q_B = quinone b; E et F sont des protéines formant le cytochrome b₅₅₉; J,K,W,I,L,S,N,H,M et X sont des sous-unités structurales du PSII) (d'après Rawn, 1990).

1.2.3 Le complexe de dégagement d'oxygène

La photolyse de l'eau est effectuée par un système enzymatique appelé complexe de dégagement d'oxygène (CDO) composé d'un tétramère (« *cluster* ») de manganèse (Mn_4Ca) et de trois polypeptides extrinsèques de 33, 24 et 17 kDa (Figure 1.3) (De Las Rivas *et al.*, 2004). La présence de ce complexe est essentielle pour la stabilité et le fonctionnement adéquat du centre réactionnel du PSII. Le polypeptide de 33 kDa permet essentiellement le maintien de la stabilité du « *cluster* » de manganèse, la liaison des ions Cl^- et Ca^{2+} au système de photolyse de l'eau (Miyao et Murata, 1984 ; Heredia et De Las Rivas, 2003 ; Popelkova *et al.*, 2006). Il préserve également la stabilité des protéines CP47, CP43, D1 et 17 kDa au sein du complexe PSII (Yi *et al.*, 2005). Les polypeptides de 24 kDa et 17 kDa permettent un rendement optimal de l'oxydation de l'eau où les cofacteurs nécessaires sont les ions Ca^{2+} et Cl^- (Seidler, 1996; Haumann et Jung, 1999 ; Wincencjusz *et al.*, 1999).

1.3 ASPECTS FONCTIONNELS DU PHOTOSYSTÈME II

1.3.1 Absorption de l'énergie lumineuse

L'absorption de la lumière se fait, au niveau des antennes collectrices de lumière du PSII, par différents pigments, soit la Chl *a* et ses pigments accessoires, la Chl *b* et les caroténoïdes. Chacun de ces pigments, dont les structures moléculaires sont montrées à la figure 1.4, absorbent la lumière à des longueurs d'ondes spécifiques. La somme des spectres d'absorption de ces pigments, illustrée à la figure 1.5, permet de couvrir la majorité du spectre de la lumière visible, ce qui permet à l'appareil photosynthétique d'exploiter l'énergie lumineuse de façon optimale (Govindjee and Govindjee, 1974). Lorsqu'un pigment photosynthétique absorbe un photon, il passe rapidement (10^{-15} s) d'un état fondamental à un état excité, possédant un plus haut niveau d'énergie.

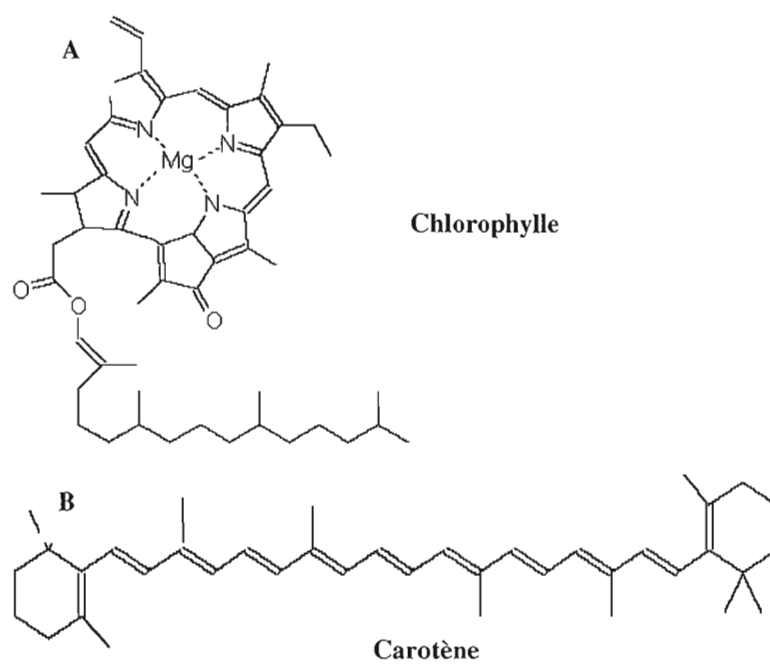


Figure 1.4 : Structure moléculaire des molécules des pigments (A) chlorophylle et (B) carotène.

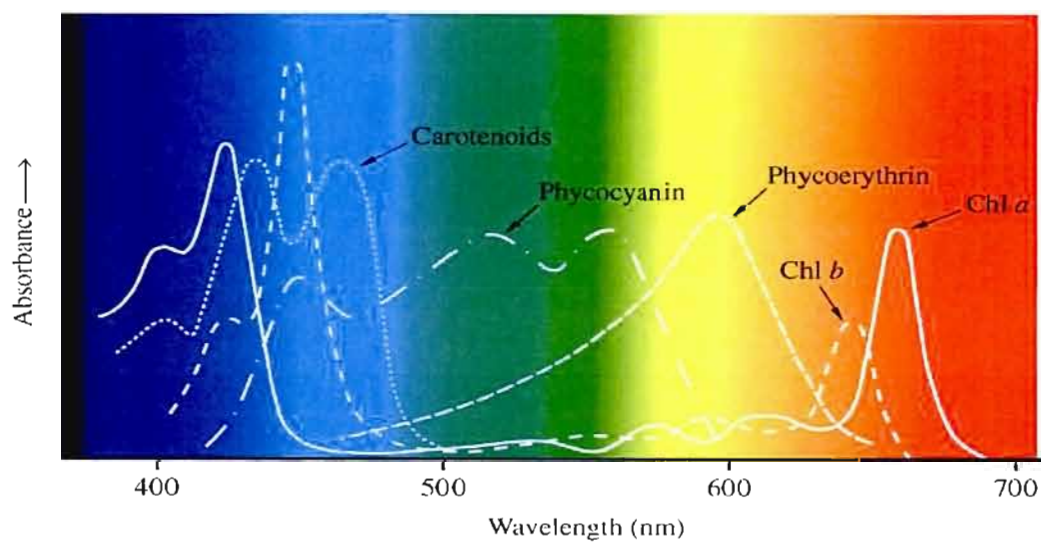


Figure 1.5 : Spectres d'absorption de différents pigments photosynthétiques (d'après Rawn, 1990).

Dans le cas de pigments comme les Chl, qui possèdent deux maximums d'absorption très distincts, on observe deux niveaux d'énergie de l'état singulet excité ($^1\text{Chl}^*$). Le premier état singulet excité se forme par absorption d'un photon de lumière rouge et le second état singulet excité par un photon de lumière bleue (Figure 1.6 A). L'énergie d'excitation est transférée par résonance d'une molécule de chlorophylle à l'autre au niveau des antennes collectrices de lumière, de façon aléatoire jusqu'à la paire spéciale de Chl *a* du centre réactionnel du PSII, le P680 (Figure 1.6 B). Ce dernier passera de son état stable (P680) à un état excité (P680^*). L'état excité de la chlorophylle devra alors être relaxé par différentes voies de dissipation d'énergie.

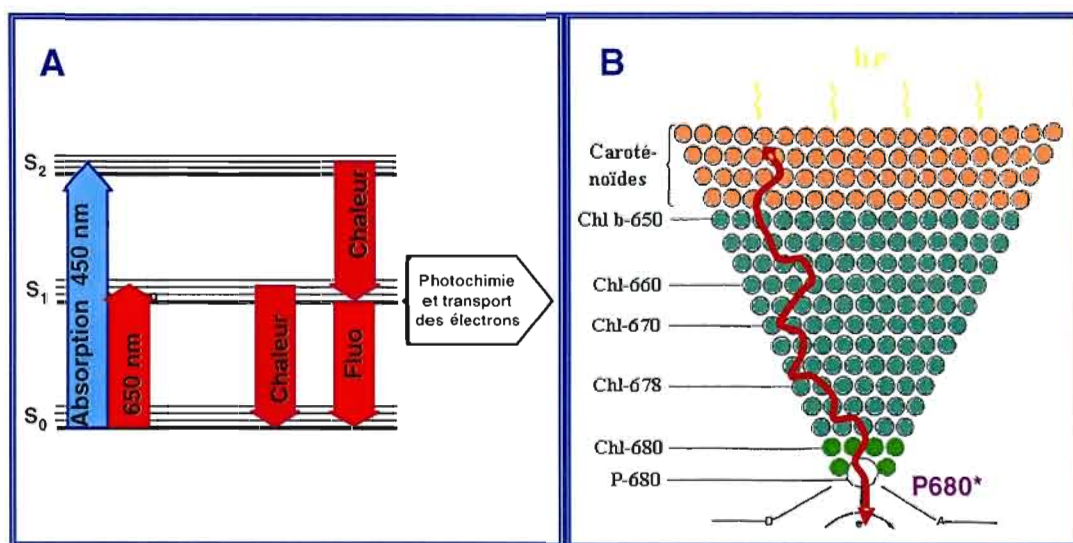


Figure 1.6 : A) Niveau d'énergie des états singulets excités d'une molécule de chlorophylle et les mécanismes de dissipation d'énergie (Fluo = Fluorescence) (d'après Buchanan *et al.*, 2000). B) Organisation schématique des pigments des antennes collectrices de lumière participant au transfert d'énergie dans le PSII. La flèche indique un cheminement aléatoire d'un photon parmi les pigments jusqu'au centre réactionnel du PSII (d'après Jupin et Lamant, 1999).

1.3.2 Dissipation d'énergie au niveau du photosystème II

Il existe 4 voies de dissipation d'énergie au niveau du PSII (Figure 1.7) :

- 1) Photochimique
- 2) non-photochimique (chaleur).
- 3) Fluorescence
- 4) Formation d'espèces réactives d'oxygène (ERO)

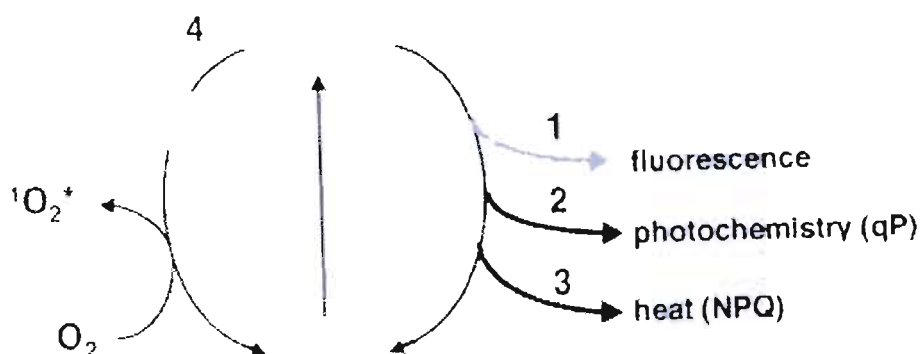


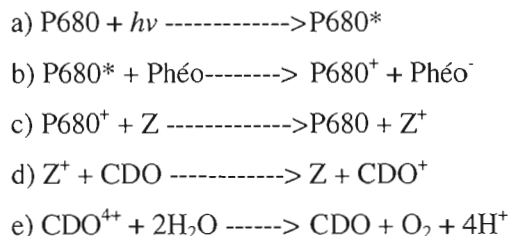
Figure 1.7 : Voies de dissipation d'énergie de la chlorophylle excitée du PSII (d'après Müller *et al.*, 2001).

Ces quatre voies par lesquelles l'énergie d'excitation de la Chl^* est dissipée compétitionnent les unes avec les autres. La diminution de la dissipation par l'une des voies augmentera la dissipation via les trois autres formes de dissipation d'énergie.

1.3.3 Séparation de charge dans la réaction photochimique primaire du PSII

Lorsque le P680 reçoit l'énergie des antennes collectrices de lumière et passe à l'état excité P680^* , la première réaction photochimique est la séparation de charges, où un électron du P680^* sera transféré vers la phéophytine (Phéo), l'accepteur primaire d'électron du PSII. Le P680 aura alors l'état oxydé P680^+ et recevra un électron du résidu tyrosine (Z) de la

protéine D1, le donneur primaire d'électron du PSII. La forme oxydée Z^+ accepte un électron en provenance du CDO. La séparation de charge est présentée par les équations :



Les réactions de a) à d) décrivent l'absorption d'un seul photon permettant une seule séparation de charge. Cependant, quatre charges positives doivent s'accumuler sur le CDO, comme conséquence de quatre séparations de charge (4 photons), pour la photooxydation de l'eau et la formation d'une molécule d'oxygène (Dekker et Van Grondelle, 2000).

Le rendement de formation d'oxygène pendant la photooxydation de l'eau passe par un cycle de 5 étapes qui sont reconnus comme les états « S », schématisés à la figure 1.8. Présentement, le modèle des états « S » permet de mieux comprendre les étapes de la photolyse de l'eau associée aux réactions photochimiques primaires du PSII (Kok *et al.*, 1970). Selon ce modèle, chaque fois que le $P680^*$ effectue la séparation de charges, le CDO acquiert une charge positive par transfert d'un électron à Z^+ . Chaque transfert d'un électron du CDO permet le passage d'un état "S" à un autre (notés S_0 , S_1 , S_2 , S_3 et S_4) qui sont caractérisés par différents rendements de production d' O_2 . Ce mécanisme de photooxydation de l'eau permet de fractionner deux molécules d' H_2O pour obtenir une molécule d' O_2 et quatre protons qui sont libérés dans le *lumen* du thylacoïde contribuant à la formation du gradient de protons utilisé pour la formation d'ATP. La photooxydation de l'eau se déroule à l'étape S_4 , ce qui entraîne l'émission d'une molécule d' O_2 et le retour à l'état S_1 . Quatre électrons, extraits dans cette réaction, sont utilisés pour le transport d'électrons via le PSII et PSI.

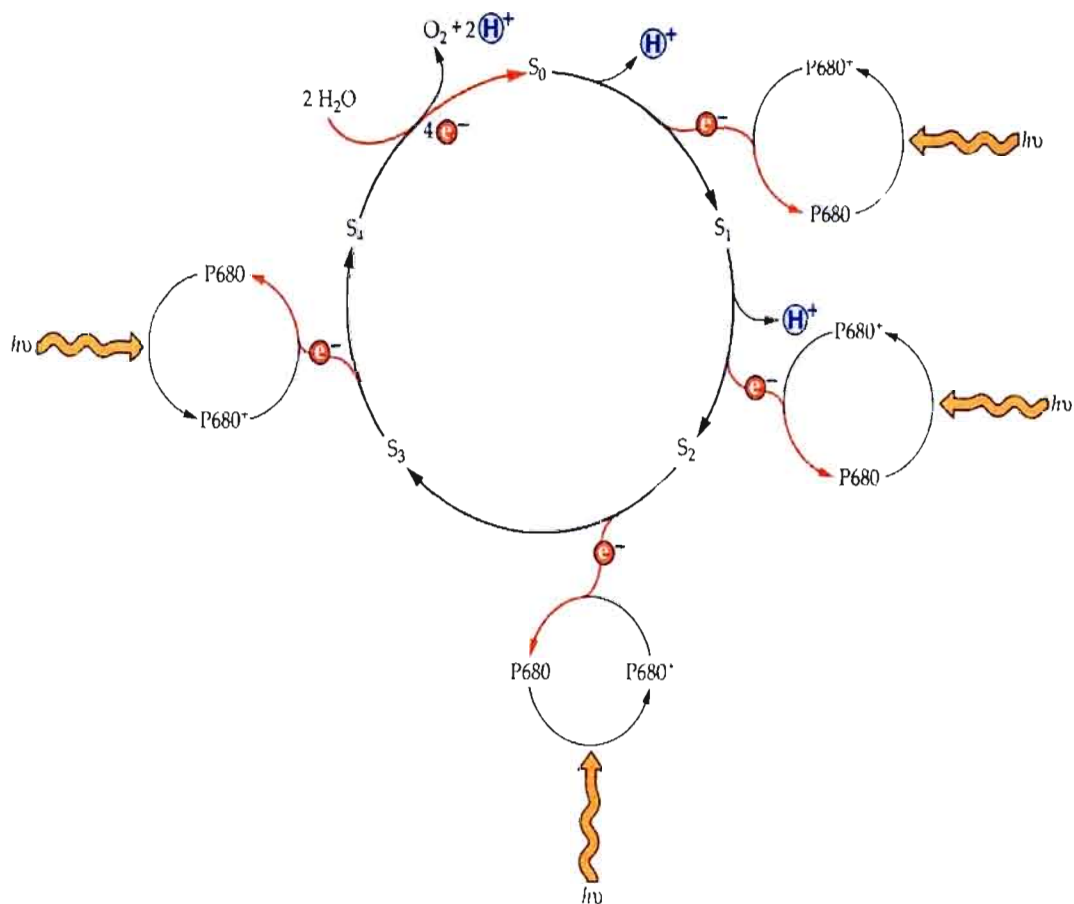


Figure 1.8 : Schéma de la formation des états S et la production de protons pendant la photooxydation de l'eau conduisant au dégagement d'O₂ (d'après Buchanan, 2000).

1.3.4 Le transport transmembranaire des électrons

Après la première séparation de charge au PSII et la réduction de la phéophytine, l'électron est transféré vers les quinones A et B (Q_A et Q_B) et PQ et ensuite au cytochrome b₆ et les PC. Le transfert des électrons via Q_B et les PQ est lié au transport de protons transmembranaire (Baker *et al.*, 2007). Dans cette réaction, la PQ, liée au site Q_B, accepte deux électrons de Q_A. La réduction de la PQ induit une modification de la configuration stéréochimique de la molécule. Les deux charges négatives de la PQ sont neutralisées par

deux protons (PQH_2) en provenance du *stroma*, se dissocient du site Q_B et les protons sont libérés dans le *lumen* du thylacoïde (Heller *et al.*, 1998). Le site Q_B est de nouveau disponible pour être associé avec une nouvelle molécule de PQ (Whitmarsh et Govindjee, 1999). Les molécules de PQ, libérées des protons, vont transmettre leurs électrons au cytochrome b_6f . Les électrons, par une chaîne d'oxydoréduction, sont transmis aux PC qui représentent les donneurs d'électrons au PSI (P700^+). Ce transfert d'électrons est maintenu par les différences de potentiel redox entre les donneurs et accepteurs d'électrons. En considérant les différences dans le potentiel d'oxydoréduction des transporteurs d'électrons associés au PSII et PSI, le transport linéaire d'électrons peut être présenté comme un schéma en Z selon le modèle de Hill et Bendall.

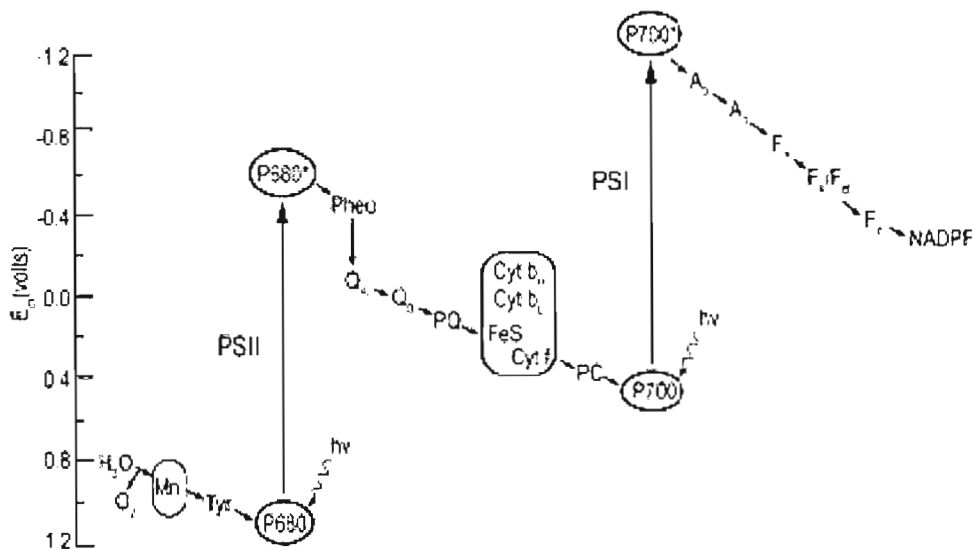


Figure 1.9 : Schéma en Z des réactions de transfert d'électrons photosynthétique en fonction de leur potentiel d'oxydoréduction. P680 et P700 représentent les centres réactionnels du PSII et du PSI. P680* et P700* sont leur forme excitée par l'absorption de l'énergie lumineuse ($h\nu$). Pheo, Q_A , Q_B et PQ sont les accepteurs d'électrons du PSII. Cyt b_H , Cyt b_L , FeS et Cyt f sont les différentes sous-unités et cofacteurs du cytochrome b_6f . PC est la plastocyanine qui transporte les électrons du cytochrome b_6f au PSI. A_0 , A_1 , F_x , F_a/F_B et F_D sont les accepteurs d'électrons du PSI. NADPF est l'enzyme ferredoxine NADP-réductase qui réduit le NADP^+ en NADPH. (d'après Whitmarsh, 1998).

1.3.5 La photophosphorylation liée à la formation du gradient de protons dans le lumen

Le transport linéaire d'électron est couplé au niveau du CDO et des PQH₂ avec un transport de protons de l'extérieur (*stroma*) vers l'intérieur du thylacoïde. Le gradient de protons est utilisé pour déclencher l'activité de l'ATP synthétase (ATP Phosphohydrolase, EC 3.6.3.14) participant dans la formation d'ATP par l'adénosine diphosphate (ADP) et le phosphate inorganique (Pi) provenant du stroma du chloroplaste ($ADP + P_i + 4H^+ = ATP$) (Mitchell, 1974 ; Boyer, 1993). L'enzyme ATP synthétase est constituée de deux parties disposées comme le montre la figure 1.10 : une partie hydrophobe CF₀ qui permet le passage des protons de l'intérieur vers l'extérieur des thylacoïdes et une partie hydrophile CF₁, associée au *stroma*, qui contient les sites catalytiques participant à la synthèse d'ATP (Lehninger *et al.*, 1994).

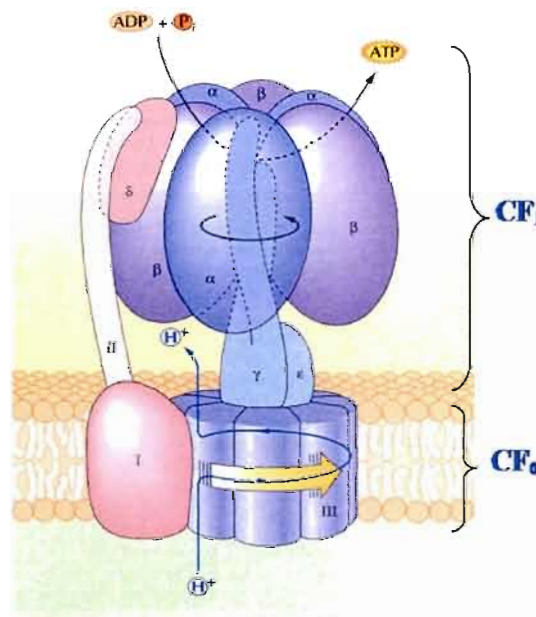


Figure 1.10 : Modèle de la structure du complexe ATP synthétase. Le CF₁ se compose des cinq sous-unités polypeptidiques α, β, γ, δ, ε. Le CF₀ est constitué des sous-unités I, II et III (d'après Mallkin et Niyogi, 2000).

1.3.6 Dissipation d'énergie sous forme de chaleur

Une partie de l'énergie absorbée par les antennes collectrices de lumière est dissipée sous forme non-photochimique, en chaleur. Dans la photosynthèse, la dissipation d'énergie par la voie non-photochimique peut montrer une considérable variation qui représente une part des mécanismes de protection de l'appareil photosynthétique contre un excès d'énergie lumineuse absorbée par les pigments (Niyogi, 2000). On a déterminé que la dissipation d'énergie en excès sous forme de chaleur constitue la principale voie de régulation de l'énergie non dommageable dans les photosystèmes (Horton *et al.*, 1996).

Dans la photosynthèse, la dissipation d'énergie sous forme non-photochimique peut prendre différentes voies selon les conditions environnementales et les propriétés spécifiques des espèces de plantes (Demmig-Adams and Adams, 2006). Le plus important mécanisme de régulation de la dissipation d'énergie par la voie non-photochimique est le cycle des xanthophylles. Dans ce processus, contrôlé par l'enzyme violaxanthine dé-époxydase (violaxanthine :ascorbate oxydoréductase, EC 1.10.99.3), la violaxanthine est transformée de façon réversible en zéaxanthine, via le pigment intermédiaire anthéaxanthine. Les étapes de ce processus sont présentées à la figure 1.11. La zéaxanthine peut accepter directement l'énergie d'excitation des chlorophylles des antennes collectrices de lumière, menant à la dissipation d'énergie sous forme de chaleur (Horton *et al.*, 1994; Demmig-Adams *et al.*, 1996). La liaison de la zéaxanthine avec les complexes protéiques du PSII se fait avec la participation de la protéine PsbS, qui est essentielle à la régulation de la dissipation d'énergie sous forme de chaleur (Niyogi *et al.*, 2004). La protonation de la protéine PsbS suite à l'acidification du lumen induit un changement de conformation au niveau du PSII qui, avec la liaison de la zéaxanthine, permet la dissipation d'énergie sous forme de chaleur. Il a aussi été proposé que ce changement de conformation induit, au niveau du PSII, un transport non-linéaire d'électrons impliquant le cytochrome b559, une sous-unité périphérique du PSII. Ce transport alternatif permettrait de protéger le PSII lors d'un excès de lumière (Poulson *et al.*, 1995) selon le mécanisme illustré à la figure 1.12.

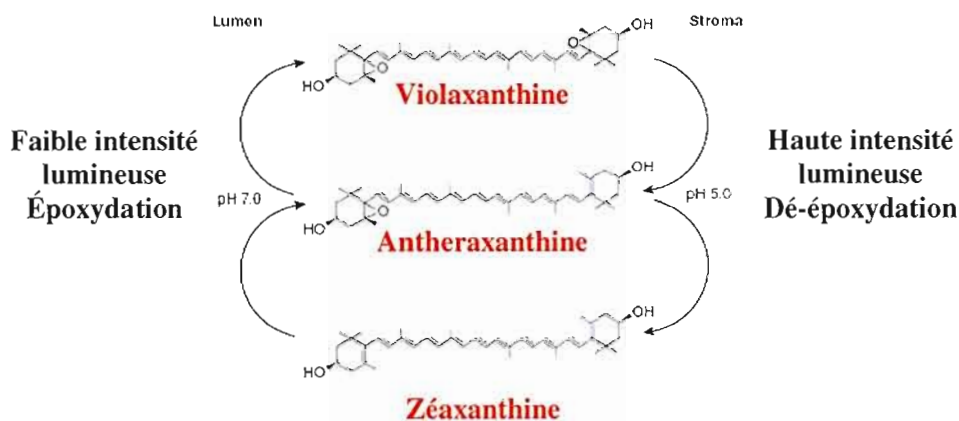


Figure 1.11 : Cycle des xanthophylles lors de la régulation de la dissipation d'énergie lumineuse. Les pH 7.0 et 5.0 sont les pH optimaux des enzymes zéaxanthine époxydase et violaxanthine dé-époxydase, respectivement (d'après Niyogi *et al.*, 1997a).

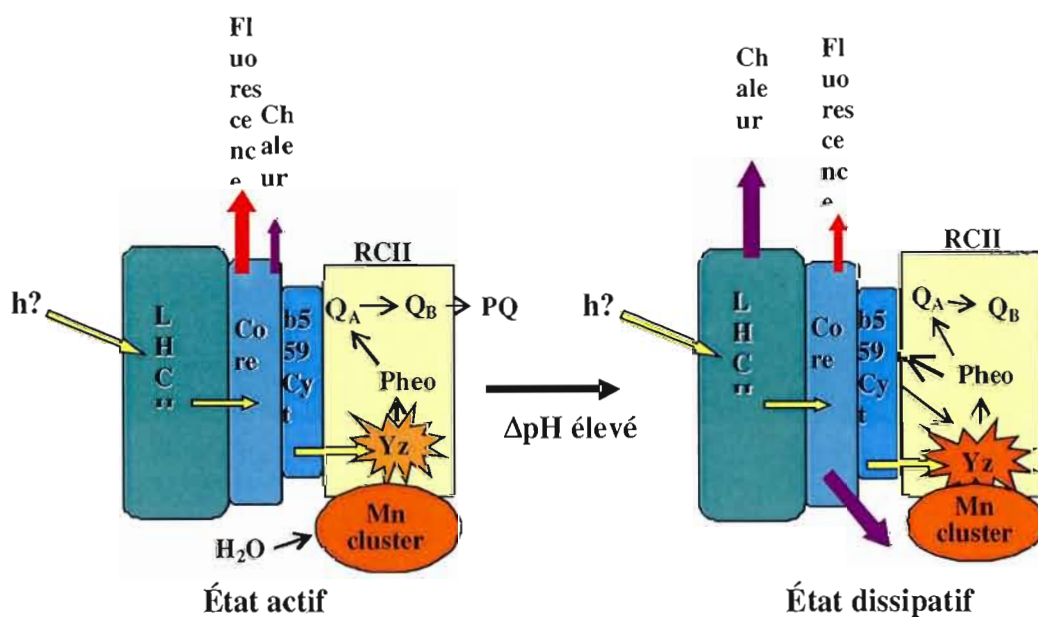


Figure 1.12 : Schéma du transport cyclique du PSII impliquant le cytochrome b559 (Cyt b559) participant à la régulation de la dissipation d'énergie (élaboré d'après Critchley, 1998).

En dehors du cycle des xanthophylles, la zéaxanthine peut aussi se retrouver sous forme libre dans les membranes du thylacoïde, où elle agit comme antioxydant, protégeant les membranes contre la peroxydation des lipides induite par les ERO (Moronsito *et al.*, 2003). La zéaxanthine a aussi été suggérée comme jouant un rôle dans la synthèse *de novo* de la protéine D1 (Jahns *et al.*, 2000).

1.3.7 Dissipation d'énergie sous forme de fluorescence

La dissipation d'énergie sous forme de fluorescence a été découverte en 1931 par Kautsky et Hirsh (1931). Après une illumination d'une plante, la fluorescence réémise par les pigments photosynthétiques montre une intensité variable donnant une cinétique spécifique appelée aujourd'hui «effet Kautsky ». Plusieurs facteurs physiologiques et environnementaux peuvent affecter la dissipation d'énergie sous forme de fluorescence concernant son intensité en fonction du temps. L'émission de fluorescence a été utilisée dans les derniers 70 ans comme outil d'investigation des réactions photochimiques et du transport d'électrons associés au PSII et PSI. En général, la dissipation d'énergie par la fluorescence compétitionne avec la dissipation d'énergie par les voies photochimiques et non-photochimiques. La diminution du transfert d'énergie par la photochimie et le transport d'électrons va donc augmenter la dissipation via la fluorescence et la chaleur.

La fluorescence chlorophyllienne est issue des Chl *a* des LHCII. Les Chl *b* servent comme pigments accessoires transférant rapidement l'énergie d'excitation aux molécules de Chl *a* (Lazar, 1999). Lorsque la Chl *a* absorbe un photon et passe d'un état stable à un état excité, elle peut revenir à l'état stable par les voies suivantes : transfert de l'énergie d'excitation à une molécule voisine par un processus aléatoire avant que l'excitation soit transférée au centre réactionnel du PSII, dissipation de l'énergie d'excitation sous forme de chaleur, réémission d'un photon sous forme de fluorescence ou formation de ERO. L'énergie dissipée par la fluorescence, sous ces conditions, représente la fluorescence de base (F_0) connue comme fluorescence non variable ou morte. Cependant, quand la dissipation d'énergie provenant de la séparation de charge au centre réactionnel du PSII n'est pas réalisée par le transport d'électrons (les transporteurs d'électrons sont à l'état réduit), la dissipation

d'énergie par la fluorescence sera intensifiée à cause de la recombinaison de la séparation de charge connue comme re-réduction de $P680^+$ par $Pheo^-$. Quand l'accepteur primaire du PSII, Q_A , est dans l'état oxydé par la chaîne de transport d'électrons, la fluorescence va être diminuée (Duyens et Sweers, 1963 ; Papageorgiou, 1975). La fluorescence variable, sous ces conditions, est directement dépendante de l'état d'oxydoréduction des transporteurs d'électrons du PSII et du PSI. Donc, lors d'une illumination d'intensité saturante, les accepteurs primaires d'électrons du PSII sont à l'état réduit (Q_A^-). Sous ces conditions, le rendement de fluorescence variable sera maximal (F_M). La différence entre l'intensité de fluorescence émise par les LHCII lorsque tous les centres réactionnels sont ouverts (Q_A) et lorsque les centres réactionnels sont à l'état fermé (Q_A^-) donne la fluorescence variable, qui dépend de la capacité photochimique du PSII.

1.3.8 La cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne

Quand une plante adaptée à l'obscurité est exposée à une lumière saturante permettant à Q_A , l'accepteur primaire d'électron du PSII, d'être réduit par les électrons venant de la Pheo, la fluorescence variable, dépendante du transport d'électrons, montre une croissance rapide avec une cinétique qui possède différentes transitions d'états.

Sur une durée de 1 sec, la cinétique rapide a un passage du rendement de fluorescence d'un niveau F_O au niveau maximal F_M . Lorsqu'elle est présentée sur une échelle de temps logarithmique, cette cinétique montre les transitions : F_O , F_J , F_I et F_P ($F_P = F_M$). Ces transitions représentent différents états d'oxydoréduction des transporteurs d'électrons associés au PSII. La fluorescence évaluée à 50 μ sec d'illumination est considérée comme le rendement de fluorescence F_O (Strasser et Stirbet, 2001). La phase O-J représente la réduction de l'accepteur primaire d'électrons Q_A (Neubauer et Schreiber, 1987). Le niveau de fluorescence à la transition I (F_I) correspond à la première réduction de Q_B ($Q_A^-Q_B^-$) (Strasser *et al.*, 1995). La phase I-P reflète une accumulation progressive de Q_B doublement réduite ($Q_A^-Q_B^{2-}$) (Strasser et Govindjee, 1991). Donc, le niveau F_P indique la réduction maximale du PSII, où les PQ sont réduites (Vredenberg, 2000). Après la transition P, le rendement de fluorescence montre une diminution progressive, appelée effet « quenching ». Cette

diminution est causée par le transfert des électrons du PSII vers le PSI et le NADP^+ (Krause et Weis, 1991). Cependant, la transition K (300 μsec), qui peut apparaître avant la transition J, est caractérisée seulement quand le CDO est inactivé (Strasser, 1997).

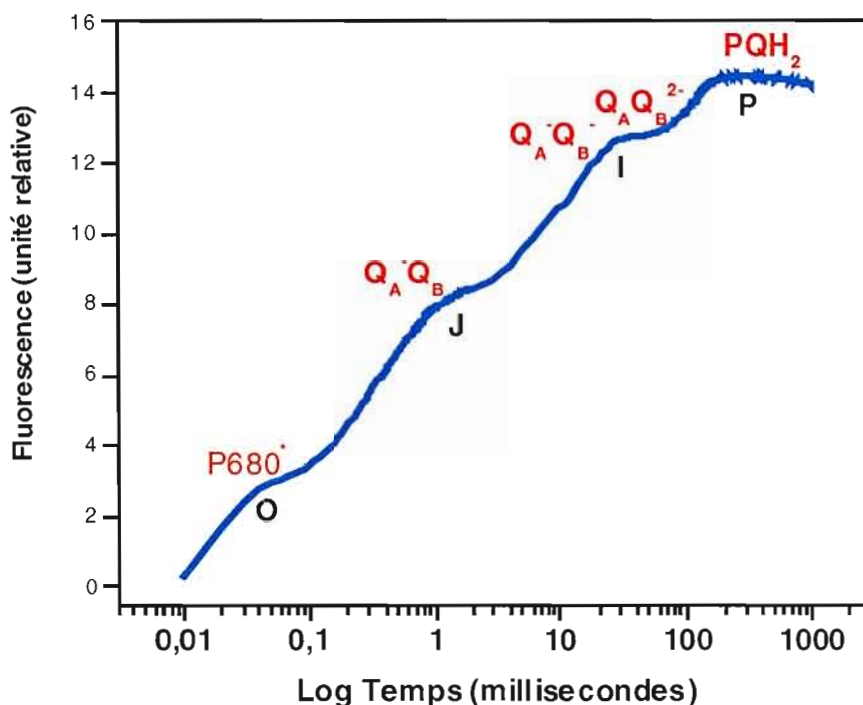


Figure 1.13 : Cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne montrant les transitions O-J-I-P, mesurée sur une échelle de temps logarithmique. Q_A et Q_B sont les accepteurs primaire et secondaire du PSII; PQH_2 est la plastoquinone à l'état réduite (D'après Strasser *et al.*, 1995).

L'acquisition de la cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne permet d'estimer plusieurs paramètres de fluorescence connus comme indicateurs du fonctionnement et de la dissipation d'énergie via la photochimie du PSII. L'évaluation de ces paramètres est basée sur le rendement de fluorescence aux transitions O, J, et I, qui apparaissent à 50 μsec ($F_{50\mu\text{sec}}$), 2 msec ($F_{2\text{msec}}$) et 30 msec ($F_{30\text{msec}}$), respectivement. Le temps d'apparition du rendement F_P peut varier en fonction du temps de 500 msec et plus. Dans notre recherche, nous avons utilisé :

- Le rendement photochimique maximal du PSII, Φ_{MII} :

$$\Phi_{MII} = (F_M - F_{50\mu\text{sec}}) / F_M \quad (\text{Strasser } et al., 2004)$$

où $F_{50\mu\text{sec}}$ = rendement de fluorescence considéré comme F_0 et F_M = rendement de fluorescence maximal (transition P).

- L'absorption de l'énergie lumineuse par les antennes collectrices de lumière (ABS) distribuée par centre réactionnel du PSII actif (RC) , ABS/RC :

$$ABS/RC = M_0 / V_J / \Phi_{MII} \quad (\text{Force } et al., 2003)$$

où : $M_0 = F_{300\mu\text{sec}} - F_{50\mu\text{sec}} / (F_M - F_{50\mu\text{sec}}) \times 0.25$ représente la vitesse initiale de l'induction de la fluorescence variable; $V_J = F_{2\text{msec}} - F_{50\mu\text{sec}} / F_M - F_{50\mu\text{sec}}$ représente le taux de la réduction de Q_A .

- La quantité d'énergie lumineuse utilisée pour la séparation de charge du PSII (TR_0) par centre réactionnel actif RC représente le ratio TR_0 / RC :

$$TR_0 / RC = M_0 / V_J \quad (\text{Force } et al., 2003)$$

- Le transfert des électrons de Q_A^- vers les transporteurs d'électrons au-delà de Q_A (ET_0) par centre réactionnel du PSII actif (RC) est le ratio ET_0 / RC :

$$ET_0 / RC = (M_0 / V_J) \times (1 - V_J) \quad (\text{Force } et al., 2003)$$

- La proportion de l'énergie lumineuse absorbée par centre réactionnel du PSII actif qui ne sera pas utilisée pour la photochimie et conséquemment dissipée sous forme de chaleur (DI_0) est évaluée par le ratio, DI_0 / RC :

$$DI_0 / RC = ABS/RC - M_0 / V_J \quad (\text{Strasser } et al., 2000)$$

La figure 1.14 indique comment l'énergie lumineuse est absorbée et utilisée par le PSII, selon la théorie des flux d'énergies dans les membranes biologiques (Strasser *et al.*, 2004).

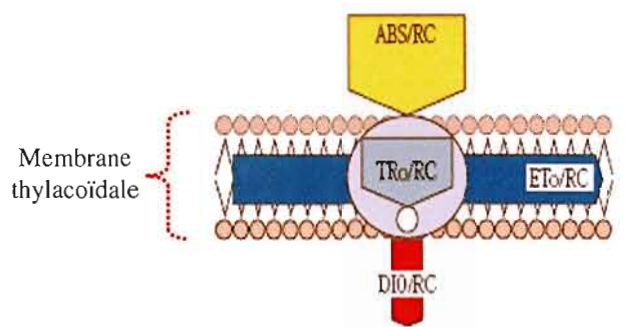


Figure 1.14 : Modèle du flux d'énergie lumineuse absorbée par les LHCII (ABS/RC), utilisée pour la séparation de charge (TR₀/RC) et le transport d'électrons (ET₀/RC) ou dissipée sous forme de chaleur (DI₀/RC) (d'après Zrýd *et al.*, 2002).

1.3.9 La fluorescence chlorophyllienne modulée

La mesure de la fluorescence chlorophyllienne modulée permet d'évaluer le fonctionnement du transport d'électrons des PSII et PSI (Rohacek et Bartak, 1999). La fluorimétrie PAM (*Pulse Amplitude Modulated*) est une méthode basée sur l'utilisation de quatre types de lumière comme l'illustre la figure : une lumière analytique modulée (594 nm), une lumière actinique continue (400-700 nm), une lumière saturante (400-700 nm) et une lumière rouge lointain (735 nm).

Avant la mesure, la feuille est adaptée à l'obscurité (15 min) pour atteindre un équilibre où les transporteurs d'électrons photosynthétiques des PSII et PSI sont oxydés. La plante est ensuite exposée à une lumière modulée analytique de faible intensité, insuffisante pour induire une séparation de charge par les centres réactionnels. Sous ces conditions, le rendement de fluorescence F_0 représente la dissipation d'énergie réémise des antennes collectrices de lumière lorsque le P680 est à l'état oxydé. L'application d'un flash saturant chez une plante adaptée à l'obscurité permet de déterminer le rendement maximal de fluorescence (F_M) lorsque tout les centres réactionnels sont fermés et que Q_A , comme accepteur primaire du PSII, est dans un état réduit. Ce niveau maximal de fluorescence obtenu est utilisé pour évaluer la fluorescence variable ($F_v = F_M - F_0$) comme indicateur de la capacité de transport d'électron du PSII quand la plante est exposée à la lumière saturante.

Lorsque la plante est exposée à une illumination continue (lumière actinique), les différents processus photosynthétiques sont déclenchés. La fluorescence induite par une illumination continue va passer par différentes transitions (P , S_1 , M_1 , S_2 , M_2) avant d'atteindre un niveau stable F_S . La fluorescence variable à l'état stationnaire ($F_{VS} = F_S - F_O$) est liée à la proportion de centres réactionnels du PSII qui restent fermés dans la plante adaptée à la lumière continue. L'application de flash saturant durant l'adaptation à la lumière permet de déterminer le rendement de fluorescence F'_M , sous la lumière actinique, qui est utilisé pour évaluer l'activité fonctionnelle du PSII participant dans le transport d'électrons, connu comme « quenching » photochimique de fluorescence (Q_P), et aussi d'évaluer la portion de la diminution de fluorescence qui n'est pas restaurée par le flash saturant, connu comme « quenching » non-photochimique de fluorescence (Q_N) qui indique la dissipation d'énergie sous la forme de chaleur. À l'état stationnaire du transport d'électrons, il est possible de déterminer la fluorescence de base (F'_O), qui est évaluée quand la lumière actinique est éteinte et que la plante est exposée à une illumination rouge lointain qui induit une oxidation totale des transporteurs d'électrons du PSII en excitant uniquement la photochimie du PSI (Schreiber *et al.*, 1986; Rohacek et Bartak, 1999).

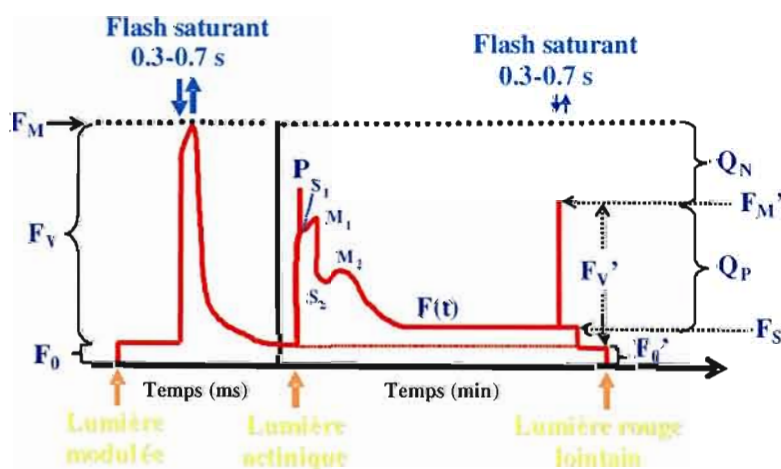


Figure 1.15 : Cinétique de fluorescence modulée mesurée à l'aide d'un fluorimètre PAM. F_O et F'_O , fluorescence de base pour une plante adaptée à l'obscurité et à la lumière, respectivement; F_V et F'_V , fluorescence variable pour une plante adaptée à l'obscurité et à la lumière, respectivement; F_M et F'_M , fluorescence maximale pour une plante adaptée à l'obscurité et à la lumière, respectivement; Q_N , «quenching» non photochimique; Q_P , «quenching» photochimique (élaboré d'après Schreiber *et al.*, 1986)

La mesure de la fluorescence chlorophyllienne modulée permet d'évaluer différents paramètres liés à l'aspect fonctionnel du PSII et à la dissipation de l'énergie lumineuse absorbée. Nous allons présenter plusieurs paramètres :

Le rendement photochimique maximal du PSII, Φ_{MII} :

$$\Phi_{MII} = (F_M - F_O) / F_M = F_V / F_M \quad (\text{Butler et Kitajima, 1975})$$

représente le rendement quantique dépendant du transfert des électrons du P680 à l'accepteur primaire Q_A .

Le rendement photochimique des PSII ouverts, Φ'_{MII} :

$$\Phi'_{MII} = (F'_M - F'_O) / F'_M = F'_V / F'_M \quad (\text{Genty } et al., 1989)$$

représente le rendement photochimique du PSII quand la plante est adaptée à la lumière. Φ'_{MII} est un indicateur des centres réactionnels du PSII participants aux réactions photochimiques et au transport d'électrons vers le PSI dans une plante adaptée à la lumière (Rohacek, 2002). Selon Kramer *et al.* (2004), le paramètre $Y(II)$ est utilisé aussi comme synonyme pour Φ'_{MII} .

Le « quenching » photochimique de fluorescence, Q_P :

$$Q_P = (F'_M - F_S) / (F'_M - F'_O) \quad (\text{Schreiber } et al., 1986)$$

représente l'atténuation, quenching, de fluorescence causée par les réactions photochimiques liées au transport d'électrons. Ce paramètre représente un indicateur des centres réactionnels du PSII participant au transport d'électrons.

Le quenching non-photochimique de fluorescence est causé par plusieurs mécanismes qui se divisent en deux classes : les mécanismes régulés par la plante et les mécanismes non-régulés.

Le « quenching » non-photochimique de fluorescence, Q_N :

$$Q_N = 1 - [(F'_M - F'_O) / (F_M - F_O)] \quad (\text{Van Kooten } et al., 1990)$$

représente l'atténuation, quenching, de fluorescence induit par les réactions non-photochimiques. Ce paramètre représente la dissipation d'énergie sous forme non-radiative (Havaux *et al.*, 1991), qui comprend les mécanismes régulés et non-régulés.

La dissipation d'énergie sous forme non-photochimique non-régulée, $Y(NO)$:

$$- Y(NO) = 1 / ((F_M - F'_M / F'_M) + 1 + (Q_P \times F'_O / F_S) \times (F_M / F_O - 1)) \quad (\text{Kramer } et al., 2004)$$

représente la dissipation d'énergie par les centre réactionnels fermés (non-fonctionnels) ou endommagés.

La dissipation d'énergie sous forme non-photochimique régulée, $Y(NPQ)$:

$$- Y(NPQ) = 1 - Y(II) - Y(NO) \quad (\text{Kramer } et al., 2004)$$

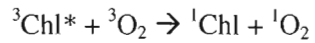
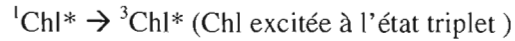
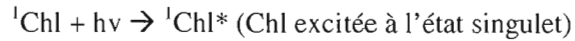
représente la dissipation d'énergie par voie non-photochimique régulée du PSII. Ces mécanismes impliquent les rôles du cycle des xanthophylles et de la protéine PsbS.

Selon le modèle de Kramer *et al.* (2004), la dissipation d'énergie du PSII a été évaluée comme la somme de $Y(II) + Y(NQP) + Y(NO) = 1$.

1.3.10 Formation de ERO dans le transport d'électrons des photosystèmes II et I

À son état stable, la molécule d'oxygène est biradicalaire, c'est-à-dire qu'elle possède deux électrons de spin parallèle sur sa couche électronique externe. Cette propriété rend l' O_2 non réactif avec les molécules organiques ayant des électrons de spin opposé. Cependant, les radicaux libres qui proviennent de l'oxygène ont sur leur couche électronique externe un électron célibataire seulement ; en conséquence, ils possèdent une grande réactivité envers les molécules biologiques (McKersie et Leschem, 1994).

Lorsque l'énergie absorbée par les LHCII excède la capacité de dissipation d'énergie par photochimie, chaleur et autres processus de dissipation, la chlorophylle excitée $^1Chl^*$ passe à l'état triplet ($^3Chl^*$), qui peut transmettre l'énergie à l'oxygène pour former l'oxygène singulet (1O_2) selon les étapes suivantes :



Donc, les antennes collectrices de lumière du PSII peuvent représenter, sous certaines conditions, une source importante de la formation des ERO (Figure 1.17 ; Nishiyama *et al.*, 2006). La production d'oxygène singulet par le PSII se fait habituellement sous de hautes intensités lumineuses, lors d'une inhibition du transport d'électrons par différents polluants ou lors de stress thermique causé par les basses températures (Niyogi, 1999). Cependant, le PSII contribue aussi à la formation des ERO pendant la photolyse de l'eau.

Sous certaines conditions, le PSI peut également entraîner la production de ERO. Il est connu que la réduction de l'oxygène en ion superoxyde peut être induite par la ferrédoxine NADP⁺ réductase (FNR) au niveau du PSI (Asada, 1994). Cette voie devient importante lorsque le cycle de Calvin est inhibé par les xénobiotiques. Dans ces conditions, peu de NADP⁺ est disponible et le PSI accumule des électrons qui vont induire la formation de l'ion superoxyde. Les sites de formation d'ERO dans la chaîne de transport d'électrons photosynthétique sont présentés à la figure 1.16.

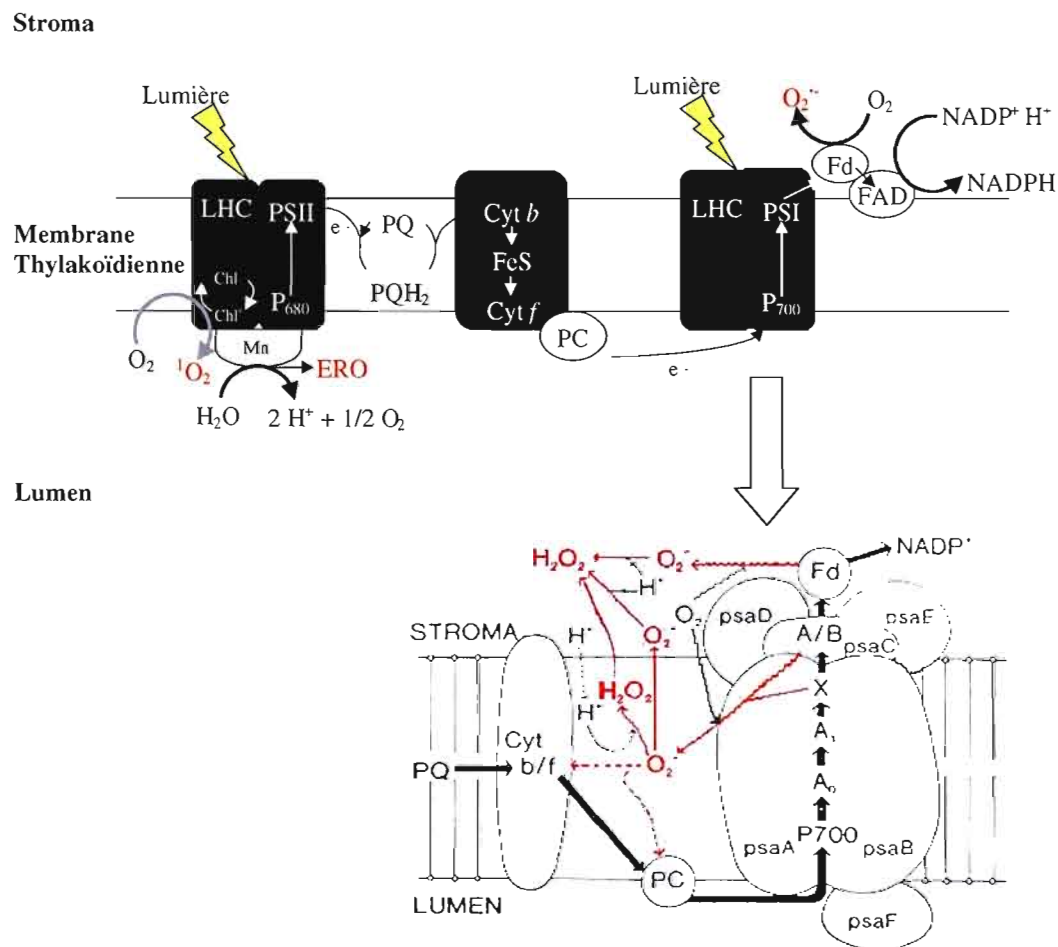


Figure 1.16 : Sites de formation d'ERO pendant la photosynthèse. (A) Pendant le transport des électrons entre le PSII et PSI. (B) Détails de la formation des ERO pendant le transport d'électrons au niveau du PSI (d'après Asada, 1994; McKersie et Leshem, 1994). Les abréviations sont décrites p. 14.

1.4 ASPECTS STRUCTURAUX DU PHOTOSYSTÈME I

Le PSI, dans les organismes photosynthétiques supérieurs, est fonctionnellement lié au PSII par les transporteurs d'électrons PQ et PC. Bien que le PSI comporte plusieurs similarités avec le PSII, on peut noter des différences majeures au niveau structurel et fonctionnel entre les deux photosystèmes. Le PSI est un complexe composé de 19 sous-unités protéiques et d'environ 175 molécules de Chl, deux phylloquinones et trois groupements Fe₄S₄ (Ben-Shem *et al.*, 2003). Ce complexe est divisé en deux grandes unités fonctionnelles, l'antenne collectrice de lumière et le centre réactionnel.

1.4.1 Les antennes collectrices de lumière du photosystème I

Le complexe antennaire du PSI (LHCI) est divisé en deux sous-unités, l'antenne interne et l'antenne périphérique. L'antenne interne consiste en une centaine de molécules de Chl *a* et en une vingtaine de β-carotènes, liées majoritairement au centre réactionnel par les sous-unités protéiques PsaA et PsaB (Jordan *et al.*, 2001). L'antenne périphérique contient environ 75 molécules de Chl *a* et quelques molécules de caroténoïdes, comme la lutéine et la violaxanthine (Schmid *et al.*, 2002). À la différence du LHCII, le LHCI contient très peu de Chl *b* et également un type de Chl particulier, appelé « Chl rouge » qui absorbe préférentiellement la lumière au-delà de 700 nm. La nature de ces Chl spéciales restent encore non résolue, mais la forme spectrale de ces chlorophylles se retrouvent dans la plupart des organismes photosynthétiques (Gobets *et al.*, 2001, Karapetyan *et al.*, 2006).

1.4.2 Le centre réactionnel du photosystème I

Le centre réactionnel du PSI est un monomère composé de 17 sous-unités protéiques (PsaA à PsaN) dont le rôle est connu et de 2 aux fonctions inconnues (PsaO et PsaP) (Knoetzel *et al.*, 2002; Ben-Shem *et al.*, 2003; Khrouchtchova *et al.*, 2005). La figure 1.17 illustre la disposition de ces différentes sous-unités protéiques.

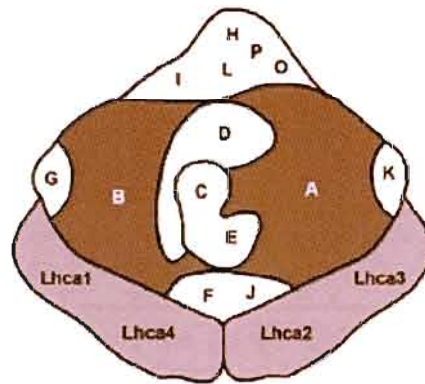


Figure 1.17 : Schéma de l'organisation structurale du PSI. A à F : Les sous-unités protéiques PsaA à PsaF constituant le centre réactionnel du PSI ; Lhca1 à 4 : Sous-unités protéiques constituant le LHCI. (d'après Jansen *et al.*, 2007).

Les sous-unités PsaA, PsaB et PsaC participent à la séparation de charge au niveau de PSI. Ces trois sous-unités permettent la liaison des cofacteurs essentiels à la séparation de charge : le P700 (un dimère de Chl *a*), A₀ (une molécule de Chl *a*), A₁ (une phylloquinone), F_x, F_A et F_B (trois complexes Fe₄S₄).

1.5 ASPECTS FONCTIONNELS DU PHOTOSYSTÈME I

1.5.1 Absorption et transfert de l'énergie lumineuse du photosystème I

Pareillement au PSII, l'absorption de la lumière par le PSI se fait par les molécules de Chl du LHCI. Les ¹Chl* des LHCI possèdent cependant deux façons de dissiper leur énergie d'excitation : par transfert d'énergie à une autre molécule de Chl ou par dissipation sous forme de chaleur. Lorsque l'énergie d'excitation parvient au centre réactionnel du PSI, le P700 induit une séparation de charge et un transport d'électrons vers le premier accepteur d'électron A₀. L'électron est transféré au second accepteur A₁, vers les trois accepteurs Fe₄S₄ : F_x, F_A et F_B puis à la ferrédoxine (Fdx). La Fdx est oxydée dans une réaction enzymatique catalysée par la ferrédoxine NADP-réductase (ferrédoxine : NADP⁺

oxydoréductase; FNR). Dans cette réaction, le NADP^+ provenant du *stroma* sera réduit en NADPH (Chitnis, 2001). Le modèle des aspects fonctionnels et structurels du transfert d'électrons est présenté sur la figure 1.18 selon Malkin et Niyogi (2000). Les réactions photochimiques et le transport d'électrons sont caractérisés par une grande efficacité, avec un rendement quantique de 1 dans les conditions où la photochimie n'est pas limitée (Hiyama, 1985). Pour cette raison, la fluorescence variable n'apparaît pas comme une forme de dissipation d'énergie (Dau, 1994).

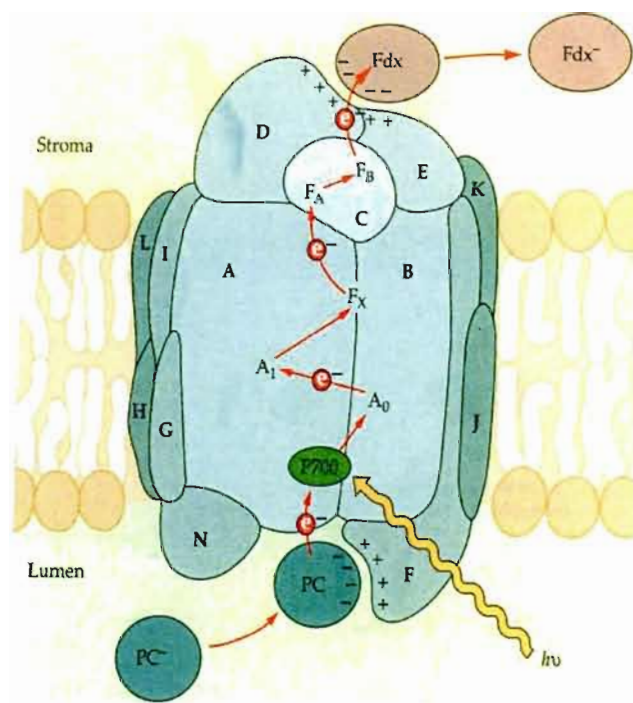


Figure 1.18 : Schéma du transport d'électrons via le PSI. Les transporteurs d'électrons associés au PSI sont les PC, P700, A_0 , A_1 , F_x , F_A , F_B et Fdx. Les sous-unités protéiques constituant le centre réactionnel du PSI sont indiquées par les lettres. (Malkin et Niyogi, 2000).

1.5.2 Mesure de l'activité du P700

La fluorescence ne peut donc pas être utilisée pour mesurer l'activité du PSI, puisque l'oxydation du P700 en P700⁺ par la séparation de charge n'entraîne pas de changement de fluorescence au niveau des LHCI. Cependant, l'oxydation du P700 induit un changement d'absorbance qui peut être utilisé comme indicateur de la photochimie du PSI. La figure 1.19 montre le spectre de différence entre les formes réduite et oxydée du P700. Le maximum du changement d'absorption du P700 se trouve à 700 nm, cependant, à cause la grande absorbance des chlorophylles dans cette région, le changement d'absorption est mesuré à 830 nm pour évaluer l'activité du PSI.

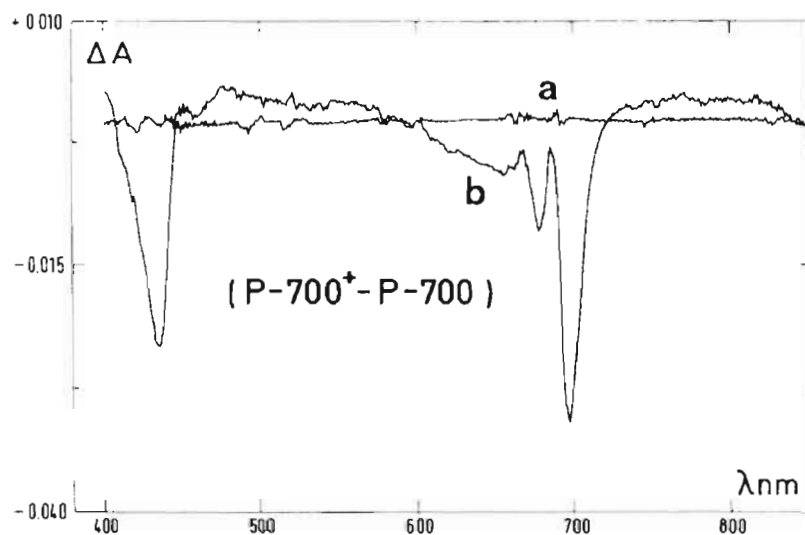


Figure 1.19 : Spectre de différence entre l'absorption de la forme oxydée et réduite du P700. Les lettres a et b indiquent la ligne de base et le spectre de différence entre P700⁺ et P700, respectivement (d'après Mathis *et al.*, 1988).

L'activité photochimique du PSI est évaluée par la méthode de Klughammer et Schreiber (1994). Les changements d'absorbance à 830 nm utilisés pour évaluer l'activité photochimique du PSI sont présentés à la figure 1.20.

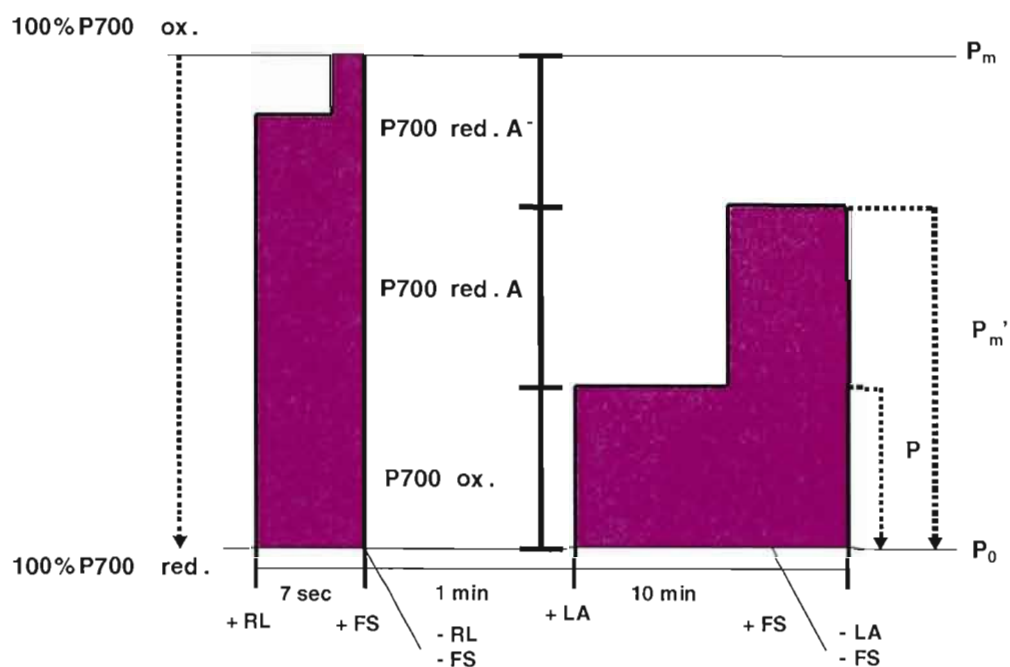


Figure 1.20 : Détermination de la photochimie et de la dissipation d'énergie du PSI par mesure du changement d'absorption à 830 nm. L'oxydation du P700 est caractérisée par un changement positif d'absorbance. 100%P700 red. : P700 à l'état réduit après adaptation à l'obscurité ; 100%P700 ox. : P700 à l'état oxydé quand la plante est exposée au flash saturant en présence d'illumination rouge lointain (735 nm) ; P700 ox. : portion des centres réactionnels à l'état oxydé ; P700red.A et P700 red.A⁻ : centres réactionnels P700 qui peuvent et ne peuvent pas être réduits, respectivement, quand la plante est exposée à un flash saturant en présence de lumière actinique. P₀ : niveau d'absorption lorsque les P700 sont réduits (100% P700 red.) ; P_m : niveau d'absorption lorsque les P700 sont oxydés (100% P700 ox.) ; P : niveau d'absorption induit par une illumination actinique ; P_m' : niveau d'absorption induit par un flash saturant en présence de lumière actinique ; FS : flash saturant ; RL ; illumination rouge lointain (735 nm) ; LA : illumination actinique (d'après Klughammer et Sreiber, 2008).

Les centres réactionnels du PSI sont dans un état maximum réduit (P₀) après une adaptation à l'obscurité. Quand la plante est exposée à la lumière saturante lors d'une exposition à la lumière rouge lointain, les centres réactionnels du PSI sont dans un état maximum oxydé (P_m). La plante est ensuite exposée à la lumière continue (actinique), après une adaptation à l'obscurité et une partie des P700 va être dans un état oxydé (P).

L'application d'un flash saturant lors de l'illumination actinique, les P700 vont être oxydés (P_m') sans arriver au maximum d'oxydation.

Le rendement photochimique maximal du PSI, chez une plante adaptée à l'obscurité, est évalué par l'application d'un flash saturant qui va induire une oxydation maximale du P700, indiqué par :

$$\Phi_M I = P_m' - P_0 \quad (\text{Klughammer et Schreiber, 1992})$$

P_m' représente le niveau d'absorption de l'état maximal de P700⁺, induit par un flash saturant. P_0 représente l'absorption du P700 à l'état maximum réduit, induit par une adaptation à l'obscurité.

Quand la plante est exposée à la lumière continue, la dissipation d'énergie via le PSI peut être aussi évaluée par le changement d'absorption du P700. La dissipation d'énergie via le PSI est répartie dans trois catégories : 1. Dissipation d'énergie par voie photochimique ; 2. Dissipation d'énergie non-photochimique déterminée par une limitation du côté donneur du PSI ; 3. Dissipation d'énergie par la voie non-photochimique déterminée par une limitation du côté accepteur du PSI.

La dissipation d'énergie par voie photochimique :

$$Y(I) = P_m' - P / P_m - P_0 \quad (\text{Klughammer et Schreiber, 2008})$$

qui représente la portion des PSI à l'état P700 – A_0 , où le P700 est à l'état réduit et A_0 , le premier accepteur d'électron, est à l'état oxydé. Dans cette équation, P est le niveau d'absorbance de P700 sous illumination continue.

La dissipation d'énergie par voie non-photochimique due à une limitation du côté donneur est estimée par :

$$Y(ND) = P - P_0 / P_m - P_0 \quad (\text{Klughammer et Schreiber, 2008})$$

qui représente la portion des P700 à l'état oxydé (P700⁺), donc incapable de séparation de charge, sous une illumination continue. La réduction du P700 se fait par le passage des électrons du PSII vers le PSI, une limitation du côté donneur du PSI indique donc une diminution de transport d'électrons entre les deux photosystèmes.

La dissipation d'énergie par voie non-photochimique due à une limitation du coté accepteur est estimée par :

$$Y(\text{NA}) = P_m - P_m' / P_m - P_0 \quad (\text{Klughammer et Schreiber, 2008})$$

qui représente la fraction des P700 à l'état $P700 - A_0^-$, soit que le P700 est réduit mais incapable de donner un électron car l'accepteur primaire A_0 est réduit. Dans cette équation, P_m est le niveau d'absorbance de l'oxydation maximale du P700, lorsqu'un flash saturant est appliqué après une illumination dans le rouge lointain (assurant une excitation préférentielle du P700). La limitation du coté accepteur du P700 est observée lorsque les électrons du PSI ne sont pas transférés au NADP^+ , soit par une diminution de l'activité du Cycle de Calvin ou de la FNR. En absence d'accepteur d'électron, aucune oxydation du P700 ne peut se produire (Rutherford et Heathcote, 1985 ; Golbeck, 1987).

La distribution d'énergie au niveau du PSI dans une plante adaptée à la lumière (sous illumination continue) est estimée par la somme de la dissipation photochimique du PSI ($Y(\text{I})$) et de la dissipation non-photochimique causée par une limitation du coté accepteur ($Y(\text{NA})$) ou du coté donneur ($Y(\text{ND})$) du PSI comme

$$Y(\text{I}) + Y(\text{NA}) + Y(\text{ND}) = 1 \quad (\text{Klughammer et Schreiber, 2008})$$

1.6 DISTRIBUTION DE L'ÉNERGIE ENTRE LES DEUX PHOTOSYSTÈMES

Le PSII et le PSI ont des spectres différents d'absorption de l'énergie lumineuse et absorbent préférentiellement la lumière à des longueurs d'ondes spécifiques, soit 650 nm et 710 nm pour les PSII et PSI, respectivement (Malkin et Niyogi, 2000). Comme la plante n'est pas toujours exposée au même spectre et intensité de lumière, la proportion de l'énergie lumineuse absorbée par les PSII et PSI peut aussi varier. Pour s'adapter à ce changement de conditions écologiques, les PSII et PSI passent par des changements structurels et fonctionnels appelés états de transition.

Le processus des états de transitions permet d'ajuster à court terme la quantité de lumière absorbée par les PSII et PSI (Bellafiore *et al.*, 2005 ; Kanervo *et al.*, 2005). Le changement de l'état de transition I à l'état II est caractérisé par une diminution de la taille des antennes LHCII du PSII par rapport au PSI. La régulation de la taille des antennes collectrices de lumière se fait par la phosphorylation réversible des polypeptides Lhcb1 et Lhcb2 des antennes LHCII contrôlée par l'état d'oxydo-réduction des PQ, comme illustré à la figure 1.19 (Wollman, 2001). Lorsque la capacité de transport d'électrons du PSII est plus forte que celle du PSI, une accumulation de PQ réduite (PQH_2) va activer une kinase responsable pour la phosphorylation du LHCII. La phosphorylation du LHCII déclenche son détachement du PSII et induit une migration vers le PSI. Sous ces conditions, le PSI augmente sa surface d'absorption de la lumière et conséquemment son transport d'électrons. La réaction inverse se produit lorsque le transport d'électron du PSI est plus élevé que celui du PSII, induisant une accumulation de PQ oxydée.

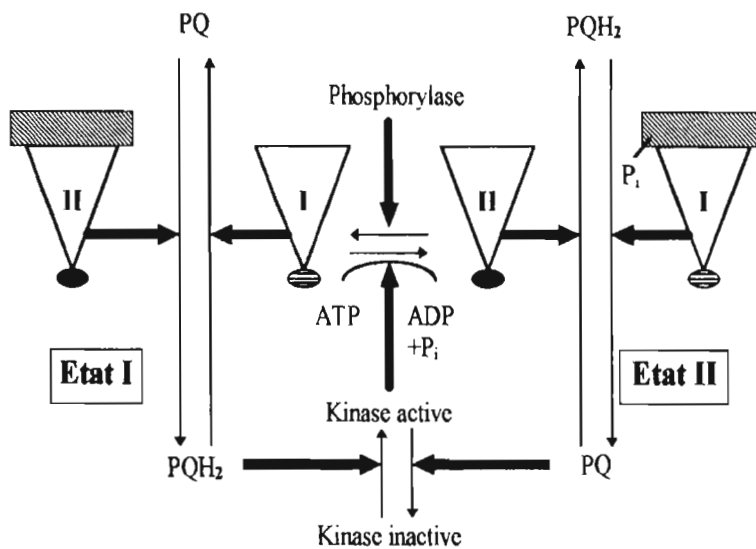


Figure 1.21 : Schéma de la régulation des changements d'état I et II par l'induction de la phosphorylation des LHCII (Jupin et Lamant, 1999). Les rectangles achurés indiquent la proportion des LHCII mobiles.

Lorsque le débalancement entre les capacités de transport d'électrons des PSII et PSI est de longue durée, ou que les états de transition ne peuvent réajuster l'équilibre entre les deux photosystèmes, un changement dans la stoechiométrie entre le PSII et le PSI peut être observée. Ce changement dans le nombre de PSII par rapport au nombre de PSI peut s'effectuer dans le cas d'altération dans le spectre de lumière (Murakami *et al.*, 1997) ou dans les besoins énergétiques de l'organisme (Kovacs *et al.*, 2000). L'ajustement de la stoechiométrie peut se faire par l'ajustement du nombre de PSII ou du nombre de PSI (Fujita, 1997 ; Kovacs *et al.*, 2000). Ce changement dans le ratio entre les deux photosystèmes permet de conserver un rendement photochimique optimal sous toutes conditions (Melis *et al.*, 1996).

1.7 LES RÉACTIONS BIOCHIMIQUES DE LA PHOTOSYNTHÈSE

Les réactions sombres, à l'opposition des réactions claires (photochimie primaire, séparation de charge et transport d'électrons), peuvent se produire à l'obscurité. Ces réactions permettent la fixation du CO₂ et la synthèse de glucides par la consommation d'ATP et de NADPH produits lors des réactions claires. Le CO₂ est fixé dans le stroma du chloroplaste par le cycle de Calvin en trois étapes. Premièrement, le CO₂ est fixé pendant la carbolyxation du ribulose 1,5-biphosphate (RuBP) via la ribulose-1,5-biphosphate carboxylase (Rubisco), en produisant 3 phosphoglycérates (PGA). Ensuite, le PGA est réduit en triose phosphate (3-phosphoglyceraldéhyde) qui sera transféré dans le cytosol et utilisé pour la formation de sucrose. L'accepteur du CO₂, la RuBP, sera régénéré pour un nouveau cycle (Raines, 2003). La fixation du CO₂ menant à la synthèse de sucres sont connues comme cycle de Calvin.

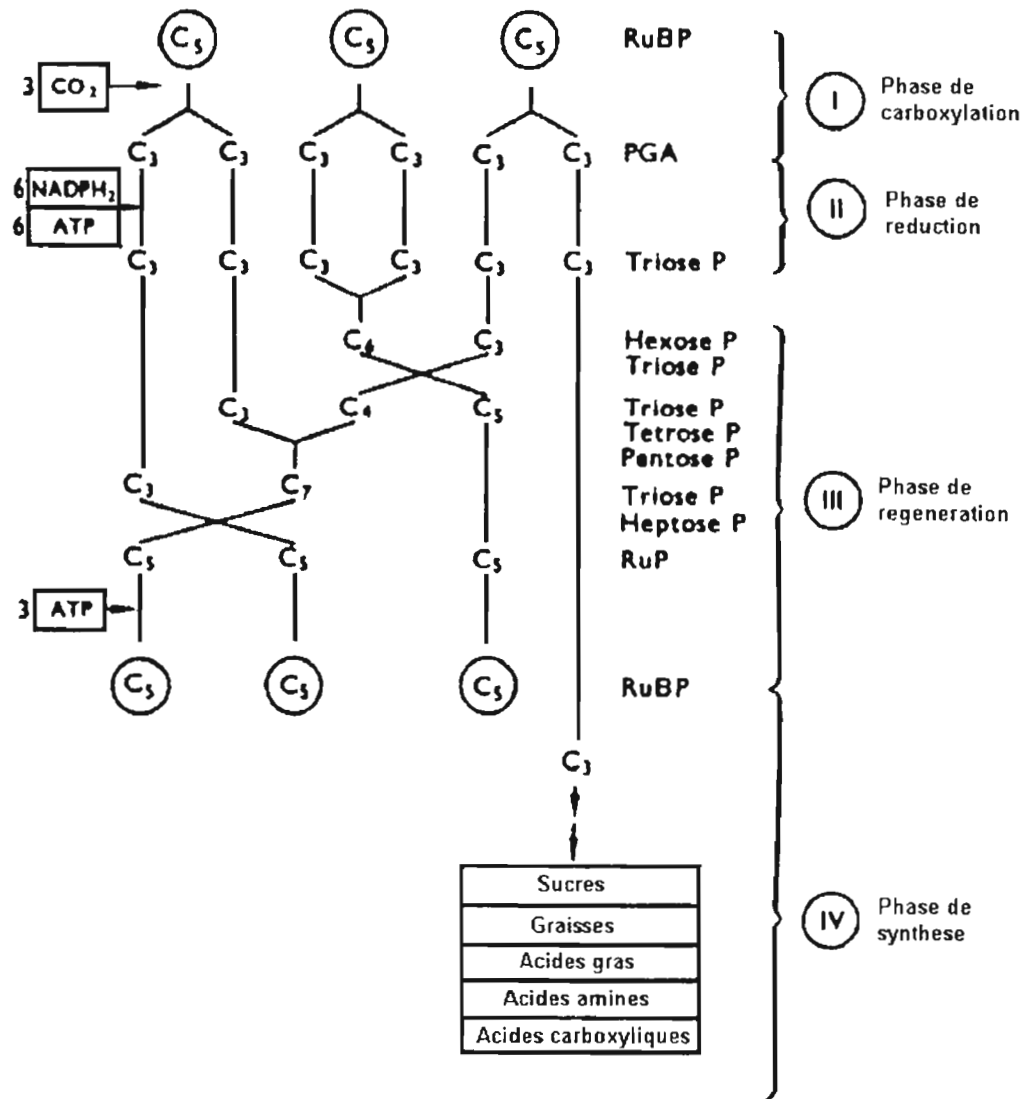


Figure 1.22 : Schéma représentant les réactions biochimiques de la fixation du CO_2 pendant les différentes étapes du cycle de Calvin (d'après Hall et Rao, 1994).

1.8 EFFETS DES MÉTAUX SUR LA PHOTOSYNTHÈSE

Les activités humaines liées aux secteurs minier et industriel contribuent à la contamination des écosystèmes par les métaux. Certains de ces éléments, comme le cuivre (Cu), le fer (Fe), le zinc (Zn), le magnésium (Mg), le manganèse (Mn) et le nickel (Ni) sont essentiels pour l'activité de plusieurs enzymes comme cofacteurs. Cependant, des métaux comme l'aluminium (Al), le chrome (Cr), le cadmium (Cd) le mercure (Hg) et le plomb (Pb) ne sont pas essentiels au métabolisme cellulaire (Raven *et al.*, 1999). Certains éléments peuvent être très toxiques pour les organismes vivants selon une relation dose-réponse (Walker *et al.*, 1996). Il a été rapporté que la toxicité des métaux affecte plusieurs processus liés à la photosynthèse (Bertrand et Poirier, 2005). Comme la photosynthèse représente le principal producteur de matière organique sur notre planète, la toxicité induite par les métaux peut avoir un impact très important dans la biosphère.

Les métaux entrent dans la cellule végétale passivement, par diffusion, ou activement par les canaux de transport utilisés pour d'autres éléments comme le Ca, le Fe ou le Mg (Williams *et al.*, 2000 ; Mendoza-Cozatl et Moreno-Sanchez, 2005). Dans le passé, on a rapporté que 60% de certains métaux accumulés dans la cellule végétale peut être localisés spécifiquement dans les chloroplastes et conséquemment peut affecter directement les processus photosynthétiques (Nagel *et al.*, 1996 ; Mendoza-Cozatl et Moreno-Sanchez, 2005). Dans le chloroplaste, les métaux peuvent agir sur les processus liés à la photosynthèse de plusieurs façons : 1. Par la liaison aux groupement S-H des protéines causant leur altération; 2. En substituant des cofacteurs essentiels à certaines molécules ou enzymes; 3. Par la production d'ERO dans le transport d'électrons. Ces effets peuvent mener à une altération des propriétés structurelles et fonctionnelles des photosystèmes.

1.8.1 Effets des métaux sur les pigments photosynthétiques

L'absorption de l'énergie lumineuse par les Chl peut être altérée par l'effet des métaux. La biosynthèse des pigments chlorophylliens implique l'enzyme NADPH-

Protochlorophyllide Oxydoréductase (POR) dans la formation de Chl à partir de protochlorophyllide. Ce processus essentiel pour la formation de chlorophylle a été démontré comme très sensible aux effets des métaux. Par exemple, des métaux comme le Cr et le Cd peuvent inhiber l'activité de la POR et ainsi diminuer l'accumulation de Chl dans la cellule (Mysliwa-Kurdziel et Strzalka, 2005). Le Cu inhibe la synthèse de la Chl et retarde également son intégration dans les photosystèmes (Caspi *et al.*, 1999). De plus, l'inhibition de la biosynthèse de la Chl diminue la taille des LHCII et LHCI et conséquemment peut réduire leur capacité d'absorption de la lumière.

En présence de Cr, la production d'ERO dans les chloroplastes induit, chez *Chlamydomonas reinhardtii*, une décomposition de la Chl en phéophytine (Rodriguez *et al.*, 2007). Pour plusieurs autres métaux (Cd, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn), on a observé qu'ils peuvent substituer l'atome de Mg de la molécule de Chl (Küpper *et al.*, 1998). Ce changement dans la molécule de Chl diminue l'efficacité du transfert de l'énergie lumineuse des antennes collectrices vers les centres réactionnels. Ces effets peuvent modifier le spectre d'absorption de la lumière par l'appareil photosynthétique.

La toxicité des métaux peut affecter la composition en pigments. Le ratio du contenu entre la Chl *a* et la Chl *b* est changé par l'effet des métaux (Clijsters et Van Assche, 1985 ; Appenroth *et al.*, 2003 ; Aravind et Prasad, 2004). Le changement de ce ratio peut être attribué à un changement de la taille des antennes périphériques du PSII (contenant en majorité de la Chl *b*) par rapport aux centres réactionnels (contenant uniquement de la Chl *a*). Les effets des métaux sur les pigments autres que les Chl sont également observés. Une augmentation du contenu en caroténoïdes, comme pigments photoprotecteurs, est induite en cas de stress causé par la présence de fortes concentrations de métaux (Kobayashi *et al.*, 1997 ; Rodriguez *et al.*, 2007). Les xanthophylles, les pigments du groupe des caroténoïdes liés à la régulation de la dissipation d'énergie sous forme de chaleur, sont aussi sensibles aux effets des métaux. Par exemple, quand *Jungermannia exsertifolia* subsp. *Cordifolia* a été exposé au Cd, on a noté que le ratio de zéaxanthine par rapport à la violaxanthine et l'anthéroxanthine a été augmenté (Otero *et al.*, 2006).

1.8.2 Effets des métaux sur la photochimie des photosystèmes II et I

Les métaux peuvent induire une altération de la photochimie des photosystèmes II et I causant une diminution du taux de transport d'électrons photosynthétiques et de la production d'ATP et de NADPH. Le PSII est généralement considéré comme la cible la plus sensible à l'action toxique des métaux (Samson et Popovic, 1988 ; Juneau *et al.*, 2001 ; Dewez *et al.*, 2005). On a rapporté que les métaux (Hg, Zn, Co et Cd) affectent le PSII au niveau du CDO en inhibant l'activité catalytique du système enzymatique de photolyse de l'eau (Samson et Popovic, 1990 ; Plekhanov et Chemeris, 2003). Les mécanismes de cet effet sont basés sur la substitution de cofacteurs essentiels pour l'enzyme participant à la photolyse de l'eau, comme on a observé pour le Cd substituant le Ca^{2+} (Faller *et al.*, 2005). Les effets des métaux (Cr, Ni) sur le CDO peuvent également s'effectuer via l'altération des sous-unités protéiques composant le CDO (Ait Ali *et al.*, 2006 ; Boisvert *et al.*, 2007). Le côté accepteur du PSII peut aussi être une cible sensible pour l'inhibition par les métaux. Par exemple, le Cd peut se lier au site Q_B , le second accepteur d'électrons du PSII, et induire une inhibition du transfert d'électrons vers le PSI (Sigfridsson *et al.*, 2004). Des effets similaires ont été rapportés pour le Cu, Hg et Pb (Boucher et Carpentier, 1999).

L'inhibition des cotés donneurs et accepteurs du PSII limitent sa capacité photochimique et ainsi augmentent sa sensibilité à la photoinhibition (Pätsikkä *et al.*, 1998 ; Takahashi et Murata, 2008). La photoinhibition induite par les métaux au niveau du PSII est causée par l'inhibition de la photochimie primaire du PSII (Pagliano *et al.*, 2006). Au niveau structurel, la photoinhibition du PSII par la toxicité des métaux résulte en une dégradation de la protéine D1 du PSII qui peut causer une augmentation du nombre de centres réactionnels inactifs (Atal *et al.*, 1991 ; Ait Ali *et al.*, 2006). Lorsque l'illumination est prolongée, la photoinhibition causée par les métaux va entraîner une détérioration de la structure des thylacoïdes par la dégradation des protéines et des lipides (Pätsikkä *et al.*, 2001).

En général, on considère le PSI moins sensible à l'effet des métaux (Tripathy *et al.*, 1983 ; Zhou *et al.*, 2006). L'inhibition de l'activité du PSI se fait seulement à des concentrations supérieures à celles affectant le PSII (Tripathy *et al.*, 1981 ; Boucher et

Carpentier, 1999). Cependant, sous certaines conditions, une diminution de l'activité photochimique a été observée (Atal *et al.*, 1991). Par exemple, il a été rapporté que l'aluminium peut induire une inactivation des PSII et PSI chez les cyanobactéries et les algues vertes (Rai *et al.*, 1996 ; Rai *et al.*, 1998). Malgré que les sites d'inhibition des métaux sur le PSI ne sont pas complètement déterminés, il a été suggéré que cette inhibition est suivie par un blocage des électrons du côté accepteurs du PSI (Hörcsik *et al.*, 2007).

1.8.3 Effets des métaux sur les réactions biochimiques de la photosynthèse

L'effet des métaux peut aussi induire une toxicité sur des réactions en dehors de la phase lumineuse de la photosynthèse. Les réactions sombres, soit la fixation du CO₂ pour la synthèse de glucides, sont aussi sensibles à l'inhibition des métaux (Krupa *et al.*, 1993). Les métaux agissent sur le cycle de Calvin en inhibant l'activité de la Rubisco (Monnet *et al.*, 2001). La liaison du Cd aux enzymes qui participent dans les processus de concentrations de carbone dans le *stroma* peut aussi inhiber la fixation du CO₂ (Sas *et al.*, 2006). Il a été rapporté que la formation de sucre peut être sévèrement inhibée quand *Spirodela polyrhiza* est exposé aux effets du Cr (Appenroth *et al.*, 2003). Une inhibition de l'activité du cycle de Calvin, en réduisant la demande en ATP et en NADPH, va entraîner une diminution de l'activité photochimique du PSII et, en conséquence, causer une photoinhibition (Subrahmanyam et Rathore, 2000).

1.8.4 Effets des métaux sur la dissipation d'énergie associée aux photosystèmes II et I

L'inhibition de l'activité photochimique des PSII et PSI va entraîner un changement au niveau des mécanismes de dissipation d'énergie des photosystèmes. Ainsi, l'augmentation de la dissipation d'énergie par la chaleur a été observée chez des membranes du thylacoïde exposées au Cu, Hg et Pb (Boucher et Carpentier, 1999). Cette augmentation de la production de chaleur est aussi reflétée par les mécanismes de « quenching » de fluorescence. Par exemple, une exposition au Cu des algues *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornatum* et *Chlamydomonas reinhardtii* a induit une diminution de la dissipation d'énergie sous forme photochimique (Q_P) et une augmentation de la dissipation d'énergie sous forme non-

photochimique (Q_N) (Juneau *et al.*, 2002). Cependant, le Hg entraîna chez l'algue *S. capricornatum* une augmentation de Q_N sans affecter Q_P (Juneau et Popovic, 1999). Un effet similaire a été observé pour le cadmium, où des concentrations plus faibles que 1 mM n'entraînent pas de diminution de la capacité de transport d'électrons mais augmente la dissipation d'énergie sous forme non-photochimique (Critchley, 1998). Ainsi, la relation entre l'effet toxique des métaux sur la photochimie des algues et les changements dans les voies de dissipation d'énergies n'est pas encore bien comprise.

1.8.5 Production de ERO dans les chloroplastes par les métaux

Par l'inhibition de la photochimie et du transport d'électrons, et par l'altération des voies de dissipation d'énergie des PSII et PSI, les métaux peuvent induire la production de ERO au niveau des photosystèmes. La production de ERO par le Cr, Cu et Cd a été rapportée chez différentes espèces d'algues et de plantes (Rai *et al.*, 2004 ; Ait Ali *et al.*, 2006 ; Knauert et Knauer, 2008 ; Kumar *et al.*, 2008). Les ERO ont un rôle important dans la toxicité induite par les métaux. Par exemple, chez les algues vertes *Pseudokirchneriella subcapitata* et *C. vulgaris*, l'inhibition de la photosynthèse par le Cu était liée à la production d'ERO puisque l'ajout de *N-tert-butyl- α -phenylnitron*, un antioxydant, rétablit complètement l'activité photosynthétique chez les algues exposées au Cu (Knauert et Knauer, 2008). La résistance aux métaux peut être influencée par la capacité de produire des antioxydants en réponse aux effets toxiques des métaux. Par exemple, une souche de *Scenedesmus acutus* résistante au Ni possède une activité plus élevée des enzymes antioxydantes superoxide dismutase, glucose-6-phosphate déshydrogenase et glutathione peroxydase par rapport à une souche sensible (Randhawa *et al.*, 2001). Lors de l'exposition d'*Ocimum tenuiflorum* L. au Cr, la production d'enzymes antioxydantes peut participer à la protection de la plante aux effets toxiques du Cr (Rai *et al.*, 2004). Dans la photosynthèse, certains pigments comme les caroténoïdes, la lutéine et la zéaxanthine ont un rôle antioxydant et protègent l'appareil photosynthétique du stress causé par la production d'ERO (Palozza et Krinsky, 1992 ; Niyogi *et al.*, 1997a ; Baroli *et al.*, 2003). La synthèse de ces antioxydants est stimulée quand la plante est exposée aux métaux (Otero *et al.*, 2006).

CHAPITRE II

PROJET DE RECHERCHE : INHIBITION DE LA PHOTOCHEMIE DES PHOTOSYSTÈME II ET I ET MODIFICATION DE LA DISSIPATION D'ÉNERGIE INDUITES PAR LE DICHROMATE ET L'ALUMINIUM CHEZ DES ALGUES VERTES

2.1 PROBLÉMATIQUES ABORDÉES DANS NOTRE PROJET DE RECHERCHE

Notre projet de recherche consiste à étudier les mécanismes d'inhibition des réactions photochimiques des PSII et PSI par l'effet du dichromate et de l'aluminium. Le dichromate est une forme hexavalente du chrome et est reconnu comme un composé hautement toxique (Pawlisz *et al.*, 1997). Il est utilisé dans plusieurs activités industrielles comme la fabrication des pigments, le traitement des surfaces métalliques, le tannage du cuir et la préservation du bois (Heung *et al.*, 2007 ; Johnson *et al.*, 2006). En conséquence, le dichromate peut s'accumuler dans les écosystèmes aquatiques et induire une toxicité chez de nombreux organismes aquatiques (Pawlisz *et al.*, 1997). Au niveau de la photosynthèse des algues, la phytotoxicité du dichromate peut induire une inhibition de l'activité du PSII (Appenroth *et al.*, 2001). L'inhibition du transport d'électrons photosynthétiques par le dichromate peut être causée par des effets des cotés donneur et accepteur du PSII (Ait Ali *et al.*, 2006). Cependant, les effets de cette inhibition de la photochimie du PSII sur la dissipation d'énergie au niveau des PSII et PSI n'est pas bien connue. L'aluminium est connu pour affecter la croissance des algues lorsqu'il se retrouve en grande concentration sous forme d'ion libre (Kinross *et al.*, 2000). La solubilité de l'aluminium dans les milieux aquatiques dépend du pH et la forme ionique libre Al^{3+} se retrouve en majorité dans les milieux ayant un pH inférieur à 5.0. Pour ces raisons, l'acidification des écosystèmes aquatiques peut causer une toxicité aux communautés des algues à cause d'une solubilisation de l'aluminium dans le milieu. Les effets toxiques de l'aluminium sur la photosynthèse sont peu connus, cependant une inhibition du transport d'électrons via les PSII et PSI a été observée chez différentes algues

(Rai *et al.*, 1996 ; Rai *et al.*, 1998). Chez certaines espèces d'algues, l'aluminium n'induit pas une grande toxicité (Claesson et Tornqvist, 1988), montrant que des mécanismes de protection peuvent réduire la toxicité de l'aluminium. Ces mécanismes de protection peuvent impliquer plusieurs processus : 1. la production de phytochélatine pour séquestrer les métaux dans la cellule 2. l'activation d'enzymes antioxydantes pour diminuer la production de ROS 3. l'activation des mécanismes de régulation de la dissipation d'énergie lumineuse.

Les mécanismes de régulation de la dissipation d'énergie impliquent l'augmentation de la dissipation de l'excès d'énergie absorbée sous forme de chaleur. Ces mécanismes permettent de réduire la formation d'ERO au niveau des LHCII, protégeant donc l'appareil photosynthétique lorsque la photochimie est limitée (Niyogi, 2000). Lors de différents stress environnementaux, comme une carence en azote, une salinité extrême, de basses températures ou la sécheresse, le transport d'électrons via les PSII et PSI et les processus de fixation du CO₂ en sucres sont réduits. Sous ces conditions, pour protéger l'appareil photosynthétique, une augmentation de la dissipation d'énergie sous forme de chaleur par l'activation du cycle des xanthophylles a été observée (Masojidek *et al.*, 2000 ; Hendrickson *et al.*, 2003 ; Heber *et al.*, 2006). Chez les algues exposées aux métaux, l'augmentation de la dissipation d'énergie par voie non-photochimique a été montrée lorsque des algues étaient exposées aux effets toxiques du Hg, du Cu et du Cd (Critchley, 1998; Juneau et Popovic, 1999; Juneau *et al.*, 2002). L'exposition au Cd de *Jungermannia exsertifolia* subsp. *Cordifolia* a induit une augmentation du contenu en zéaxanthine, un pigment participant dans la dissipation d'énergie sous forme de chaleur (Otero *et al.*, 2006). Cependant, on ne sait pas comment l'activation de ces mécanismes de régulation influence la toxicité des métaux lourds chez les algues. L'objectif de notre recherche est d'étudier l'altération des mécanismes de régulation de la dissipation d'énergie quand les algues sont exposées au dichromate et à l'aluminium. Dans ce contexte, nous avons considéré trois problématiques :

I. Investigation des effets du dichromate, inhibiteur de l'activité photosynthétique du PSII, sur les mécanismes de dissipation d'énergie du PSII et du PSI. Dans cette partie, l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* a été exposée au dichromate pour évaluer les effets de l'inhibition du dichromate sur le transport d'électrons du PSII et du PSI. L'inhibition de la

photochimie primaire du PSII a été évaluée par l'analyse de la cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne. Les différentes voies de dissipation d'énergie des PSII et PSI ont été évaluées par la mesure de la cinétique de fluorescence modulée et par les changements d'absorption à 830 nm. Les propriétés structurales du PSII seront évaluées par analyse HPLC pour déterminer le changement des pigments photosynthétiques du LHC. L'immunobuvardage de type « *Western Blot* » est utilisé pour déterminer les effets du dichromate sur le contenu en protéine D1 du PSII. Les effets de l'inhibition du transport d'électrons sur la distribution de la dissipation d'énergie des PSII et PSI seront évalués. Ces résultats nous permettront de mieux comprendre la dépendance entre les effets du dichromate et les changements apportés sur les mécanismes de dissipation d'énergie de l'appareil photosynthétique des algues. Les résultats de cette étude seront présentés au chapitre III.

2. Évaluation des effets du dichromate sur les mécanismes de régulation de la dissipation d'énergie sous forme de chaleur quand des algues mutantes de *C. reinhardtii* ont été exposées au dichromate. Dans ce projet, nous avons utilisé deux types de mutant. Le mutant *npq1*, déficient en l'enzyme violaxanthine dé-époxydase (EC 1.10.99.3), ne peut pas transformer la violaxanthine en zéaxanthine. Le mutant *npq2* est déficient en l'enzyme zéaxanthine époxydase (EC 1.14.13.90), ce qui inhibe la conversion de la zéaxanthine en violaxanthine (Niyogi *et al.*, 1997b). Ces deux souches mutantes possèdent une capacité diminuée de dissiper l'énergie en excès sous forme de chaleur et sont plus sensibles à la photoinhibition. L'absence d'une des voies de régulation de la dissipation d'énergie chez ces algues mutantes nous permettra d'évaluer l'importance de cette voie dans l'effet du dichromate sur l'activité des photosystèmes II et I. Dans le chapitre IV, les résultats présentés rapportent les changements dans la dissipation d'énergie du PSII quand les mutants *npq1* et *npq2* ont été exposés aux effets du dichromate. La dissipation d'énergie lumineuse du PSII a été étudiée par la fluorescence modulée pour déterminer comment le PSII dissipe l'énergie en excès lorsque la voie photochimique est limitée par l'effet du dichromate. Les résultats présentés dans ce chapitre ont permis de déterminer l'importance du cycle des xanthophylles dans la protection de l'appareil photosynthétique lorsque la photochimie est inhibée par le dichromate. Dans le chapitre V, l'effet de l'intensité lumineuse sur l'effet du dichromate au niveau des PSII et PSI a été étudié chez la souche sauvage de *C. reinhardtii* et la souche

mutante *npq1*. Le changement dans la dissipation d'énergie par les PSII et PSI en présence de dichromate a été investigué par l'analyse de la fluorescence modulée et les changements d'absorption à 830 nm. Le changement du contenu en protéine D1 a été déterminé par immunobuvardage de type « *Western Blot* ». Les résultats présentés dans ce chapitre ont permis de déterminer la dépendance entre les effets du dichromate au niveau du PSII et l'intensité lumineuse.

3. Investigation des changements de la photochimie et des mécanismes de dissipation d'énergie du PSII induits par les effets de l'aluminium sous forme d'ion libre. Dans le chapitre VI, les effets de l'aluminium sur le PSII ont été investigués chez deux algues acidophiles caractérisées par une différente sensibilité aux métaux : *Chlamydomonas acidophila*, résistante aux effets des métaux, et *Euglena gracilis*, sensible aux effets métaux (Danilov et Ekelund, 2001 ; Nishikawa et Tominaga, 2001). Dans ce projet, nous avons déterminé la spéciation de l'aluminium sous forme d'ion libre. Les effets de l'aluminium sur la division cellulaire et la production de biomasse ont été investigués après 24h d'exposition. L'effet de l'aluminium sur l'activité photochimique du PSII à été investigué par les cinétiques, rapide et modulée, de fluorescence. La dissipation d'énergie par les voies photochimiques et non-photochimiques a été étudiée par fluorescence modulée chez les deux espèces d'algues lorsque celles-ci ont été exposées aux effets de l'aluminium. Les résultats obtenus nous ont permis d'évaluer la dépendance entre les mécanismes de dissipation d'énergie du PSII et les effets des métaux sur la croissance et la production de biomasse par les algues.

CHAPITRE III

INHIBITION OF PHOTOSYNTHETIC ELECTRON TRANSPORT IN CHLAMYDOMONAS REINHARDTII BY DICHROMATE EFFECT ALTERS ENERGY DISSIPATION PROCESSES DEPENDANT TO PSII AND PSI ACTIVITIES

Perreault François¹, Ait Ali Nadia¹, Saison Cyril¹, Popovic Radovan¹ and Juneau Philippe^{2*}

¹ Department of Chemistry, University of Quebec in Montreal, C.P. 8888, Succ. Centre-Ville, Montreal, Quebec, H3C 3P8 Canada.

² Department of Biological Sciences-TOXEN, Canadian Research Chair on Ecotoxicology of Aquatic Microorganisms, University of Quebec in Montreal, C.P. 8888, Succ. Centre-Ville, Montreal, Quebec, H3C 3P8 Canada.

* Corresponding author

Soumis à *Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology*

Contribution dans ce chapitre : Ma contribution dans ce chapitre est majeure. J'ai été le principal contributeur aux idées de cet objectif de recherche, à l'établissement du plan d'expérience, à la prise des résultats et j'ai écrit la première version du manuscrit. N. Ait Ali a participé à l'élaboration des idées de recherche et C. Saison a participé aux mesures expérimentales. R. Popovic et P. Juneau ont contribué à la rédaction de la version finale du manuscrit.

3.1 RÉSUMÉ

Dans cette étude, nous avons investigué les processus de dissipation d'énergie du PSII et du PSI chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* lorsque le transport d'électron photosynthétique est inhibé par le dichromate. Le changement du contenu en protéine D1, de la composition des pigments ainsi que le transport des électrons et les processus de dissipation d'énergie des photosystèmes II et I ont été étudiés lorsque les algues ont été exposées à différentes concentrations de dichromate en présence de lumière. Après 24h d'exposition, une diminution du contenu en protéine D1 et une augmentation du ratio zeaxanthine / chlorophylle $a + b$ indiquent des changements structuraux du photosystème II. Les rendements photochimiques des photosystème II et I ont fortement diminué. Cette inhibition par le dichromate a induit une fort quenching de la fluorescence aux transitions O-J-I-P, ce qui indique une détérioration du transport d'électron du PSII vers les plastoquinones et le PSI. Cette étude montre que le dichromate augmente la dissipation par voie non-photochimique non-régulée du PSII. Cependant, nous avons aussi trouvé que la dissipation d'énergie par la voie photochimique pour le PSI était limité par son coté accepteur d'électron en présence de dichromate. Ces résultats indiquent que le dichromate, en plus d'agir comme inhibiteur du PSII, possède un autre site d'action situé soit au niveau des accepteurs d'électrons du PSI ou des réactions biochimiques permettant l'oxidation du NADPH.

3.2 ABSTRACT

In this study, we investigated the energy dissipation processes via PSII and PSI activity in green alga *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to dichromate inhibitory effect on electron transport. The changes of D1 protein content, pigment composition, photosystem II–I electron transport and energy dissipation processes were studied when algae were exposed to different dichromate concentrations in the presence of light. After 24h of exposure, the decrease of D1 protein content and the increase of the zeaxanthin / chlorophyll *a* + *b* ratio indicated structural changes of photosystem II. Quantum yield of Photosystem II and Photosystem I were highly decreased. Such inhibition by dichromate induced strong quenching effect at rapid O-J-I-P fluorescence transients, indicating deterioration of PSII electron transport toward to PQ pool and PSI. This investigation shows that dichromate increase energy dissipation via non-regulated non-photochemical energy dissipation in PSII. However, we found that energy dissipation via PSI photochemical activity was limited by its electron acceptor side. This indicates that dichromate, in addition to its inhibition effect on PSII, have a sensitive inhibitory site located either on PSI electron acceptors or on the dark reactions of photosynthesis responsible of NADPH oxydation.

Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii*, photosynthesis, dichromate toxicity, heavy metals stress, Photosystem II, Photosystem I, energy dissipation processes, photosynthetic electron transport.

3.3 INTRODUCTION

Chromium accumulation in aquatic ecosystems and industrial effluents may reach from 10 μM to 96 mM (De Filipis and Pallaghy, 1994; Chandra *et al.*, 1997). Chromate and dichromate, as hexavalent forms of chromium, are known to induce strong toxic effects on phytoplankton organisms (Pawlisz *et al.*, 1997). Strong inhibition of photosystem II (PSII) electron transport may indicate high sensitivity of photosynthetic electron transport to dichromate effect (Hörtsik *et al.*, 2007). Alteration of D1 protein and 33 kDa protein of oxygen evolving complex by dichromate effect gave evidences that the inhibition sites may be located on oxidizing and reducing sides of PSII (Ait Ali *et al.*, 2006). However, presently there is no indications how dichromate inhibitory effect may alter PSII and I energy dissipation processes occurring by non-photochemical pathways or reactive oxygen species (ROS) formation. It was noticed that dichromate deteriorating effect on PSII was similar to photoinhibition processes induced in plants treated with cadmium or copper (Pätsikkä *et al.*, 2002; Pagliano *et al.*, 2006). Usually, photoinhibition of PSII occurs under excessive light conditions when the amount of absorbed light energy exceeds the capacity of energy dissipation pathways in the photosynthetic apparatus (Kato *et al.*, 2003). It is known that under those conditions, the excess energy will dissipate from singlet and triplet states of antenna chlorophylls inducing ROS, which may cause protein alteration of PSII complex (Dat *et al.*, 2000). Formation of ROS by excess light energy can be prevented via heat energy dissipation as non-photochemical quenching (NPQ) processes (Müller *et al.*, 2001). A major component of heat dissipation is regulated via the xanthophyll cycle, where violaxanthin is reversibly transformed into zeaxanthin (Demmig-Adams, 1990). Zeaxanthin can accept excitation energy directly from light harvesting antenna chlorophylls or react with PSII light-harvesting complexes (LHCII) inducing conformational changes of protein-pigment complexes favorable for heat dissipation (Niyogi, 2000). It also appeared that zeaxanthin, beside NPQ-dependant photoprotective role, has an antioxidant function preventing deteriorating effects of ROS formation (Havaux and Niyogi, 1999; Baroli *et al.*, 2003). However, it has been earlier reported that photoinhibition processes can also occur under

moderate light intensity when the photosynthetic activity is altered by heavy metals or pesticides (Rutherford and Kriger-Lisazkay, 2001; Bertrand and Poirier, 2005).

Photosynthesis of higher plants and algae can adapt remarkably to various environmental conditions by using different energy dissipation mechanisms (Demmig-Adams and Adams, 2006). It has been found that short exposure of *Fucus serratus* to copper increased PSII non-photochemical energy dissipation (Nielsen *et al.*, 2003). In cadmium treated plants showing inhibition of photosynthetic electron transport and increase of energy dissipation via heat, higher ratio between xanthophyll pigments (antheraxanthin and zeaxanthin) and chlorophyll *a* was found (Otero *et al.*, 2006). This may indicate for accessory pigments of LHC, as a regulatory system, to participate in dissipation of excess light energy when photosynthetic electron transport was inhibited by metals. Beside inhibition of PSII electron transport, it has been recently suggested that oxidative stress induced by dichromate could be additionally caused by an alteration of photosystem I (PSI) acceptor side (Hörscsik *et al.*, 2007). However, we are far away from understanding how those dichromate inhibitory effects have impact on energy dissipation associated with PSII and PSI electron transport processes.

In this study, we investigated the processes of energy dissipation via PSII and PSI activity in green alga *Chlamydomonas reinhardtii* when the change of functional and structural properties of the photosynthetic apparatus was induced by dichromate inhibitory effect.

3.4 MATERIALS AND METHODS

3.4.1 Algae culture

C. reinhardtii culture was obtained from the *Chlamydomonas* Genetic Center (Duke University, Durham, NC). Cells were cultivated in batch culture of 500 mL high salt growth medium (Harris, 1989), under continuous illumination ($100 \pm 5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) provided by white

fluorescent lamps (Sylvania® GroLux F 36 W) at 26 °C±1. The algal culture was permanently aerated to obtain constant CO₂ concentration in the growing medium. When the algal culture was in the exponential growth phase, a sample having a cell density of 5 x 10⁷ cells ml⁻¹ was used in this study.

3.4.2 Dichromate treatment

Stock solution (20 mM) was made with K₂Cr₂O₇ salt dissolved in culture media. Dichromate treated algal samples were prepared with growth medium in final volume of 100 ml where initial cell density was 5 x 10⁵ cells ml⁻¹. The algal samples were exposed during 24h to 0, 6 and 12.5 μM dichromate under the same conditions as used during growth period.

3.4.3 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting

Proteins of thylakoid membranes were separated by SDS-PAGE according to Laemmli (1970). D1 protein content was evaluated by using 7 μg total thylakoid protein determined by BCA assay (Pierce). The primary antibody used for Western blot analysis was against D1 protein (Agrisera). As secondary antibody, horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit (Amersham Biosciences) was used to detect the immuno-reaction as described earlier (Ait Ali *et al.*, 2006).

3.4.4 Chlorophyll *a* fluorescence and PSI transmittance measurement

Prior to fluorescence measurements, treated algal samples were dark-adapted for 15 min. Samples of algal cells (16 μg of Chl *a*) were uniformly placed on glass fiber filter (Millipore #AP20 013 00) by using low pressure filtration to avoid physiological stress effect and to obtain reproducible results. The Plant Efficiency Analyzer fluorometer (PEA, Hansatech Ltd., UK) was used to measure the rapid polyphasic chlorophyll *a* fluorescence rise during 6 sec by using light intensity of 2500 μE m⁻² s⁻¹. Fluorescence yield (F) at investigated fluorescence transients we determined according to Strasser and Strasser (1995).

The fluorescence yield at 50 μ s was considered as O transient ($F_{50\mu s}$) when all reaction centers of PSII are open. The maximal fluorescence yield, F_M was determined at P transient and the variable fluorescence yields related to J and I transients were determined at 2 ms and 30 ms respectively. Photosynthetic parameters indicating PSII activity were evaluated (Strasser and Strasser, 1995; Strasser *et al.*, 1999) : (1) the absorption of photons (ABS) per active reaction center (RC) showing the antenna size was estimated by the ratio $ABS/RC = (M_O/V_J)/((F_M - F_{50\mu s})/F_M)$; (2) the non-photochemical energy dissipation per active reaction center as $DI_O/RC = ABS/RC - (M_O/V_J)$; (3) the PSII capacity for photosynthetic electron transport as $S_M =$ complementary area above the fluorescence induction curve normalized by F_V ; (4) the quenching of PSII fluorescence related to oxydized quinones of the PQ pool $qPQ = (F_M - F_{30ms}) / (F_M - F_{50\mu s})$. For those parameters, M_O value, as an indication of the water splitting system function, was estimated as $M_O = [4 \times (F_{300\mu s} - F_{50\mu s}) / (F_M - F_{50\mu s})]$ and V_J , the relative fluorescence quantum yield at J transient as $V_J = (F_{2ms} - F_{50\mu s}) / (F_M - F_{50\mu s})$ was used as indication for PSII efficiency in primary photochemistry (for a review see Strasser *et al.* (2004)). Deconvolution of rapid rise transitions states O-J, J-I and I-P were done by using a sum of three exponential functions : $F(t) = F_{50\mu s} + A_{O-J}(1 - e^{-(k_{O-J}t)}) + A_{J-I}(1 - e^{-(k_{J-I}t)}) + A_{I-P}(1 - e^{-(k_{I-P}t)})$ where F_0 is the minimal fluorescence; A_{O-J} , A_{J-I} and A_{I-P} were amplitudes of each transition step; k_{O-J} , k_{J-I} and k_{I-P} were rate constants of the O-J, J-I and I-P phase, respectively, according to Pospíšil and Dau (2002).

Chlorophyll fluorescence yields at steady-state were measured at room temperature by using dual-wavelength pulse-amplitude-modulated fluorescence monitoring system (Dual-PAM, Heinz Walz, Effeltrich, Germany) according to Schreiber *et al.* (1986). Used modulated, actinic and saturating pulses (0.8 s) light intensities were 1 $\mu E m^{-2} s^{-1}$, 100 $\mu E m^{-2} s^{-1}$ and 3000 $\mu E m^{-2} s^{-1}$, respectively. PSII maximal quantum yield was evaluated as $\Phi_{MII} = (F_M - F_0) / F_M$ (Kitajima and Butler, 1975). The effective quantum yield of PSII was evaluated as $Y(II) = (F_M' - F) / F_M'$ according to Genty *et al.* (1989). Other PSII energy dissipation parameters were estimated according to Kramer *et al.* (2004) as : The yield of PSII non-photochemical energy dissipation via regulated pathways as $Y(NPQ) = 1 - Y(II) - Y(NO)$; the yield of non-photochemical losses via non-regulated pathways of PSII as $Y(NO) = 1 / (NPQ + 1 + qL (F_M/F_0 - 1))$, where $NPQ = (F_M - F_M') / F_M'$. The parameter $qL = qP \times F_0' / F$,

where $qP = (F_M' - F) / (F_M' - F_0')$, was used as indicator to evaluate fraction of open PSII reaction centers participating in electron transport. F_0 fluorescence yield was considered when PSII was at maximum oxidized state (dark adapted state) and the F_0' fluorescence yield was considered when PSII was under light adapted state as $F_0' = F_0 / (F_v / F_M + F_0 / F_M')$ according to Oxborough and Baker (1997). PSI maximal quantum yield was determined in dark adapted samples as $\Phi_{MI} = (P_m - P) / (P_m - P_0)$. The PSI energy dissipation was calculated according to Klughammer and Schreiber (1994) as: PSI quantum yield $Y(I) = (P_m' - P) / (P_m - P_0)$; the non photochemical energy dissipation of PSI caused by oxidized P700 as $Y(ND) = (P - P_0) / (P_m - P_0)$. Non photochemical energy dissipation of PSI caused by P700 that cannot be oxidized by a saturation pulse was estimated as $Y(NA) = (P_m - P_m') / (P_m - P_0)$. In these parameters, P_m and P_m' are the maximum change of P700 signal in dark and light adapted state respectively, P the P700 transmittance signal caused by actinic light before the saturating flash and P_0 the minimal level of P700 transmittance change measured after the saturating pulse, when P700 is reduced by electrons from PSII.

3.4.5 HPLC analysis

Samples of 10 mL of algal culture was used for pigment extraction in 100% methanol at 65°C according to Lichtenthaler (1987). The HPLC analysis for Chl *a*, Chl *b*, violaxanthin and zeaxanthin was done according to Schagerl *et al.* (2003) where acetone was replaced by ethyl acetate. Separations were performed by using a Phenomenex Nucleosil C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm particle size, 100 Å pore size) and a Water Nova Pak C18 precolumn (4 µm particle size).

3.4.6 Data analysis and statistic

The experiments were done in four independent measurements for all treatments. Means and standard deviation were estimated for each treatment. Significant differences between controls and dichromate treated samples were determined by using Student's *t* test where *p* value less than 0.05 was considered to be significant.

3.5 RESULTS AND DISCUSSION

Photosynthetic activity and growth of *C. reinhardtii* were evaluated after 24 hours exposure to different dichromate concentrations. At 12.5 μM dichromate, growth rate was decreased by 65% while the ratio zeaxanthin / Chl ($a + b$) was increased by three times (Table 1). The change of zeaxanthin / Chl ($a + b$) ratio resulted from the concomitant decrease (-50%) of the Chl a and b content with the increase of the zeaxanthin content per cell (Table 1). Such change of pigment composition induced by dichromate effect may alter energy dissipation in photosynthetic processes. Under those conditions, the photoinhibition preventing mechanisms trigger the xanthophylls cycle activity which participates in energy dissipation processes. Therefore, in algae exposed to 6 μM dichromate, zeaxanthin content was increased and violaxanthin was concomitantly decreased, while the presence of violaxanthin was not detectable at 12.5 μM dichromate treatment (Table 1). The increase of the ratio between xanthophylls pigments (antheraxanthin and zeaxanthin) and chlorophyll a was also found earlier when higher plant *Jungmannia exsertifolia* was exposed to cadmium (Otero *et al.*, 2006). Our study showed for dichromate to decrease D1 protein content, and consequently causing a decrease of maximal PSII quantum yield (Φ_{MII}) (Figure 1). We noticed that PSI maximal quantum yield (Φ_{MI}) was also decreased, therefore showing for dichromate effect to alter the entire PSII-PSI electron transport. Zeaxanthin accumulation found in spite of xanthophylls cycle activity, when PSII-PSI electron transport was decreased by dichromate effect, we may interpret to be the consequence of β -carotene direct conversion into zeaxanthin. Such interpretation is supported by earlier findings that this reaction is independent of xanthophylls cycle and degradation of D1 protein (Depka *et al.*, 1998).

Strong quenching effect induced by dichromate was found for rapid O-P fluorescence transients, indicating deterioration of PSII electron transport toward to Q_A , Q_B and PQ pool. Reduction of electron transport of PSII was well indicated by deconvolution of fluorescence yield rise related to transients O-J, J-I and I-P. The fluorescence yields concerning those transients were evidently reduced by dichromate (Figure 2 C and D). By comparing fluorescence quenching effect induced by dichromate at those transients, it appeared that the biggest effect was at I-P transient, which may indicate that PQ pool was less reduced by

electron transport from water splitting system (Schreiber and Vidaver, 1976 ; Joly and Carpentier, 2007). Fluorescence quenching beyond P transient (~ 250 msec) was strongly diminished by dichromate effect indicating that dichromate inhibition alters also PSI electron transport since fluorescence quenching intensity following P transient is directly dependant to PSI activity (Schansker *et al.*, 2005) (Figure 2A). Therefore, we may indicate here for dichromate effect to inhibit electron transport dependant to PSII and PSI, beside PSII. Such effects may result in inactivation of some PSII reaction centers. Indeed, the increase of PSII absorption cross-section, according to Strasser *et al.* (2004) shown here by the change of ABS/RC ratio (from 3.4 to 5.5 for 12.5 μ M dichromate effect), demonstrated that some of PSII reaction centers were inactivated (Table 2). Resulting from this effect, PSII electron transport capacity was diminished by 30%, which is shown by the decrease of complementary area (SM) above fluorescence curve from O to P transient (Strasser *et al.*, 2004). Furthermore, the decrease in PSII electron transport capacity may increase untrapped excitation energy dissipation within PSII reaction center as seen by an increase of DIO/RC from 1.2 to 2.8. Some similar effects have been reported earlier for higher plant *Spirodela polyrhiza* exposed to dichromate (Appenroth *et al.*, 2001). Electron flow from PSII to PSI was therefore decreased. However, fluorescence quenching induced by PQ pool redox-state (qPQ) was reduced from 0.38 to 0.21 (Table 2). As fluorescence is quenched by oxidized PQ, we may conclude that limitation of electron flow through PSI will slow down reoxydation of the PQ pool therefore this will reduce capacity of PQ to quench PSII variable fluorescence.

Since we showed for dichromate effect to have heterogeneous inhibition sites concerning functional and structural properties of PSII and PSI, it appeared that it was important to find out how this effect is associated with PSII-PSI energy dissipation pathway. Energy dissipation dependent to PSII activity, according to Kramer *et al.* (2004), was determined as distribution of dissipation between PSII operational quantum yield, Y(II), PSII regulated non-photochemical quenching, Y(NPQ), and PSII non-regulated non-photochemical quenching, Y(NO). For PSI, according to Klughammer and Schreiber (1994), we determined energy dissipation as distribution of dissipation between PSI operational quantum yield, Y(I), PSI non-photochemical energy dissipation caused by oxidized P700, Y(ND), and PSI non photochemical energy dissipation caused by reduced P700 unable to

give electron due to an electron acceptor limitation, $Y(NA)$ (Figure 3). The participation of energy dissipation via PSII primary photochemistry ($Y(II)$) was decreased from 37 to 12% when algae were exposed 24h to 12.5 μ M dichromate, while non-regulated non-photochemical quenching effect, $Y(NO)$, was increased from 46 to 66%. At the same time, regulated non-photochemical quenching, $Y(NPQ)$, was not evidently changed. Therefore we may suppose that the unchanged $Y(NPQ)$ was result of low level of proton gradient in intrathylakoid space and by the slow rate of PQ reoxydation processes (see Figure 2A). At the same time, participation of PSI photochemical quantum yield $Y(I)$ was decreased from 70 to 28%, comparing control samples to 12.5 μ M dichromate treated algae, respectively, while absorbed light energy dissipation via non-photochemical processes of reduced P700, unable to donate electrons, $Y(NA)$, was increased from 27 to 70% (figure 3). We interpreted that such dichromate effect on energy balance was induced by limitation of PSI acceptor side therefore resulting in more reduced state of P700. Furthermore, the energy dissipation of PSI will have feedback on PSII electron transport rate and consequently on its energy dissipation processes resulting from limitation of acceptor side of PSI.

We may conclude for dichromate effect to decrease photosynthetic electron transport rate of both PSII and PSI. PQ pool reoxydation rate is reduced by decreased PSI electron transport activity. This effect was associated with the change of PSII structural properties seen by decrease of D1 protein content and pigment composition of the light harvesting complexes. Decreased electron transport activity of PSII and PSI by dichromate effect was associated with strong increase of energy dissipation via non-regulated non-photochemical energy dissipation in PSII, while the energy dissipation via PSI show for dichromate to affect electron transport on PSI acceptor side, resulting in an accumulation of reduced P700. Therefore, these findings will trigger further investigations concerning dichromate effect on interaction between photosynthetic electron transport and related energy storage via photosynthetic biochemical processes.

3.6 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Dr. Laszlo Kovacs for his critical reading and suggestions during preparation of this manuscript. This research was supported by the Natural Science and Engineering Council of Canada (NSERC) through grants 262210 awarded to P. Juneau and GP0093404 awarded to R. Popovic.

3.7 REFERENCES

- Ait Ali, N., D. Dewez, O. Didur and R. Popovic. 2006. "Inhibition of photosystem II photochemistry by Cr is caused by the alteration of D1 protein and oxygen evolving complex". *Photosynthesis Research*, vol. 89, p. 81-87.
- Appenroth, K. J., J. Stöckel, A. Srivastava and R. J. Strasser. 2001. "Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrhiza* as probed by OJIP chlorophyll *a* fluorescence measurements". *Environmental Pollution*, vol. 115, p. 49-64.
- Baroli, I., A. D. Do, T. Yamane and K. K. Niyogi. 2003. "Zeaxanthin accumulation in the absence of a functional xanthophyll cycle protects *Chlamydomonas reinhardtii* from photooxidative stress". *The Plant Cell*, vol. 15, p. 992-1008.
- Bertrand, M., and I. Poirier. 2005. "Photosynthetic organisms and excess of metals". *Photosynthetica*, vol. 43, p. 345-353.
- Chandra, P., S. Sinha and U.N. Rai. 1997. "Bioremediation of Chromium from Water and Soil by Vascular Aquatic Plants". In *Phytoremediation of Soil and Water Contaminants*, Editors, E.L. Kruger, T.A. Anderson and J.R. Coats, p. 274-82. ACS Symposium Series, vol. 664, Washington, DC: American Chemical Society.
- Dat, J., S. Vandenameele, E. Vranová, M. Van Montagu, D. Inzé and F. Van Breusegem. 2000. "Dual action of the active oxygen species during plant stress responses". *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 57, p. 779-795.
- Demmig-Adams, B. 1990. "Carotenoids and photoprotection in plants : a role for the xanthophylls zeaxanthin". *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1020, p. 1-24.
- Demmig-Adams, B., and W. W. Adams III. 2006. "Photoprotection in an ecological context : the remarkable complexity of thermal energy dissipation". *New Phytologist*, vol. 172, p. 11-21.

- Depka, B., P. Jahns and A. Trebst. 1998. "β-Carotene to zeaxanthin conversion in the rapid turnover of the D1 protein of photosystem II". *FEBS Letters*, vol. 424, p. 267-270.
- De Filippis, L. F., and C.K. Pallaghy. 1994. "Heavy metals: sources and biological effects". In *Advances in Limnology Series: Algae and Water Pollution*, Editors, L.C. Rai, J.P. Gaur and C.J. Soeder, p. 31-77. E. Scheizerbartsche Press, Stuttgart.
- Genty, B., J. M. Briantais and N. R. Baker. 1989. "The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence". *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 990, p. 87-92.
- Harris, E. H. 1989. "The *Chlamydomonas* Sourcebook: A comprehensive guide to biology and laboratory use". San Diego, CA, Academic Press, 780 p.
- Havaux, M. and K. K. Niyogi. 1999. "The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanisms". *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, vol. 96, p. 8762-8767.
- Hörsik, Z. T., L. Kovacs, R. Laposi, I. Meszaros, G. Lakatos and G. Garab. 2007. "Effect of chromium on photosystem 2 in the unicellular green alga, *Chlorella pyrenoidosa*". *Photosynthetica*, vol. 45, p. 65-69.
- Joly, D., and R. Carpentier. 2007. "The oxidation/reduction kinetics of the plastoquinone pool controls the appearance of the I-peak in the O-J-I-P chlorophyll fluorescence rise: Effects of various electron acceptors". *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, vol. 88, p. 43-50.
- Kato, M. C., K. Hikosaka, N. Hirotsu, A. Makino and T. Hirose. 2003. "The excess light energy that is neither utilized in photosynthesis nor dissipated by photoprotective mechanisms determines the rate of photoinactivation in photosystem II". *Plant Cell Physiology*, vol. 44, p. 318-325.
- Kitajima, M., and W. L. Butler. 1975. "Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothylmoquinone". *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 376, p. 105-115.
- Klughammer, C., and U. Schreiber. 1994. "An improved method, using saturating light pulses, for the determination of Photosystem I quantum yield via P700+-absorbance changes at 830 nm". *Planta*, vol. 192, p. 261-268.
- Kramer, D. M., G. Johnson, O. Kiirats and G. E. Edwards. 2004. "New fluorescence parameters for the determination of Q_A redox state and excitation energy fluxes". *Photosynthesis Research*, vol. 79, p. 209-218.

- Laemmli, U. K. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature*, vol. 227, p. 680-685.
- Lichtenthaler, H. K. 1987. "Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes". In *Methods in enzymology*, Vol 148, Editors, L. Packer and R. Douce, p 350-382. Academic Press, London.
- Müller, P., X.-P. Li and K. K. Niyogi. 2001. "Non-photochemical quenching. A response to excess light energy". *Plant Physiology*, vol. 125, p. 1558-1566.
- Nielsen, H., C. Brownlee, S. M. Coelho and M. T. Brown. 2003. "Inter-population differences in inherited copper tolerance involve photosynthetic adaptation and exclusion mechanisms in *Fucus serratus*". *New Phytologist*, vol. 160, p. 157-165.
- Niyogi, K. K. 2000. "Safety valves for photosynthesis". *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 3, p. 455-460.
- Otero, S., E. Nunez-Olivera, J. Martinez-Abaigar, R. Tomas, M. Arroniz-Crespo and N. Beaucourt. 2006. "Effects of cadmium and enhanced UV radiation on the physiology and the concentration of UV-absorbing compounds of the aquatic liverwort *Jungermannia exsertifolia* subsp. *Cordifolia*". *Photochemical and Photobiological Sciences*, vol. 5, p. 760-769.
- Oxborough, K., and N. R. Baker. 1997. "Resolving chlorophyll *a* fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components-calculation of qP and F_v'/F'_m without measuring F_0 ". *Photosynthesis Research*, vol. 54, p. 135-142.
- Pagliano, C., M. Raviolo, F. D. Vecchia, R. Gabbrielli, C. Gonnelli, N. Rascio, R. Barbato and N. La Rocca. 2006. "Evidence for PSII donor-side damage and photoinhibition induced by cadmium treatment on rice (*Oryza sativa* L.)". *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, vol. 84, p. 70-78.
- Pätsikkä, E., M. Kairavuo, F. Sersen, E. M. Aro and E. Tyystjarvi. 2002. "Excess copper predispose photosystem II to photoinhibition in vitro by out competing iron and causing decrease in leaf chlorophyll". *Plant Physiology*, vol. 129, p. 1359-1367.
- Pawlisz, A. V., R. A. Kent, U. A. Schneider and C. Jefferson. 1997. "Canadian Water Quality Guidelines for Chromium". *Environmental Toxicology and Water Quality*, vol. 12, p. 185-193.
- Pospíšil, P., and H. Dau. 2002. "Valinomycin sensitivity proves that light-induced thylakoid voltages result in millisecond phase of chlorophyll fluorescence transients". *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1554, p. 94-100.

- Rutherford, A. W., and A. Kriger-Lisazkay. 2001. "Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II". *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 26, p. 648-653.
- Schagerl, M., C. Pichler and K. Donabaum. 2003. "Patterns of major photosynthetic pigments in freshwater algae. 2. Dinophyta, Euglenophyta, Chlorophyceae and Charales". *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, vol.39, p. 49-62.
- Schansker, G., S. Z. Tóth and R. J. Strasser. 2005. "Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl a fluorescence rise OJIP". *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1706, p. 250-261.
- Schreiber, U. and W. Vidaver. 1976. "The I D fluorescence transient. An indicator of rapid energy distribution changes in photosynthesis". *Biochimica et Biophysica Acta*, vol 440, p. 205-214.
- Schreiber, U., U. Schliwa and W. Bilger. 1986. "Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer". *Photosynthesis Research*, vol. 10, p. 51-62.
- Strasser, B. J., H. Dau, I. Heinze and H. Senger. 1999. "Comparison of light induced and cell cycle dependent changes in the photosynthetic apparatus: A fluorescence induction study on the green alga *Scenedesmus obliquus*". *Photosynthesis Research*, vol. 60, p. 217-227.
- Strasser, B. J., and R. J. Strasser. 1995. "Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP test". In *Photosynthesis: from light to biosphere*, vol. 5, Editors, P. Mathis, p. 977-980. Kluwer Academic Publishers.
- Strasser, R.J., A. Srivastava et M. Tsimilli-Michael. 2004. "Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient". In *Chlorophyll Fluorescence a Signature of Photosynthesis, Advances in Photosynthesis and respiration*. Editors G. Papageorgiou, Govindjee. vol. 19, pp. 321-362. The Netherlands : Kluwer Academic Publishers.

Table 3.1 : The change of growth rate and pigment content of *C. reinhardtii* when exposed 24 hours to dichromate. Letters indicate significantly different results ($p > 0.05$).

[Cr ₂ O ₇ ²⁻] (μM)	0	6	12.5
Growth rate (d⁻¹)	0.84 ± 0.04 ^a	0.53 ± 0.06 ^b	0.29 ± 0.04 ^c
Zeaxanthin / (Chl <i>a+b</i>)	0.06 ± 0.01 ^a	0.13 ± 0.02 ^b	0.22 ± 0.03 ^c
Chl <i>a+b</i> / cell (x 10⁻⁷ μg)	20.2 ± 3.1 ^a	13.3 ± 4.2 ^{ab}	10.1 ± 2.5 ^b
Zeaxanthin / cell (x 10⁻⁷ μg)	1.25 ± 0.1 ^a	1.70 ± 0.4 ^{ab}	2.17 ± 0.2 ^b
Violaxanthin / cell (x 10⁻⁷ μg)	0.54 ± 0.06 ^a	0.03 ± 0.04 ^b	n.d.

Table 3.2 : The change of rapid chlorophyll a fluorescence induction parameters when *C. reinhardtii* was exposed 24h to dichromate. For more details, see material and methods. Letters indicate significantly different results ($p > 0.05$).

[Cr ₂ O ₇ ²⁻] (μM)	0	6	12.5
A _{O-J}	349 ± 62 ^a	260 ± 8 ^b	188 ± 25 ^c
A _{J-I}	138 ± 20 ^a	94 ± 9 ^{ab}	72 ± 12 ^b
A _{I-P}	111 ± 9 ^a	66 ± 4 ^b	35 ± 5 ^c
ABS/RC	3.40 ± 0.14 ^a	4.13 ± 0.10 ^b	5.48 ± 0.29 ^c
S _M	15.45 ± 1.07 ^a	14.34 ± 0.03 ^a	10.62 ± 1.05 ^b
DI _O /RC	1.17 ± 0.12 ^a	1.75 ± 0.02 ^b	2.88 ± 0.33 ^c
qPQ	0.20 ± 0.01 ^a	0.17 ± 0.01 ^a	0.13 ± 0.01 ^b

$[\text{Cr}_2\text{O}_6^{2-}]$ (μM)	0	6	12.5
D1 protein content			
Φ_{MII}	0.67 ^a ± 0.01	0.65 ^a ± 0.03	0.54 ^b ± 0.06
Φ_{MI}	0.86 ^a ± 0.01	0.74 ^{ab} ± 0.03	0.68 ^b ± 0.08

Figure 3.1 : Chromium effect on D1 protein content, quantum yield of PSII (Φ_{MII}) and PSI (Φ_{MI}) when *C. reinhardtii* was exposed 24 hours to dichromate. Letters indicate significantly different results ($p > 0.05$).

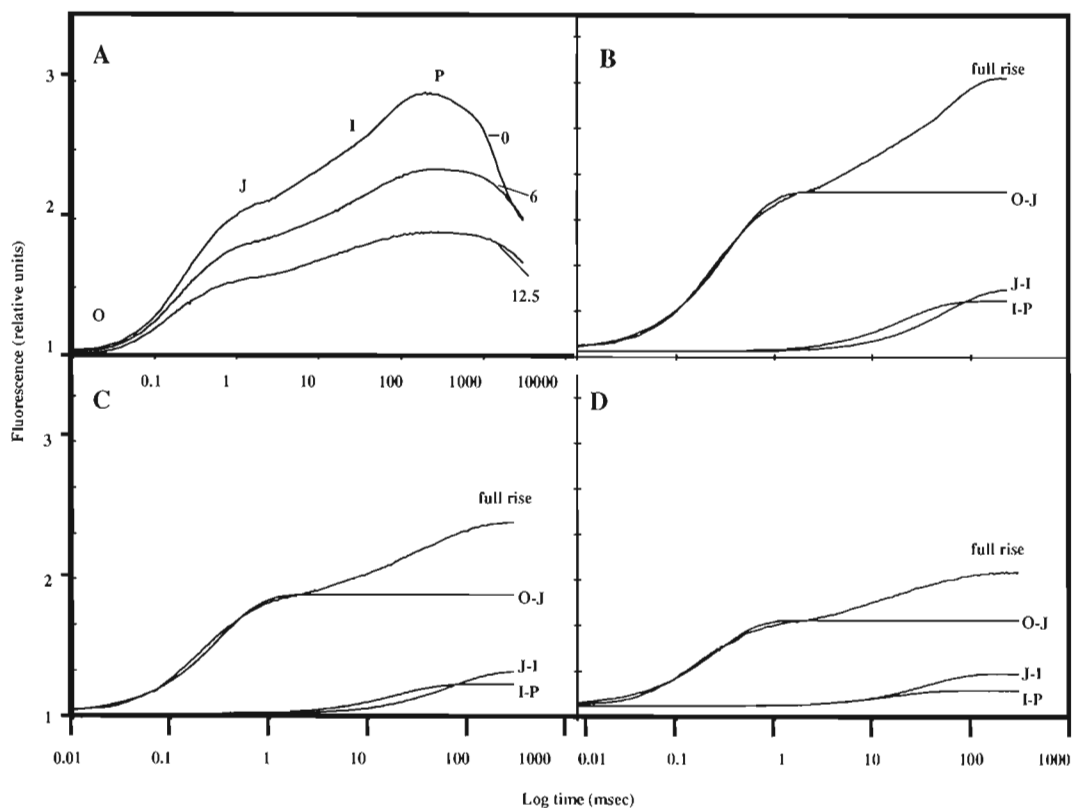


Figure 3.2 : Change of rapid chlorophyll rise of dark adapted samples of *C. reinhardtii* exposed to dichromate for 24h. (A): Rapid rise of fluorescence with transitions O, J, I and P level of fluorescence; numbers represent dichromate concentration used for treatments. Deconvolution of O-P chlorophyll fluorescence rise according to Pospíšil and Dau (2002) for control (B), 6 μM (C) and 12.5 μM (D).

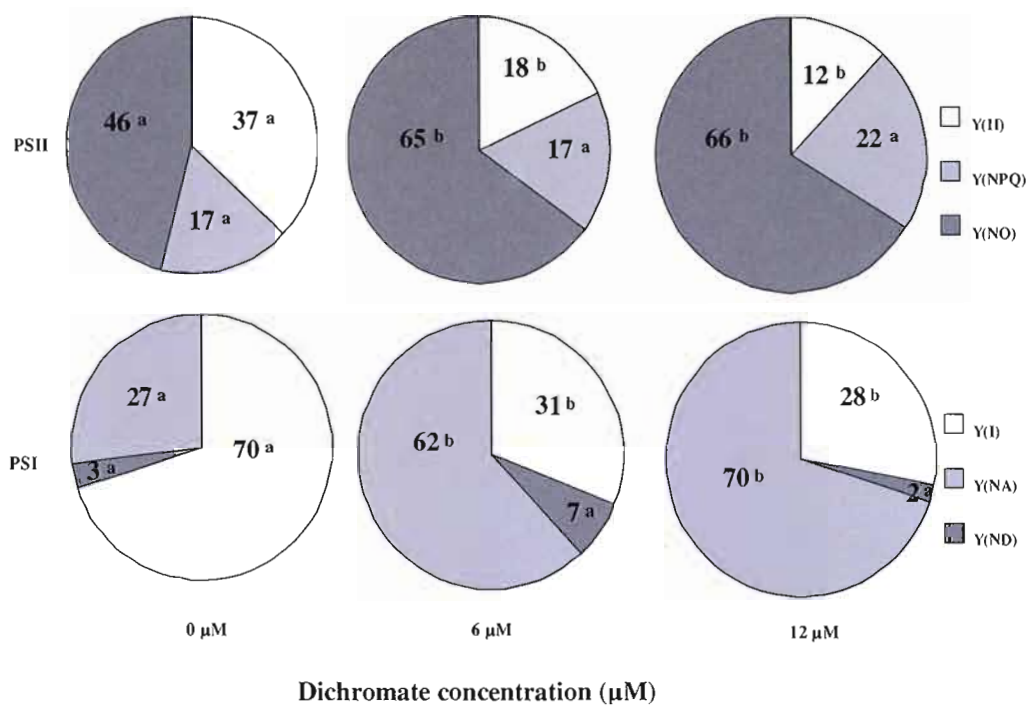


Figure 3.3 : The change of steady state energy dissipation when *C. reinhardtii* was exposed 24h to dichromate. The values of parameters are presented as percentage value participating in PSII and PSI energy dissipation considered as 100%. For more details, see material and methods. Letters indicate significantly different results ($p > 0.05$).

CHAPITRE IV

EFFECT OF DICHROMATE ON PHOTOSYSTEM II ACTIVITY IN XANTHOPHYLL-DEFICIENT MUTANTS OF CHLAMYDOMONAS REINHARDTII

Nadia Ait Ali¹, Philippe Juneau², Olivier Didur¹, François Perreault¹ and Radovan Popovic^{1*}

¹ University of Quebec in Montreal, Department of Chemistry, Environmental Toxicology Research Center, TOXEN, 2101, Jeanne-Mance, Montreal (Quebec) Canada, H2X 2J6

² Department of Biological Sciences – TOXEN, Canadian Research Chair on Ecotoxicology of Aquatic Microorganisms, University of Quebec in Montreal, C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montreal (Quebec), H3C 3P8, Canada

*Corresponding author

Published in Photosynthesis Research, vol. 95, p. 45-53, 2008.

Contribution dans ce chapitre : Dans ce chapitre, j'ai participé à la rédaction de la version finale du manuscrit et à la prise des résultats expérimentaux.

4.1 RÉSUMÉ

L'activité et la dissipation d'énergie du photosystème II ont été étudiées quand des mutants d'algues de *Chlamydomonas reinhardtii* ont été exposés aux effets toxiques du dichromate. L'exposition, pendant 24h aux effets toxiques du dichromate, de deux mutants de *C. reinhardtii*, ayant un cycle de xanthophylles non fonctionnel, identifiés par *npq1* (déficient en zéaxanthine) et *npq2* (accumulant la zéaxanthine), a provoqué une inhibition du transport d'électrons du PSII. Après exposition au dichromate, l'activité du PSII de ces mutants a été étudiée dans des conditions d'intensités variables de lumière actinique. Pour déterminer la toxicité du dichromate et l'effet d'intensité de la lumière sur les propriétés fonctionnelles de PSII, nous avons étudié le changement de la dissipation d'énergie via le transport d'électrons de PSII, la dissipation non photochimique d'énergie impliquant des mécanismes régulateurs et non régulateurs. Nous avons établi par la suite un modèle indiquant la dépendance entre l'effet de la toxicité du dichromate et la photoinhibition chez les algues ayant un cycle de xanthophylles non fonctionnel. Lorsque ces mutants d'algues ont été exposés aux effets toxiques du dichromate et à une intensité lumineuse élevée, la dissipation d'énergie, sous forme non photochimique et impliquant des processus non régulateurs, est devenue majoritaire, atteignant la valeur de 80 %. Par conséquent, les mutants d'algues *npq1* et *npq2*, ayant le cycle de xanthophylles non fonctionnel, étaient plus sensibles aux effets toxiques du dichromate.

4.2 ABSTRACT

The photosystem II activity and energy dissipation were investigated when algal *Chlamydomonas reinhardtii* genotypes were exposed to dichromate toxicity effect. The exposure during 24h to dichromate effect of two *C. reinhardtii* mutants having non functional xanthophylls cycle, as *npq1* zeaxanthin deficient and *npq2* zeaxanthin accumulating, induced inhibition of PSII electron transport. After dichromate induced toxicity, PSII functions of *C. reinhardtii* mutants were investigated under different light intensities. To determine dichromate toxicity and light intensity effect on PSII functional properties we investigated the change of energy dissipation via PSII electron transport, non photochemical regulated and non regulated energy dissipation according to Kramer et al. (2004). We showed the dependency between dichromate toxicity and photoinhibition in algae deficient in xanthophyll cycle. When algal mutants missing xanthophylls cycle were exposed to dichromate toxicity and to high light intensity energy dissipation via non regulated mechanism takes the most important pathway reaching the value of 80 %. Therefore, the mutants *npq1* and *npq2* having non functional xanthophylls cycle were more sensitive to dichromate toxic effects.

Keywords : Photosystem II energy dissipation; xanthophyll cycle; zeaxanthin; dichromate; *Chlamydomonas reinhardtii*; MAXI-IMAGING-PAM fluorometry.

4.3 INTRODUCTION

For dichromate effect, it has been found to inhibit photosynthesis process at very low concentration (Wong and Chang, 1991 ; Mallick and Mohn, 2003). Sensitive site for chromate effect is closely associated with photosystem II electron transport (Appenroth *et al.*, 2003 ; Ait Ali *et al.*, 2006 ; Hörcsik *et al.*, 2007). Dichromate inhibitory site was determined to be located at the PSII reducing side since the photoreduction of 2,6-dichlorophenol indophenol by thylakoid membranes was not recovered after addition of PSII electron donors (DPC, NH_2OH , MnCl_2 and benzidine) (Prasad *et al.*, 1991). It has been shown that when *Spirodela polyrhiza* was affected by dichromate the inhibition site was located between PSII primary electron acceptor Q_A and secondary electron acceptor Q_B . The increase of fluorescence yield at K transient and alteration of oxygen evolving function when *Spirodela polyrhiza* was exposed to dichromate toxic effect were taken as evidences that water splitting system can be another inhibitory site (Susplugas *et al.*, 2000 ; Appenroth *et al.*, 2001). The evidence has been shown for dichromate inhibition of PSII electron transport in *Lemna gibba* and *Chlorella pyrenoidosa* to be associated with decrease of protein D1 and 33 kDa protein of the oxygen evolving complex. In *Lemna gibba* dichromate effect initiated the increase of reactive oxygen species (ROS) which was found to be closely related to a decrease of D1 protein content (Ait Ali *et al.*, 2006; Hörcsik *et al.*, 2007).

Such dichromate inhibitory effects on PSII appeared to be similar to those caused by ROS formation when algal cells were exposed to high light intensity inducing photoinhibitory effect (Lupínková and Komenda, 2004 ; Nishiyama *et al.*, 2004). The studies of PSII electron transport inhibition by dichromate may indicate possible involvement of PSII photoinhibition process. For other metals as Cu and Cd toxicity effect on PSII of *Phaseolus vulgaris* and *Oryza sativa* was found to accelerate photoinhibition effect and alters D1 protein by different processes such as increasing reactive oxygen species production and altering protein synthesis (Pätsikkä *et al.*, 2002 ; Singh and Tewari, 2003 ; Pagliano *et al.*, 2006). Such Cd^{2+} effect on D1 protein in *Oryza sativa* caused important decrease of PSII quantum yield. Photoinhibition process has been characterized by an increase of fluorescence non

photochemical quenching (NPQ) value related to heat dissipation (Maxwell and Johnson, 2000 ; Müller *et al.*, 2001). Under such condition this pathway of energy dissipation represents the main regulatory mechanism in preventing photo-inhibitory effect when plants are exposed to excess light energy or toxic effect induced by different xenobiotics. Moreover, it has been shown for metals toxicity effect to change the energy dissipation process which may interfere with photoinhibition as already seen for copper, cadmium and dichromate effects (Pätsikkä *et al.*, 2002 ; Pagliano *et al.*, 2006 ; Ait Ali *et al.*, 2006).

It is assumed that photoinhibition process in majority of plants species is regulated by heat energy dissipation via xanthophyll cycle which is dependent to proton gradient closely related to oxido-reduction state of PSII-PSI electron transport (Krause and Jahns, 2004). In this process, controlled by enzyme violaxanthin epoxidase, violaxanthin is reversibly transformed into zeaxanthin via intermediate antheraxanthin which accepts excitation energy directly from light harvesting antenna chlorophylls, therefore, resulting in non radiative thermal energy dissipation (Horton *et al.*, 1994 ; Demmig-Adams *et al.*, 1996). Zeaxanthin may also react with protein LHC inducing their conformation change which will also result in heat dissipation (Horton *et al.*, 1994 ; Pospisil, 1997). For photosynthesis of higher plants and algal species, it has been indicated to change remarkably the energy dissipation process under different environmental conditions. This effect has been interpreted as result of PSII structural and functional change according to ecological adaptation (Kitao *et al.*, 2003 ; Garcia-Mendoza *et al.*, 2002 ; Serôdio *et al.*, 2005). Therefore, further understanding of this process affecting PSII functions may provide valuable information on PSII energy dissipation mechanism. In this report we used *Chlamydomonas reinhardtii* mutants, having reduced non-photochemical quenching property *npq1* and *npq2* (Niyogi *et al.*, 1997 ; Govindjee and Seufferheld, 2002) to investigate dichromate effect on PSII energy dissipation process when algae are exposed to different light intensity.

4.4 MATERIALS AND METHODS

4.4.1 Algae culture

Chlamydomonas reinhardtii algal strains (wild type : CC-400, *npq1* mutant deficient in zeaxanthin : CC-3682 and *npq2* mutant accumulating zeaxanthin : CC-3683) were obtained from the *Chlamydomonas* Genetic Center (Duke University, Durham, NC). The original source and phenotype characterization of *npq1* and *npq2* mutants was described in Niyogi *et al.* (1997). Cells were cultivated in a batch culture of 1 L high salt (HS) growth medium (Harris, 1989) under continuous illumination ($100 \pm 25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) provided by white fluorescent lamps (Sylvania GroLux F 36 W) at $27 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$. The algal culture was placed on an orbital shaker (120 rpm) and permanently aerated to obtain constant CO_2 concentration in the growing medium. When the algal culture was in the exponential growth phase, a sample having a cell density of $5 \times 10^7 \text{ cells ml}^{-1}$ was used in this study.

4.4.2 Dichromate treatment

The stock solution of dichromate was made with $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ salt dissolved in HS medium to obtain 20 mM of stock solution. For investigation of dichromate toxicity, treated algal samples were prepared with growth medium in final volume of 100 ml where initial cell density was $3 \times 10^5 \text{ cells ml}^{-1}$. The algal samples were exposed during 24h to 6, 12.5 and 25 μM of dichromate concentrations. During dichromate treatment samples were placed on an orbital shaker where light intensity and temperature conditions were the same used for growth culture.

4.4.3 Cell growth and chlorophyll determination

Algal cell density was determined by using a Multisizer 3 Coulter Counter (Beckman Coulter). Growth rates were calculated from plots of the \ln of cell number against exposure

time to dichromate. Total chlorophyll extraction was done in 100 % of methanol at 65°C and quantitative determination was done according to Lichtenthaler (1987).

4.4.4 Determination of Chlorophyll a fluorescence parameters

Prior to fluorescence measurements, treated algal samples were dark-adapted for 15 min to obtain an oxido-reduction equilibrium of PSII-PSI electron transport carriers. Sample of algal cells (8 µg of chlorophyll *a*) were uniformly placed on 13 mm glass fiber filter (Millipore #AP20 013 00) by using low pressure filtration to avoid physiological stress effect and to obtain highly reproducible results according to Dewez *et al.* (2005).

Chlorophyll fluorescence parameters were measured at room temperature with a pulse-amplitude-modulated fluorescence monitoring system (MAXI-IMAGING-PAM, Heinz Walz, Effeltrich, Germany) based on the principle of Schreiber *et al.* (1986). The response of photosynthetic fluorescence parameters to light intensity was determined by using the rapid light curve according to White and Critchley (1999). Algal samples were illuminated with different irradiances of actinic light (from 20 to 1200 µmol m⁻² s⁻¹), after each exposure of 1 min a 0.8 s saturating light pulse (3000 µmol m⁻² s⁻¹) was applied to obtain maximum light-adapted fluorescence. For used actinic lights different photosynthetic parameters were evaluated. The effective quantum yield of PSII, $Y(II) = (F_M' - F) / F_M'$ according to Genty *et al.* (1989). The quantum yield of non-regulated energy dissipation of PSII, $Y(NO) = 1 / (NPQ + 1 + qL (F_M / F_O - 1))$, where non-photochemical quenching value was $NPQ = (F_M - F_M') / F_M'$. The parameters $qL = qP \times F_O' / F$ and $qP = (F_M' - F) / (F_M' - F_O')$ were used as indicators for fraction of open PSII reaction center participating in electron transport. The quantum yield of regulated energy dissipation of PSII was estimated as $Y(NPQ) = 1 - Y(II) - Y(NO)$ according to Kramer *et al.* (2004). For all those parameters F_O fluorescence yield was considered when PSII was at maximum level oxidized state (dark adapted state) and the F_O' fluorescence yield was considered when PSII was under light adapted state ($F_O' = F_O / (F_V / F_M + F_O / F_M')$) according to Oxborough and Backer (1997). Numerical values of chlorophyll fluorescence parameters were evaluated by using analytical software (IMAGING-WIN, Walz, Effeltrich, Germany).

4.4.5 Data analysis and statistic

The experiments were done in three replicates for all treatments. Means and standard deviation were estimated for each treatment. Significant differences between controls and Cr treated samples were determined by using Student's *t* test where *p* value less than 0.05 was considered to be significant.

4.5 RESULTS AND DISCUSSION

4.5.1 Growth inhibition and chlorophyll content

Dichromate appeared to be an inhibitor of algal cell growth as we noted by the change of growth rate. When *C. reinhardtii* genotypes (wild type, *npq1* and *npq2*) were exposed during 24h to dichromate cell growth showed a significant decrease for all genotypes exposed to dichromate concentration of 12,5 and 25 μM (Table 4.1). The chlorophyll concentration per cell of algal culture decreased also significantly for all genotypes indicating that dichromate (12,5 and 25 μM) toxicity altered chlorophyll synthesis or caused a chlorophyll degradation (Table 4.1). This result showed that photosynthesis represents sensitive target for dichromate inhibitory effect. Some evidences have been earlier reported for dichromate to affect photosynthesis shown by the change of PSII fluorescence rapid transients of *Spirodela polyrhiza* (Appenroth *et al.*, 2001). Evidence for dichromate inhibitory effect on protochlorophyllide transformation into chlorophyllide and alteration of PSII light harvesting complex in wheat confirm for dichromate to inhibit of PSII function (Mysliwa-Kurdziel and Strzalka, 2005).

For the three investigated *C. reinhardtii* genotypes we found to have very different PSII non photochemical quenching capacity when they have been exposed to the same light intensities. For mutants *npq1* and *npq2*, exposed to high light intensity from 700 to 1000

$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, it has been determined to have non photochemical quenching (NPQ) values at half and one third compared to wild type respectively (Figure 4.1). For *npq1* and *npq2* mutants, it has been earlier reported to have reduced ability to dissipate energy via non photochemical pathway (Niyogi *et al.*, 1997 ; Govindjee and Seufferheld, 2002). It is important to investigate the change of PSII function under different light intensities when dichromate toxicity has been induced.

4.5.2. Effect of light intensity on PSII function and energy dissipation when algal genotypes have been exposed to dichromate toxicity effect

When *C. reinhardtii* mutants were exposed to dichromate, the electron transport of PSII activity was different if *npq1* and *npq2* mutants were compared to wild type. Here we used the change of qP value to evaluate energy dissipation via PSII electron transport since photochemical quenching values qP indicates PSII reaction centers in open state contributing to electron transport (Rohacek, 2002). We found for mutant *npq1* lacking zeaxanthin and exposed to dichromate toxicity to have low capacity in maintaining PSII electron transport (Figure 4.2 B). Under similar condition, wild type and *npq2* mutant accumulating zeaxanthin were relatively similar and more resistant to photoinhibitory effect compared to *npq1*. However when algae were exposed to 12.5 μM dichromate the electron transport of PSII in *npq2* mutant was evidently inhibited under relatively low light intensity ($325 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) if compared to wild type ($600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), (Figure 4.2 A-C). The effect was even more pronounced when dichromate concentration was increased to 25 μM . The susceptibility of PSII to photoinhibition was earlier found to be correlated to the ratio between open PSII and closed PSII reaction centers (Oquist and Huner, 1993). A significant higher probability of PSII photodamage will occur when Q_A is in reduced state, closed PSII reaction centers (Melis, 1999). It has been found when algal specie *Scenedesmus obliquus* were exposed to dichromate inhibitory effect that the decreased ratio of open to closed PSII was resulted in the decrease of qP values (Mallick and Mohn, 2003). According to those earlier studies, our results here showed that dichromate may accelerate photoinhibition (Figure 4.2 A). However, this effect of dichromate was much more evident for mutants *npq1* and *npq2* having non functional xanthophylls cycle (Figure 4.2 B, C).

According to the change of photochemical quenching (Figure 4.2), the efficiency of photochemical energy conversion by PSII, measured with operational quantum yield $Y(II)$, was strongly dependent to light intensity for all investigated algal genotypes (Figure 4.3). We found for the decrease of operational quantum yield caused by photoinhibition to be different when wild type was compared with mutants *npq1* and *npq2*. Complete inhibition of PSII primary photochemistry was induced at $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for wild type and for *npq2* mutant characterized earlier to have high content of zeaxanthin was at $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Niyogi et al. 1997). On the other hand mutant *npq1* (not having zeaxanthin), showed photoinhibition at $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figure 4.3 B). It appeared that *npq2* mutant was more resistant to photoinhibition compared to *npq1* mutant. This finding was in agreement with earlier report that *npq1* had rapid degradation of PSII D1 protein under high light intensity (Jahns *et al.*, 2000). In this study we noticed for dichromate effect to increase sensitivity of algae to photoinhibitory effect since light saturation was induced at lower light intensity in algae treated with dichromate. It is worth to notice when algae were exposed to $12.5 \mu\text{M}$ dichromate, that the mutants not having functional xanthophyll cycle, *npq1* (deficient in zeaxanthin) and *npq2* (accumulating zeaxanthin), were completely light saturated at $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figure 4.3 B-C), while wild type was functional up to $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figure 4.3 A). By these evidences we demonstrated for dichromate inhibitory effect on PSII to increase drastically sensibility to photoinhibition process in algae mutants missing xanthophyll cycle and regardless to the presence or absence of zeaxanthin. The inhibitory effect of heavy metals which increased sensitivity of PSII to light by causing photoinhibition was reported earlier for *Phaseolus vulgaris* and *Oryza sativa* exposed to Cu and Cd respectively. Those effects were associated with deterioration of D1 protein functions causing an important decrease of PSII quantum yield resulting from the change of proportion of functional PSII reaction centers (Pätsikkä *et al.*, 2002; Pagliano *et al.*, 2006).

Decrease of the operational quantum yield caused by dichromate effect on algae affect also energy dissipation via non-photochemical pathway. Therefore, it was of interest to investigate how dichromate may affects regulatory energy dissipation process concerning xanthophyll cycle and carotenoids, $Y(NPQ)$, and non regulatory process, $Y(NO)$ which is

competitive mechanisms of energy dissipation (Kramer *et al.*, 2004). As those dissipative pathways of absorbed light energy via excited state of chlorophyll are complementary to each other, it is expected that the decrease of energy through one way will increase dissipation via the other pathways (including the photochemical one). It is considered for Y(NPQ) to represent PSII energy dissipation via regulated mechanism concerning xanthophyll cycle and carotenoids. However, the fraction of energy which is not dissipated by this mechanism, Y(NO), is considered to be energy dissipation via non regulated processes (Kramer *et al.*, 2004). In this study for all *C. reinhardtii* genotypes, not exposed to dichromate effect, one may expect to see this interdependence between those different energy dissipation pathways. As we noticed, when light energy was increased causing diminished PSII operational quantum yield, Y(II), the regulated energy dissipation was gradually increased (Figure 4.3 and 4.4 : A-C). When wild type algae were exposed to dichromate toxic effects up to 25 μM , the energy dissipation via regulatory pathway was gradually decreased. We may interpret this to be caused by the decrease of electron-protons transport and consequently it may delay xanthophyll cycle, since pH gradient is essential for this cycle. However, this does not exclude direct inhibitory effect of dichromate on xanthophyll epoxidation process as earlier reported for cadmium (Bertrand *et al.*, 2001). We found for all genotypes that high dichromate concentrations (example 25 μM) induced a strong increase of energy dissipation via Y(NO) as non regulated pathway (Figure 4.4). For *npq1* mutant, having high sensitivity to light inhibition of electron transport, it has been found to have strong energy dissipation via regulatory, Y(NPQ) and non regulated pathway, Y(NO), mechanisms. We noticed that non regulated pathways was more important compared to other ways of energy dissipation (Figure 4.4 B, E). If algae are not exposed to dichromate toxicity, the sensitivity to photoinhibition was very similar comparing mutant *npq2* (not having xanthophyll cycle but having high accumulation of zeaxanthin) with wild type. However, sensitivity to photoinhibition of *npq2* mutant appeared to be evident when it has been exposed to Cr toxic effects. For this *npq2* mutant exposed to high concentrations of dichromate (12.5 and 25 μM) regulated non photochemical energy dissipation, Y(NPQ), appeared only under high light intensity (Figure 4.4 C). Similarly to *npq1*, mutant *npq2* demonstrated for dichromate toxicity effect to induce mostly PSII energy dissipation via non regulated pathway, Y(NO), (Figure 4.4 F). This discrepancy was found for all investigated genotypes of *C. reinhardtii* which

indicate for dichromate to trigger energy dissipation via non regulated pathway. We demonstrated here for three *C. reinhardtii* genotypes to have very different sensitivity to dichromate toxic effect and also characteristic pathways of energy dissipation. If we consider that PSII energy distribution via Y(II), Y(NPQ) and Y(NO) represents 100 % of absorbed light energy by light harvesting complex, according earlier investigation (Kramer *et al.*, 2004), therefore, the investigation of energy dissipation under different light intensity will indicate dichromate toxicity effect on regulatory and non regulatory energy dissipation pathways. Here we investigated dichromate toxicity effect on distribution of energy dissipation way when three genotypes of *C. reinhardtii* were exposed to relatively low ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and high light intensity ($530 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), (Figure 4.5 A and B). We found for wild type of *C. reinhardtii*, exposed to low intensity and not treated by dichromate, to have efficient PSII electron transport with participation of Y(II)=50 % compared to total energy dissipation as Y(II)+Y(NPQ)+Y(NO)=100 %. Under the same conditions, for *npq1* and *npq2* mutants PSII functional quantum yield was only 9 % and 33 % respectively. Both mutants demonstrated high values of non regulated energy dissipation since having for Y(NO) 77 % (*npq1*) and 62 % (*npq2*). When dichromate toxic effect was induced either by 6 and 12.5 μM , we found for Y(NO) to increase significantly in wild type and *npq2* mutant (Figure 4.5 A). We should mention that *C. reinhardtii* genotypes were adapted and grown under $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, therefore, when those algae were exposed to relatively high light intensity ($530 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), the energy dissipation was evidently different since operational quantum yield for all genotypes were decreased for 3 to 4 times, while, regulated and non regulated pathways were increased. Under those conditions, dichromate toxicity by inducing inhibition of PSII electron transport in mutants, *npq1* and *npq2*, forced the majority of light energy to be dissipated through non regulated pathway as estimated by Y(NO) values (Figure 4.5 B, Figure 4.6). This result gave evidence for algal genotype *npq1*, lacking xanthophyll cycle, to be highly sensitive to photoinhibitory effect. However less sensitivity to photoinhibitory effect found for *npq2* mutant not having xanthophylls cycle either, we may interpret to be resulted of possible photoprotection by accumulated zeaxanthin which may participate to energy dissipation by a mechanism not well understood (Jahns *et al.*, 2000 ; Goovindgee and Seufferheld, 2002). This is in agreement with earlier findings for zeaxanthin to interact directly with chlorophyll antenna complex and preventing ROS formation which may

contribute to photoinhibition (Demmig-Adams *et al.*, 1996; Pospisil, 1997). However, such role of energy dissipation does not prevent photoinhibitory effect when *npq2* mutant was exposed to dichromate inhibitory effect. The evidence supporting this interpretation was recently shown by dichromate effect to induce alteration of PSII D1 protein and ROS formation in *Lemna gibba* and *Chlorella pyrenoidosa* (Ait Ali *et al.*, 2006 ; Hörcsik *et al.*, 2007). We demonstrated here evidence that when algal genotypes missing xanthophyll cycle and exposed to high light intensity, energy dissipation via non regulated mechanism is the major dissipation pathway reaching 75 % of total absorbed light energy. Under similar light condition, when those genotypes were exposed to dichromate inhibiting PSII electron transport, non regulated energy dissipation may increase up to 80 % (Figure 4.6). Therefore, the response of mutants *npq1* and *npq2* to dichromate effect confirmed for the presence of functional xanthophyll cycle to be essential in preventing photoinhibition.

4.6 ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Natural Science and Engineering Council of Canada (NSERC) through Grant GP0093404 awarded to R. Popovic.

4.7 REFERENCES

- Ait Ali, N., D. Dewez, O. Didur et R. Popovic. 2006. "Inhibition of photosystem II photochemistry by Cr is caused by the alteration of D1 protein and oxygen evolving complex". *Photosynthesis Research*, vol. 89, p. 81-87.
- Appenroth, K. J., J. Stöckel, A. Srivastava and R. J. Strasser. 2001. "Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrhiza* as probed by OJIP chlorophyll *a* fluorescence measurements". *Environmental Pollution*, vol. 115, p. 49-64.
- Appenroth, K. J., A. Keresztes, E. Sarvari, A. Jaglarz and W. Fischer. 2003. "Multiple effects of chromate on *Spirodela polyrhiza* : electron microscopy and biochemical investigations". *Plant Biology*, vol. 5, p. 315-323.

- Bertrand, M., B. Schoefs, P. Siffel, K. Rohacek and I. Molnar. 2001. "Cadmium inhibits epoxidation of diatoxanthin to diadinoxanthin in the xanthophyll cycle of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*". *FEBS Letters*, vol. 508, p. 153-156.
- Dewez, D., L. Geoffroy, G. Vernet et R. Popovic. 2005. "Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*". *Aquatic toxicology*, vol. 74, p. 150-159.
- Demmig-Adams, B., A. M. Gilmore and W. W. III Adams. 1996. "In vivo functions of carotenoids in higher plants". *FASEB Journal*, vol. 10, p. 403-412.
- Garcia-Mendoza E, H. C. Matthijs, H. Schubert and L. R. Mur. 2002. "Non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in *Chlorella fusca* acclimated to constant and dynamic light conditions". *Photosynthesis Research*, vol. 74, p. 303-315.
- Genty, B., J.-M. Briantais et N. R. Baker. 1989. "The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence". *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 990, p. 87-92.
- Govindjee, and M. Seufferheld. 2002. "Non-photochemical quenching of chlorophyll a fluorescence : early history and characterization of two xanthophylls-cycle mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*". *Functional Plant Biology*, vol. 29, p. 1141-1155.
- Harris, E. H. 1989. "The *Chlamydomonas* Sourcebook: A comprehensive guide to biology and laboratory use". San Diego, CA, Academic Press, 780 p.
- Horton, P., A. V. Ruban, and R. G. Walters. 1994. "Regulation of light harvesting in green plants". *Plant Physiology*, vol. 106, p. 415-420.
- Hörcsik, Z. T., L. Kovacs, R. Laposi, I. Meszaros, G. Lakatos and G. Garab. 2007. "Effect of chromium on photosystem 2 in the unicellular green alga, *Chlorella pyrenoidosa*". *Photosynthetica*, vol. 45, p. 65-69.
- Jahns, P., B. Depka et A. Trebst. 2000. "Xanthophyll cycle mutants from *Chlamydomonas reinhardtii* indicate a role for zeaxanthin in the D1 protein turnover". *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 38, p. 371-376.
- Kitao, M., H. Utsugi, S. Kuramoto, R. Tabuchi, K. Fujimoto and S. Lihpai. 2003. "Light-dependent photosynthetic characteristics indicated by chlorophyll fluorescence in five mangrove species native to Pohnpei Island, Micronesia". *Physiologia Plantarum*, vol. 117, p. 376-382.
- Kramer, D. M., G. Johnson, O. Kiirats et G. E. Edwards. 2004. "New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes". *Photosynthesis Research*, vol. 79, p. 209-218.

- Krause, G.H., and P. Jahns. 2004. "Non-photochemical energy dissipation determined by chlorophyll fluorescence quenching : characterization and function". In *Chlorophyll a fluorescence : a signature of photosynthesis*, Editors, G. C. Papageorgious and Govindjee, pp 463-495. Springer, The Netherlands.
- Lichtenthaler, H. K. 1987. "Chlorophylls and caretonoids : pigments of photosynthetic biomembranes". In *Methods in enzymology*, Vol 148, Editors, L. Packer and R. Douce, p 350-382. Academic Press, London.
- Lupinková, L., and J. Komenda. 2004. "Oxidative modifications of the photosystem II D1 protein by reactive oxygen species : from isolated protein to Cyanobacterial cells". *Photochemistry and Photobiology*, vol. 79, p. 152-162.
- Mallick, N., and F. H. Mohn. 2003. "Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research : a case study with the green microalga *Scenedesmus*". *Ecotoxicological and Environmental Safety*, vol. 55, p. 64-69.
- Maxwell, K., and G. N. Johnson. 2000. "Chlorophyll fluorescence-a practical guide". *Journal of Experimental Botany*, vol. 345, p. 659-668.
- Melis, A. 1999. "Photosystem II damage and repair cycle in chloroplasts : what modulates the rate of photodamage?". *Trends in Plant Science*, vol. 4, p. 130-135.
- Müller, P., X.-P. Li et K. K. Niyogi. 2001. "Non-photochemical quenching. A response to excess light energy". *Plant Physiology*, vol. 125, p. 1558-1566.
- Myśliwa-Kurdziel, B., et K. Strzalka. 2005. "Influence of Cd(II), Cr(VI) and Fe(III) on early steps of deetiolation process in wheat : fluorescence spectral changes of protochlorophyllide and newly formed chlorophyllide". *Agriculture, Ecosystems and Environment*, vol. 106, p. 199-207.
- Nishiyama, Y., S. I. Allakhverdiev, H. Yamamoto, H. Hayashi and N. Murata. 2004. "Singlet oxygen inhibits the repair of photosystem II by suppressing the translation elongation of the D1 protein in *Synechocystis* sp. PCC 6803". *Biochemistry*, vol. 43, p. 11321-11330.
- Niyogi, K. K. , O. Bjorkman and A. R. Grossman. 1997. "*Chlamydomonas* xanthophylls cycle mutants identified by video imaging of chlorophyll fluorescence quenching". *The Plant Cell*, vol. 8, p. 1369-1380.
- Oquist, G., and N. P. A. Huner. 1993. "Cold-hardening-induced resistance to photoinhibition of photosynthesis in winter rye dependent upon an increased capacity for photosynthesis". *Planta*, vol. 189, p. 150-156.

- Oxborough, K., and N. R. Baker. 1997. "Resolving chlorophyll *a* fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components-calculation of qP and F_v'/F'_m without measuring F_o ". *Photosynthesis Research*, vol. 54, p. 135-142.
- Pagliano, C., M. Raviolo, F. D. Vecchia, R. Gabbrielli, C. Gonnelli, N. Rascio, R. Barbato and N. La Rocca. 2006. "Evidence for PSII donor-side damage and photoinhibition induced by cadmium treatment on rice (*Oryza sativa* L.)". *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, vol. 84, p. 70-78.
- Pätsikkä, E., M. Kairavuo, F. Sersen, E. M. Aro and E. Tyystjarvi. 2002. "Excess copper predispose photosystem II to photoinhibition in vitro by out competing iron and causing decrease in leaf chlorophyll". *Plant Physiology*, vol. 129, p. 1359-1367.
- Pospíšil, P., and H. Dau. 2002. "Valinomycin sensitivity proves that light-induced thylakoid voltages result in millisecond phase of chlorophyll fluorescence transients". *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1554, p. 94-100.
- Prasad, S. M., J. B. Singh, L. C. Rai and H. D. Kumar. 1991. "Metal-induced inhibition of photosynthetic electron transport chain of the cyanobacterium *Nostoc muscorum*". *FEMS Microbiological Letter*, vol. 82, p. 95-100.
- Rohacek, K. 2002. "Chlorophyll fluorescence parameters : the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships". *Photosynthetica*, vol. 40, p. 13-29.
- Schreiber, U., U. Schliwa et W. Bilger. 1986. "Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer". *Photosynthesis Research*, vol. 10, p. 51-62.
- Serôdio, J., S. Cruz, S. Vieira and V. Brotas. 2005. "Non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence and operation of the xanthophyll cycle in estuarine microphytobenthos". *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, vol. 326, p. 157-169.
- Singh, P. K., and R. K. Tewari. 2003. "Cadmium toxicity induced changes in plant water relations and oxidative metabolism of *Brassica juncea* L. plants". *Journal of Environmental Biology*, vol. 24, p. 107-112.
- Susplugas, S., A. Srivastava and R. J. Strasser. 2000. "Changes in the photosynthetic activities during several stages of vegetative growth of *Spirodela polyrhiza* : Effect of dichromate". *Journal of Plant Physiology*, vol. 157, p. 503-512.
- White, A. J., and C. Critchley. 1999. "Rapid light curves : A new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus". *Photosynthesis Research*, vol. 59, p. 63-72.

Wong, P. K., and L. Chang. 1991. "Effect of copper, chromium and nickel on growth, photosynthesis and chlorophyll *a* synthesis of *chlorella pyrenoidosa* 251". *Environmental Pollution*, vol. 72, p. 127-139.

Table 4.1 : Inhibitory effect of dichromate on cell growth and chlorophyll synthesis when *C. reinhardtii* genotypes were exposed 24h.

Dichromate concentration	Wild type		<i>npq1</i>		<i>npq2</i>	
	Growth rate (day ⁻¹)	Chlorophyll (µg 10 ⁻⁷ cell)	Growth rate (day ⁻¹)	Chlorophyll (µg 10 ⁻⁷ cell)	Growth rate (day ⁻¹)	Chlorophyll (µg 10 ⁻⁷ cell)
Control	1,120 ± 0,160	8,63 ± 0,70	0,350 ± 0,073	6,4 ± 0,52	0,578 ± 0,120	7,20 ± 0,80
6 µM	0,883 ± 0,127	8,56 ± 0,91	0,086 ± 0,076	4,95 ± 0,44	0,250 ± 0,061	5,65 ± 0,71
12,5 µM	0,763 ± 0,092	6,31 ± 0,72	0,064 ± 0,063	4,90 ± 0,61	0,124 ± 0,054	4,63 ± 0,23
25 µM	0,660 ± 0,119	6,00 ± 0,63	-0,026 ± 0,09	4,24 ± 0,34	0,029 ± 0,039	3,93 ± 0,26

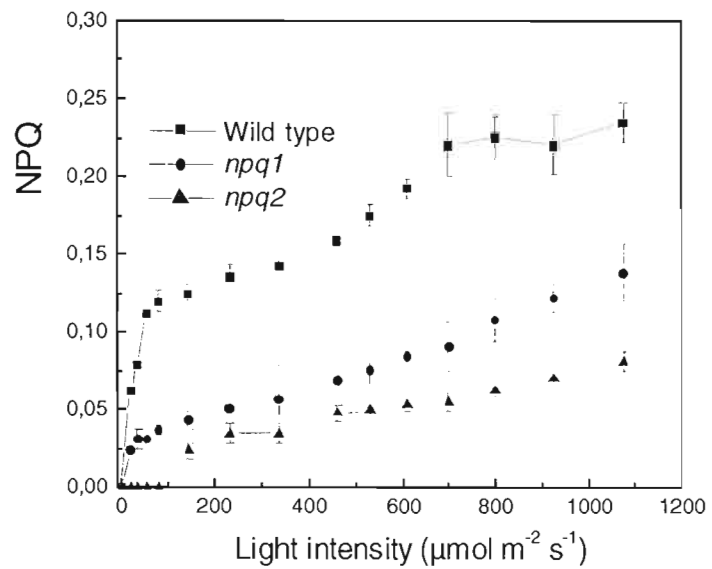


Figure 4.1 : Effect of increased light intensity on non photochemical energy dissipation estimated by non photochemical quenching (NPQ) of variable chlorophyll fluorescence.

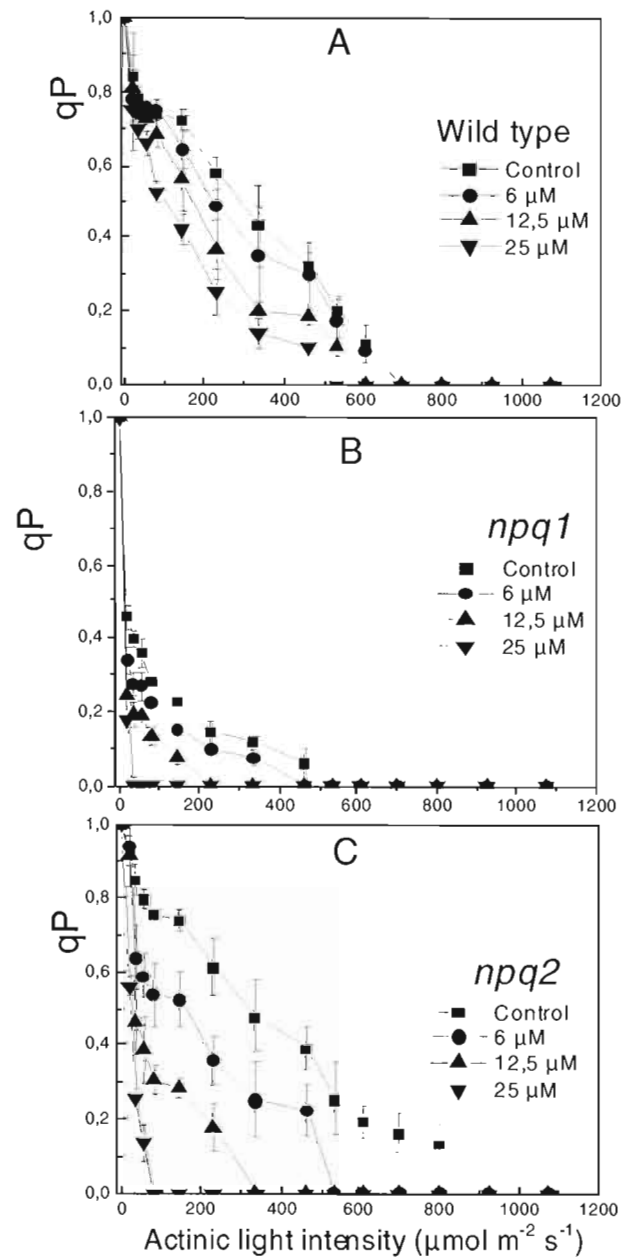


Figure 4.2 : The change of photochemical quenching (qP) of variable chlorophyll fluorescence in relation to light intensities when *C. reinhardtii* genotypes were exposed 24h to dichromate. For more details, see material and methods.

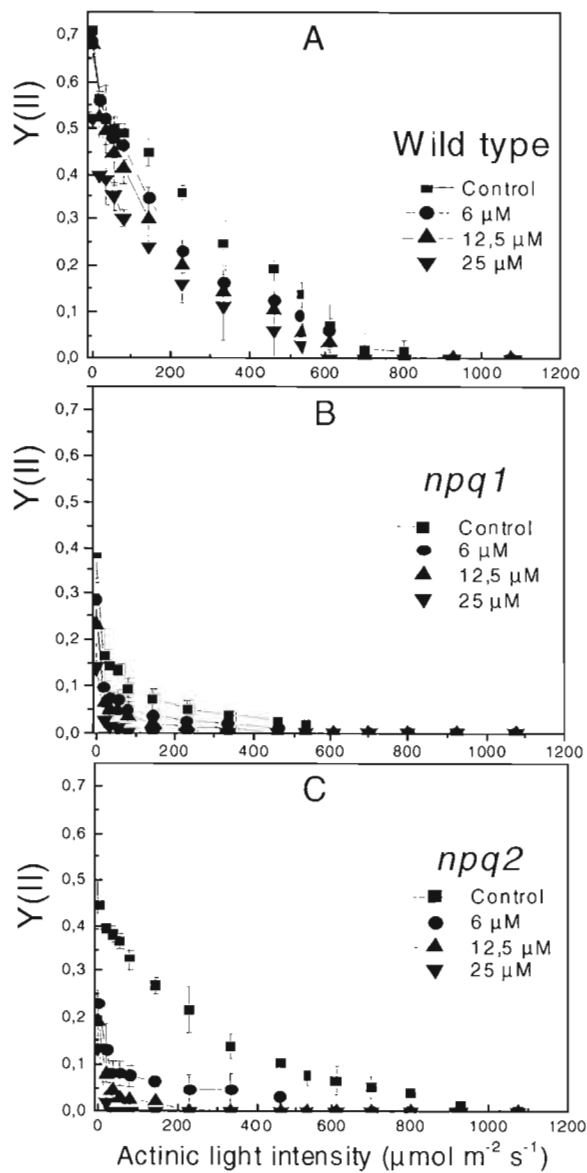


Figure 4.3 : The change of the effective quantum yield $Y(II)$ of photochemical energy conversion in PSII in relation to light intensities when *C. reinhardtii* genotypes were exposed 24h to dichromate.

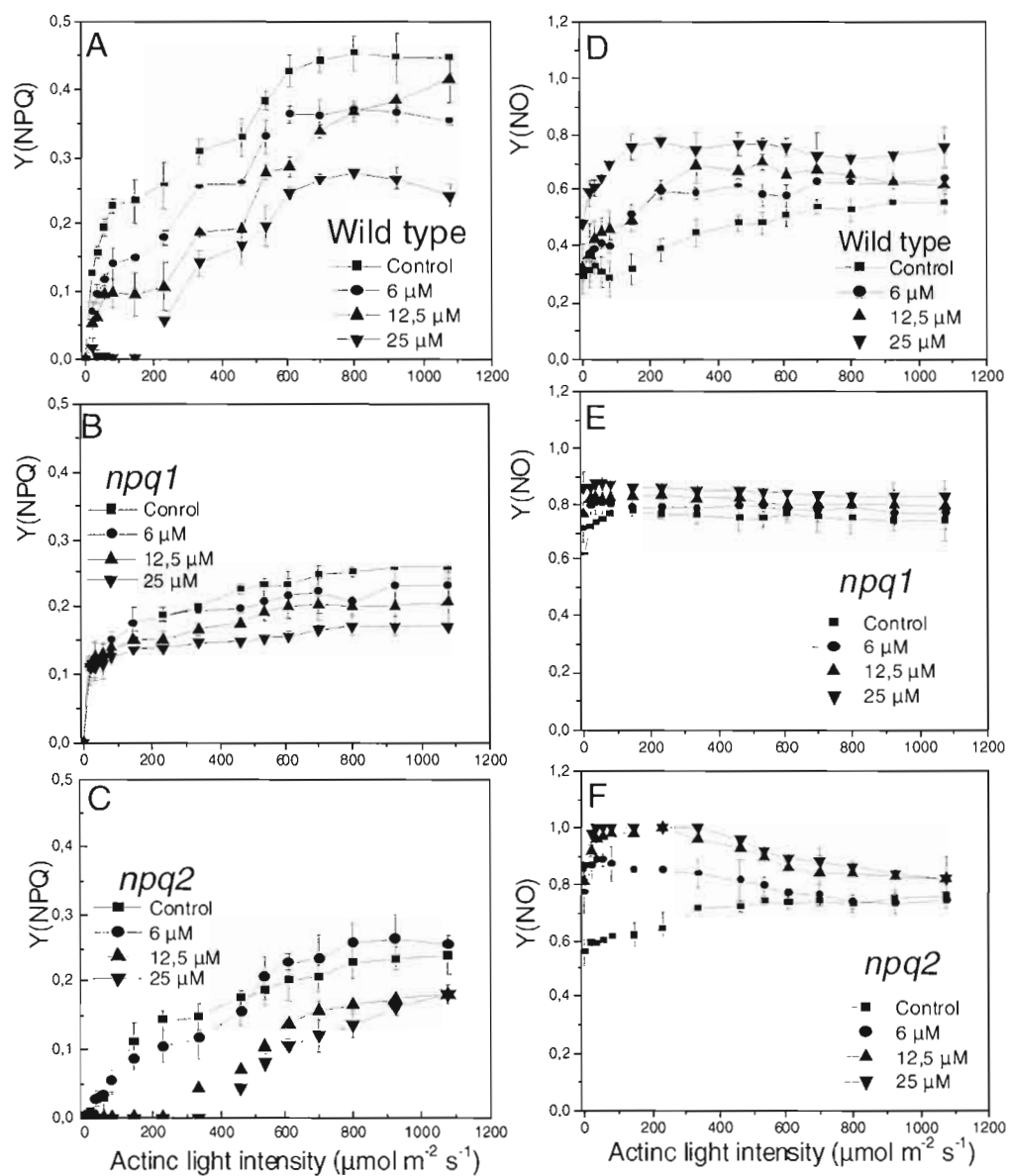


Figure 4.4 : The change of non photochemical energy dissipation pathways in relation to light intensities, noted as Y(NPQ) for the quantum yield of regulated energy dissipation in PSII and Y(NO) for the quantum yield of non-regulated energy dissipation in PSII, when *C. reinhardtii* genotypes were exposed 24h to dichromate.

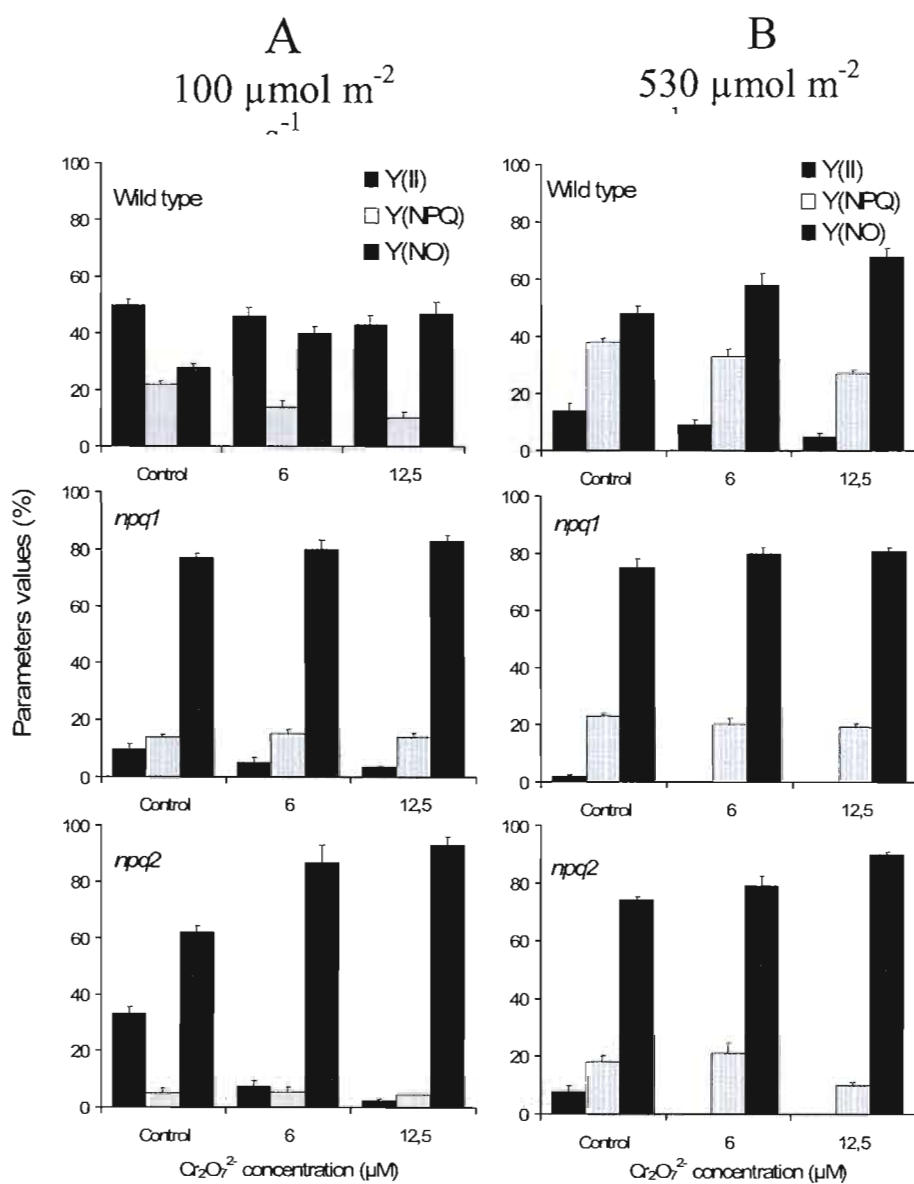


Figure 4.5 : Effect of low and high light intensity on PSII energy dissipation pathways when *C. reinhardtii* genotypes were exposed 24h to dichromate. Numbers represent percentage of the total energy dissipation.

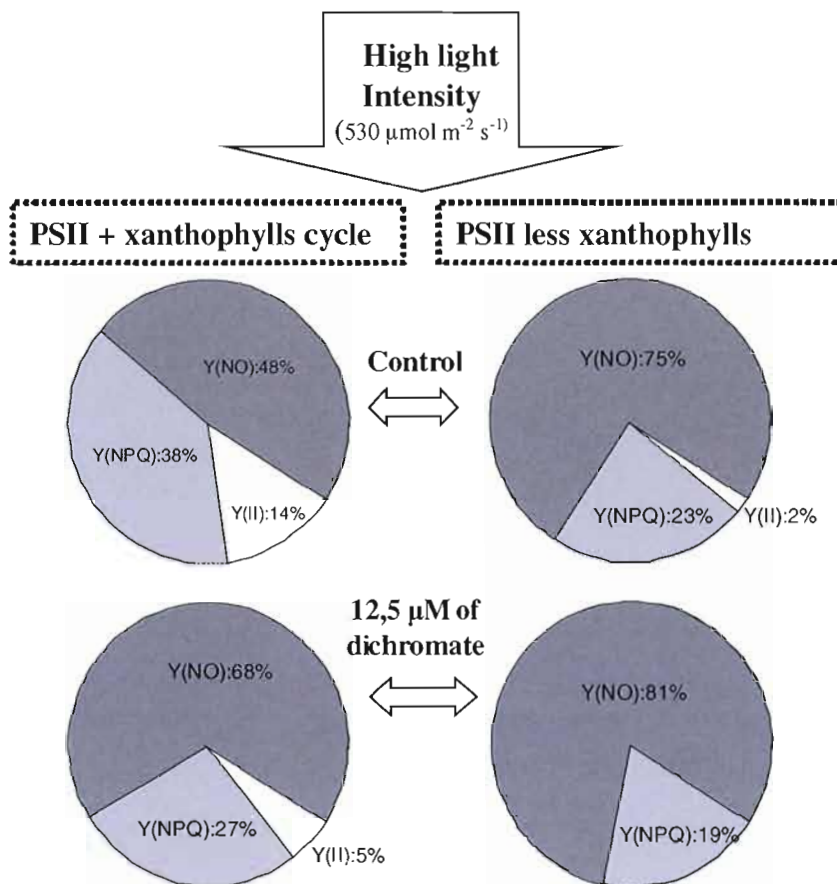


Figure 4.6 : Photochemical energy conversion (white), non-photochemical energy dissipation via regulatory (open grey) and non-regulatory (dark grey) mechanisms of PSII for *C. reinhardtii* algae having or not functional xanthophylls cycle, in samples not exposed (control) and exposed to dichromate.

CHAPITRE V

ALTERATION OF ENERGY DISSIPATION BY DICHROMATE IN XANTHOPHYLL DEFICIENT MUTANT OF CHLAMYDOMONAS REINHARDTII

François Perreault¹, Nadia Ait Ali¹, Cyril Saison¹, Philippe Juneau² and Radovan Popovic*

¹ Department of Chemistry-TOXEN, University of Quebec in Montreal, C.P. 8888, Succ. Centre-Ville, Montreal, Quebec, H3C 3P8 Canada.

² Department of Biological Sciences-TOXEN, Canadian Research Chair on Ecotoxicology of Aquatic Microorganisms, University of Quebec in Montreal, C.P. 8888, Succ. Centre-Ville, Montreal, Quebec, H3C 3P8 Canada.

* Corresponding author

Accepté et sous presse dans *Energy from the sun*, J. Allen, E. Gantt, J. Golbeck, B. Osmond (Editors)

Contribution dans ce chapitre : Ma contribution dans ce chapitre est majeure. J'ai été le principal contributeur aux idées de cet objectif de recherche, à l'établissement du plan d'expérience, à la prise des résultats et j'ai écrit la première version du manuscrit. N. Ait Ali a participé à l'élaboration des idées de recherche et C. Saison a participé aux mesures expérimentales. P. Juneau et R. Popovic ont contribué à la rédaction de la version finale du manuscrit.

5.1 RÉSUMÉ

La dissipation d'énergie par les photosystèmes II (PSII) et I (PSI) a été étudiée chez un mutant déficient en cycle des xanthophylles de *Chlamydomonas reinhardtii* exposé au dichromate, une forme de chrome hexavalent. Pour déterminer les effets simultanés du dichromate et de l'intensité lumineuse (30 and 320 μE) sur les propriétés fonctionnelles du PSII et du PSI, l'algue mutante *npq1*, déficiente en cycle des xanthophylles, a été exposée pendant 24h à 12,5 and 25 μM de dichromate. Pour étudier la dissipation d'énergie au niveau des PSII et PSI ainsi que les propriétés structurales du PSII, nous avons utilisé le fluorimètre Dual-PAM-100 (Walz) et l'immunobuvardage de type Western Blot. Aucun effet délétère du dichromate sur la protéine D1 du PSII n'est observé chez la souche sauvage ou le mutant *npq1* lorsque ces algues sont exposées à une intensité lumineuse de 30 μE . Cependant, sous haute intensité lumineuse (320 μE) et 25 μM de dichromate, 95% de la dissipation d'énergie du PSII chez le mutant est sous forme non-photochimique. La photochimie du PSII diminue de plus de deux fois en comparaison avec l'échantillon témoin. Sous les mêmes conditions, une détérioration de la protéine D1 est observée chez le mutant et la souche sauvage. De plus, entre 85 et 90% de la dissipation d'énergie du PSI est sous forme non-photochimique chez les deux algues exposées à 25 μM de dichromate. Ces résultats obtenus avec le mutant *npq1* indiquent qu'il y a différents mécanismes de dissipation d'énergie qui ne dépendent pas du cycle des xanthophylles.

5.2 ABSTRACT

Energy dissipation via Photosystem II (PSII) and I (PSI) activities was investigated when wild type and xanthophyll deficient mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* was exposed to hexavalent chromium, dichromate, inhibitory effect. To determine simultaneous dichromate and light intensities (30 and 320 μE) effects on PSII and PSI functional properties, algal mutant *npq1*, lacking xanthophylls cycle, was exposed for 24h to 12.5 and 25 μM of dichromate concentration. To study PSII and PSI energy dissipation and PSII structural properties we used Dual-PAM-100 (Walz) fluorimeter and western blot analysis. No dichromate deteriorating effect on PSII D1 protein was found either in wild type or *npq1* mutant exposed to 30 μE light intensity. However, under high light intensity (320 μE) and 25 μM of dichromate, 95% of PSII energy dissipation via non-photochemical pathway in mutant missing xanthophylls cycle was detected. In PSII, photochemistry was decreased by more than two times comparing sample not being exposed to dichromate. Under the same conditions, dichromate deteriorating effect on D1 protein was found in both wild type and *npq1* mutant. However between 85 and 90% of PSI energy was dissipated via non-photochemical pathways in both algal species when exposed to 25 μM dichromate effect. This result obtained on *npq1* mutant indicated that there are different energy dissipation mechanisms which are not always dependant of xanthophyll cycle.

Keywords: dichromate, energy dissipation, xanthophyll cycle, *npq1*, heavy metals

5.3 INTRODUCTION

Photosystem II (PSII) electron transport is a sensitive inhibitory site for hexavalent chromium, dichromate, effect (Hörcsik *et al.*, 2007). Alteration of D1 protein and 33 kDa protein of oxygen evolving complex by dichromate gave evidences for inhibition site to be located on PSII oxidizing and reducing side (Ait Ali *et al.*, 2006). For such dichromate deteriorating effect we may suppose to be associated with PSII photoinhibition process as it has been already reported for cadmium and copper (Pätsikkä *et al.*, 2002; Pagliano *et al.*, 2006). Photoinhibition process is regulated by heat energy dissipation via xanthophylls cycle, process controlled by enzyme violaxanthin epoxidase, where violaxanthin is reversibly transformed into zeaxanthin via its intermediate antheraxanthin. Zeaxanthin may accept excitation energy directly from light harvesting antenna chlorophylls therefore resulting in non radiative thermal energy dissipation (Demmig-Adams *et al.*, 1996; Krause and Jahns, 2004). However zeaxanthin may react with protein of light-harvesting complex (LHC) inducing their conformation change which will also result in heat dissipation (Pospisil, 1997). For photosynthesis of higher plants and algae, it has been indicated to change remarkably the energy dissipation processes under different environmental conditions. This effect has been interpreted as result of PSII and PSI structural and functional changes during ecological adaptation (Serôdio *et al.*, 2005). Therefore, further understanding of this process affecting PSII and PSI functions may provide new informations on energy dissipation mechanism via other regulatory processes. In this report we used *Chlamydomonas reinhardtii* mutant *npq1*, having reduced non-photochemical quenching property (Niyogi *et al.*, 1997; Govindjee and Seufferheld, 2002), to investigate dichromate effect on PSII and PSI energy dissipation processes when algae are exposed to different light intensities.

5.4 MATERIALS AND METHODS

5.4.1 Algae culture

Chlamydomonas reinhardtii algal strains (wild type: CC-400, *npq1* mutant deficient in zeaxanthin: CC-4100) were obtained from the Chlamydomonas Genetic Center (Duke University, Durham, NC). Stock of algal cultures were cultivated under continuous illumination of 100 μ E in High Salt Medium (HSM) (Harris, 1989) and treated algal samples were exposed 24h to dichromate ($K_2Cr_2O_7$) : 0, 12.5 and 25 μ M. During dichromate treatment samples were placed under low (30 μ E) and high light intensity (320 μ E).

5.4.2 Western blot analysis

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting : Proteins of thylakoid membranes were separated by SDS-PAGE according to Laemmli (1970). The primary antibody used for Western blot analysis was against D1 (Agrisera). As secondary antibody, horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit (Amersham Biosciences) was used to detect the immuno-reactions.

5.4.3 Chlorophyll *a* fluorescence measurements

Chlorophyll fluorescence parameters were measured at room temperature with a dual-wavelength pulse-amplitude-modulated fluorescence monitoring system (Dual-PAM, Heinz Walz, Effeltrich, Germany) according to Schreiber *et al.* (1986). The PSII and PSI energy dissipation parameters were calculated as : the effective quantum yield of PSII, $Y(II) = (F_M' - F) / F_M'$; the quantum yield of non-regulated energy dissipation of PSII, $Y(NO) = 1 / (NPQ + 1 + qL (F_M / F_0 - 1))$, where non-photochemical quenching value was $NPQ = (F_M - F_M') / F_M'$; the parameters $qL = qP \times F_0' / F$ and $qP = (F_M' - F) / (F_M' - F_0')$ were used as indicators for fraction of open PSII reaction center participating in electron transport; the quantum yield of regulated energy dissipation of PSII was estimated as $Y(NPQ) = 1 - Y(II) - Y(NO)$; the

photochemical quantum yield of PSI was estimated as $Y(I)=1-Y(ND)-Y(NA)$.; the non photochemical quantum yield of PSI, the fraction of oxidized PSI $Y(ND)$ was estimated as $Y(ND) = 1-P700_{red}$, where $P700_{red}$ was the redox change of P700 obtained by the difference between the 875 nm and 830 nm transmittance. The non photochemical quantum yield of PSI which cannot be oxidized by a saturation pulse $Y(NA)$ was estimated as $Y(NA)= (Pm-Pm')/Pm$ where Pm and Pm' are the maximum change of P700 signal in dark and light adapted state respectively, according to Klughammer and Schreiber (2008).

5.5 RESULTS AND DISCUSSION

When both algal species were exposed to dichromate toxic effect under low light intensity (30 μE) the decrease of cell growth was very similar. However, under high light intensity (320 μE) growth of algal mutant not having xanthophylls cycle (*npq1*) was more inhibited compared to wild type (results not shown). In this study we examined the effect of light intensity on PSII structural and functional behavior when two algal genotypes have been exposed to dichromate. We found that dichromate concentrations of 12.5 and 25 μM induced D1 protein deterioration in a similar way for wild-type of *C. reinhardtii* (CC-400) and for *npq1* mutant deficient in xanthophyll cycle when they have been exposed to 320 μE during 24 hours. However, dichromate deteriorating effect on D1 protein was not found when the same algal genotypes were exposed to low light intensity (30 μE) (Figure 1). Similar effect was reported earlier when higher plant (*Lemna gibba*) was exposed to dichromate effect (Ait Ali *et al.*, 2006). When exposed to variation of light intensity photosynthetic organisms are known to have different regulatory mechanisms of energy dissipation which allow the photosynthetic apparatus to cope efficiently with changes of light intensity. When PSII electron transport in algae was inhibited by dichromate, it is important to find out how different pathways of energy dissipation compete with each others and provide different regulatory mechanisms when light intensity was changed. Under low light intensity (30 μE) PSII energy dissipation in both algal genotypes was regulated mostly concomitantly by electron transport and by non-regulated non-photochemical pathways. However, when algal genotypes were exposed to 25 μM of dichromate, non-photochemical

quenching effect appeared to be present. The energy dissipation via PSII photochemistry was decreased from 60 to 40% in algae missing xanthophyll cycle (Figure 2). Both genotypes showed similar pathway of energy dissipation via PSII when exposed to high light intensity. However, when algae were exposed to dichromate, dissipation of energy via PSII in *npq1* mutant was evidently changed. In this algal mutant, energy dissipation via PSII photochemistry was reduced for more than two times and most of energy was dissipated via non regulated non photochemical pathway (65%). However, under the same condition (light intensity of 320 μ E and 25 μ M of dichromate) no change was noticed in wild type algae.

By using advantage of Dual-PAM (Walz), we found for energy dissipation via PSI in mutant *npq1* to be more affected by dichromate even under low light intensity. Under low light intensity, energy dissipation via PSI photochemistry was decreased from 93% to 58% by dichromate effect, while in these conditions 22% was dissipated via non photochemical pathway caused by the limitation of donor side to PSI. We may interpret that PSI oxidized form efficiently dissipates energy via heat when electron transport from PSII toward PSI was decreased by dichromate effect. However, under high light intensity, in mutant *npq1* affected by dichromate, energy dissipation via PSI non photochemical (Y(NA) + Y(ND)) pathway reached 84%, while dissipation via PSI photochemistry was decreased by half. Such changes in wild type were also found (Figure 2). In conclusion, this study showed for energy dissipation via PSII photochemistry to be more affected by dichromate in mutant missing xanthophylls cycle when exposed to low light intensity. However, energy dissipation via PSII and PSI photochemistry was similarly affected by dichromate in both wild type and *npq1* mutant at high light intensity. It appeared that dissipation of energy via PSI was highly dependant to PSII activity. However, this result obtained on *npq1* mutant indicated that there are different energy dissipation mechanisms which are not always depend to xanthophylls cycle.

5.6 REFERENCES

- Ait Ali, N., D. Dewez, O. Didur and R. Popovic. 2006. "Inhibition of photosystem II photochemistry by Cr is caused by the alteration of D1 protein and oxygen evolving complex". *Photosynthesis Research*, vol. 89, p. 81-87.
- Demmig-Adams, B., A. M. Gilmore and W. W. III Adams. 1996. "In vivo functions of carotenoids in higher plants". *FASEB Journal*, vol. 10, p. 403-412.
- Govindjee, and M. Seufferheld. 2002. "Non-photochemical quenching of chlorophyll a fluorescence : early history and characterization of two xanthophylls-cycle mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*". *Functional Plant Biology*, vol. 29, p. 1141-1155.
- Harris, E. H. 1989. "The *Chlamydomonas* Sourcebook: A comprehensive guide to biology and laboratory use". San Diego, CA, Academic Press, 780 p.
- Hörceik, Z. T., L. Kovacs, R. Laposi, I. Meszaros, G. Lakatos and G. Garab. 2007. "Effect of chromium on photosystem 2 in the unicellular green alga, *Chlorella pyrenoidosa*". *Photosynthetica*, vol. 45, p. 65-69.
- Klughammer, C., et U. Schreiber. 2008. "Saturation Pulse method for assessment of energy conversion in PS I". *PAM Application Notes*, vol. 1, p. 11-14.
- Krause, G.H., and P. Jahns. 2004. "Non-photochemical energy dissipation determined by chlorophyll fluorescence quenching : characterization and function". In *Chlorophyll a fluorescence : a signature of photosynthesis*, Editors, G. C. Papageorgious and Govindjee, pp 463-495. Springer, The Netherlands.
- Laemmli, U. K. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature*, vol. 227, p. 680-685.
- Mallick, N., and F. H. Mohn. 2003. "Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*". *Ecotoxicological and Environmental Safety*, vol. 55, p. 64-69.
- Niyogi, K. K. , O. Bjorkman and A. R. Grossman. 1997. "*Chlamydomonas* xanthophylls cycle mutants identified by video imaging of chlorophyll fluorescence quenching". *The Plant Cell*, vol. 8, p. 1369-1380.
- Pagliano, C., M. Raviolo, F. D. Vecchia, R. Gabbrielli, C. Gonnelli, N. Rascio, R. Barbato and N. La Rocca. 2006. "Evidence for PSII donor-side damage and photoinhibition induced by cadmium treatment on rice (*Oryza sativa* L.)". *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, vol. 84, p. 70-78.

- Pätsikkä, E., M. Kairavuo, F. Sersen, E. M. Aro and E. Tyystjarvi. 2002. "Excess copper predispose photosystem II to photoinhibition in vitro by out competing iron and causing decrease in leaf chlorophyll". *Plant Physiology*, vol. 129, p. 1359-1367.
- Pospisil, P. 1997. "Mechanisms of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching in higher plants". *Photosynthetica*, vol. 34, p. 343-355.
- Serôdio, J., S. Cruz, S. Vieira and V. Brotas. 2005. "Non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence and operation of the xanthophyll cycle in estuarine microphytobenthos". *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, vol. 326, p. 157-169.
- Schreiber, U., U. Schliwa and W. Bilger. 1986. "Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer". *Photosynthesis Research*, vol. 10, p. 51-62.

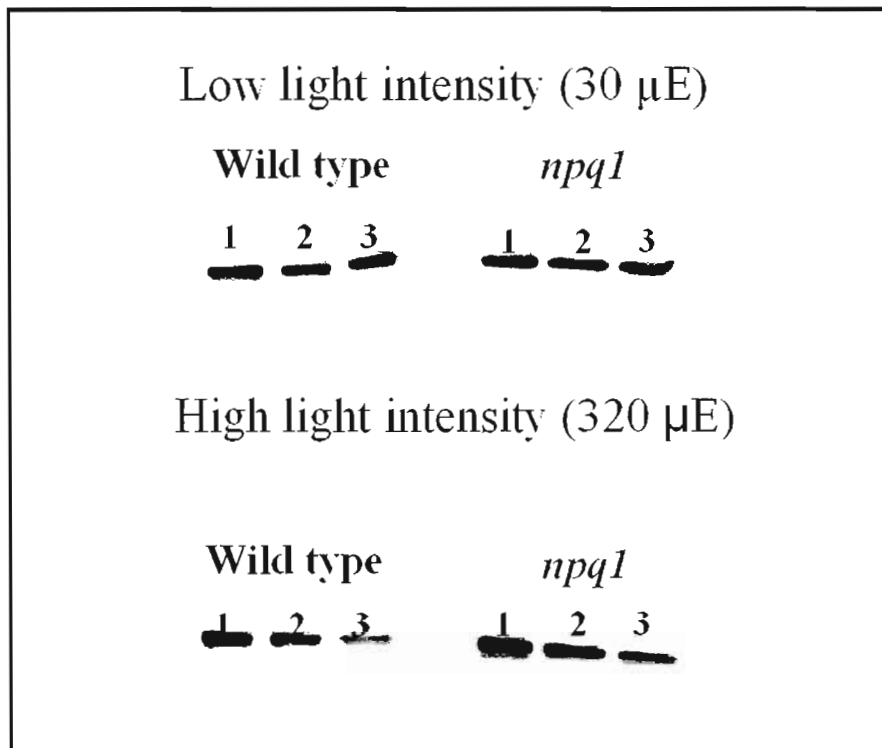


Figure 5.1 : Protein gel blots analysis of thylakoid membranes isolated from *C. reinhardtii* wild type and mutant after being exposed to Cr(VI) during 24h. Proteins were detected by using specific antibodies raised against D1 protein. Numbers represent: 1 control (-Cr); 2: 12.3 and 3: 25 μ M Cr(VI).

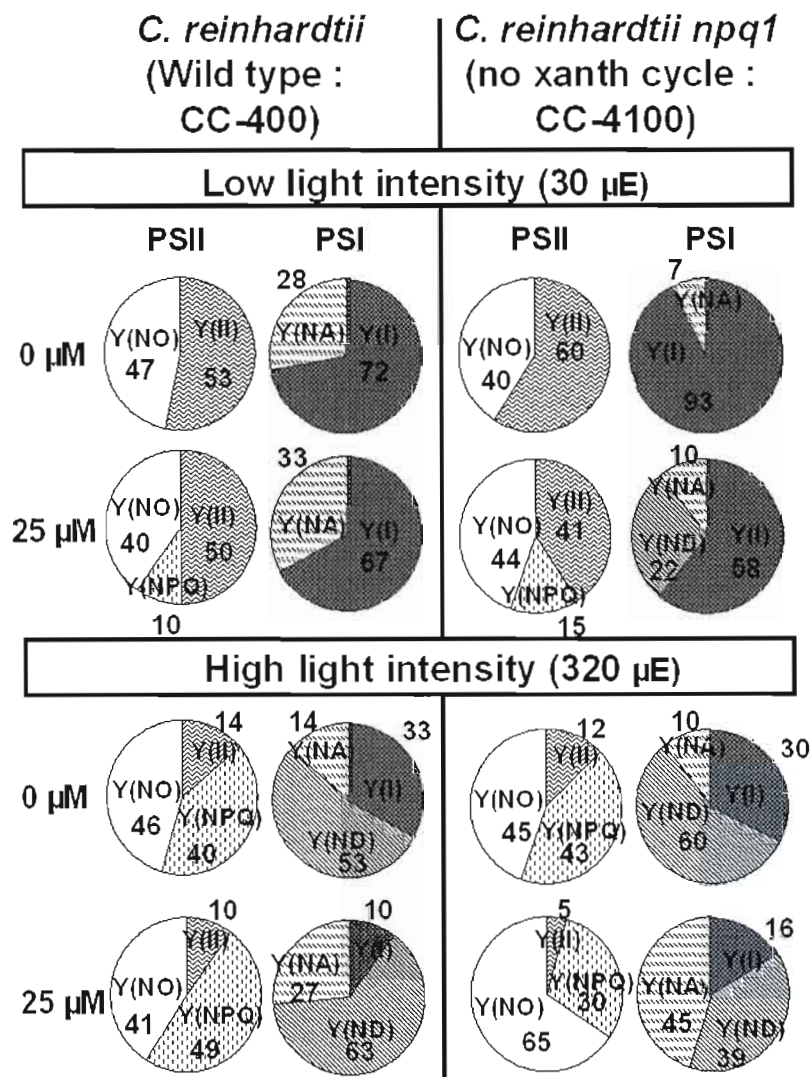


Figure 5.2 : The change of the effective quantum yield of PSII (Y(II)) and PSI ((Y(I)), the non photochemical energy dissipation pathways via regulatory Y(NPQ) and non regulatory processes Y(NO) of PSII. Quantum yield of non photochemical energy dissipation of PSI in oxidized state Y(ND) and in reduced state Y(NA)) when *C. reinhardtii* genotypes were exposed 24h to chromium at different light intensities. Numbers represent percent of total measured energy dissipation.

CHAPITRE VI

EFFECTS OF ALUMINIUM ON CELLULAR DIVISION AND PHOTOSYNTHETIC ENERGY DISSIPATION IN EUGLENA GRACILIS AND CHLAMYDOMONAS ACIDOPHILA

Amirou Diallo¹, François Perreault², David Dewez^{2†}, Claude Fortin³, Philippe Juneau⁴ and Radovan Popovic^{2*}

¹ Department of Biodiversité et Aménagement du territoire, CERE, University of Conakry, Guinea. ² Department of Chemistry, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-Ville, Montreal, QC, H3C 3P8 Canada

³ INRS-Eau, Terre et Environnement, Université du Québec, 490 rue de la Couronne, Québec, QC, G1K 9A9 Canada

⁴ Department of Biological Sciences-TOXEN, Canadian Research Chair on Ecotoxicology of Aquatic Microorganisms, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-Ville, Montréal, QC, H3C 3P8 Canada

[†] Present address: Department of Plant and Microbial Biology, University of California, Berkeley, 111 Koshland Hall, Berkeley, CA, USA, 94720-3102.

* Corresponding author

To be submitted to *Environmental Toxicology and Chemistry*

Contribution dans ce chapitre : Dans ce chapitre, j'ai été le principal contributeur dans la prise des résultats expérimentaux et la rédaction de la première version du manuscrit. A. Diallo et D. Dewez ont établi les idées de recherche et le plan d'expérience. C. Fortin, P. Juneau et R. Popovic ont contribué à la rédaction de la version finale du manuscrit.

6.1 RÉSUMÉ

Les effets de l'aluminium sur l'activité du photosystème II chez les algues *Euglena gracilis* et *Chlamydomonas acidophila* ont été investigués. L'étude des effets de l'aluminium a été faite en milieu acide (pH 3,0) afin d'obtenir l'aluminium sous sa forme ionique libre. Le calcul de la spéciation chimique de l'aluminium a indiqué que l'aluminium était présent sous les formes Al^{3+} , $AlSO_4^+$ et $Al(SO_4)^{2-}$. Dans cette étude, la densité cellulaire, le poids sec et la quantité de chlorophylle par cellule sont utilisés comme indicateurs de la production de biomasse et de la croissance cellulaire. En utilisant les fluorimètres PAM et PEA, nous avons déterminés les effets de l'aluminium sur le transport d'électrons via le photosystème II. Nous avons déterminé que l'aluminium stimule la division cellulaire mais diminue la synthèse de matière sèche et la quantité de chlorophylle par cellule. Les rendements photochimiques maximal (F_v/F_m) et opérationnel (F_v'/F_m') du photosystème II ont été moins affectés chez *C. acidophila*, résistante aux effets des métaux, que chez *E. gracilis*. Cette diminution s'est manifestée par une diminution du nombre de centres réactionnels actifs du PSII chez *E. gracilis* et suivie d'une augmentation de la quantité d'antennes collectrices de lumière par centre réactionnel. Nous avons conclu que l'inactivation des centres réactionnels du PSII augmente la dissipation d'énergie sous forme de chaleur et diminue la capacité des PSII-PSI pour le transport d'électrons et la formation de gradient de protons. Cette inhibition va entraîner une diminution de la production d'ATP et de NADPH menant à une diminution de la production de biomasse chez les algues sensibles à l'aluminium. Ces résultats peuvent contribuer à expliquer les effets de l'aluminium à changer la structure des communautés algales lorsqu'il est disponible sous forme d'ion libre.

6.2 ABSTRACT

The effects of aluminium on the activity of photosystem II in microalgae were evaluated. Investigation was done in acidic medium (pH 3.0) to provide aluminium in a free ion form. Aluminium speciation calculation indicated that aluminium was present as Al^{3+} , AlSO_4^+ et $\text{Al}(\text{SO}_4)^{2-}$. In this study, cell density, dry weight and chlorophyll content per cell were used as indicators of biomass production and cellular growth. By using Pulse-Amplitude Modulated fluorescence and rapid rise of fluorescence measurements, we determined the effects of aluminium on electron transport via Photosystem II. We determined that aluminium stimulates cell division but decreases dry weight synthesis and chlorophyll content per cell. Photosystem II maximal (F_v/F_m) and operational (F_v'/F_m') quantum yield were less affected in *C. acidophila*, resistant to heavy metals effects, then *E. gracilis*. This decrease was associated with a decrease of active photosystem II reaction centers in *E. gracilis* and in an increase of the light harvesting antenna size per reaction center. We concluded that the inactivation of PSII reaction center increases energy dissipation as heat and decreases the capacity of Photosystem II and I for electron transport and proton gradient formation. This inhibition will decrease ATP and NADPH production resulting in a decrease of cellular biomass production in algae sensitive to aluminium. These results can contribute to explain the effects of aluminium to change the structure of algal community when this metal is available as a free ion.

Keywords : Photosystem II; aluminium toxicity; *Euglena gracilis*; *Chlamydomonas acidophila*; PAM fluorometry; Plant Efficiency Analyser; biomass production

6.3 INTRODUCTION

Acid rain may result in acidification of aquatic environments and an increase of the soluble metal content in this ecosystem (Singh and Agrawal, 2008). It has been shown that such acidic environments may be rich in soluble forms of aluminium (Al) (Harvey *et al.*, 1981 ; Wigington *et al.*, 1996 ; Samecka-Cymerman and Kempers, 2001). Al solubility in aquatic environment is known to be dependent of pH; at neutral pH Al is mostly present as insoluble complexes, which are less bioavailable to aquatic organisms (Driscoll and Schecher, 1990). Therefore, Al toxicity is more pronounced in aquatic environment with lower pH (below 5.0) as Al becomes more soluble and as the activity of the Al^{3+} ion increases (Rai *et al.*, 1998 ; Ali, 2004). However, as pH decreases, competition between H^+ and Al^{3+} ions for binding sites on the cell surface may reduce toxicity of this metal (Parent and Campbell, 1994). At low pH, for some algal species, Al was found to be toxic while others demonstrated tolerance to such effect (Claesson and Tornqvist, 1988 ; Gimmler *et al.*, 1991) and, under some conditions, Al was found to stimulate algal growth (Greger *et al.*, 1992).

The presence of Al in aquatic environment may influence algal physiological functions as noticed for photosynthesis. For example, photosynthetic electron transport was found to be a sensitive target of Al for different algal species (Greger *et al.*, 1992 ; Rai *et al.*, 1996 ; Rai *et al.*, 1998 ; Danilov and Ekelund, 2002). However, Al inhibition of photosynthetic electron transport is still not yet understood, although it is known to reduce the rate of electron transport in both PSII and PSI (Rai *et al.*, 1998). Metal inhibitory sites have been indicated to be associated with interactions either with oxygen evolving complex or with electron carriers on the reducing side of PSII, Q_B binding protein (Bertrand and Poirier, 2005). Consequently to this inhibition, reduction of energy dissipation via PSII electron transport induced by metals will increase sensitivity to photoinhibition (Pätsikkä *et al.*, 2002). Under such inhibition, non-photochemical energy dissipation processes may provide alternative pathways to cope with excess of light energy absorbed by light harvesting complex (LHC) (Nielsen *et al.*, 2003 ; Ait Ali *et al.*, 2008). To date, we do not know how Al effect on PSII may alter energy dissipation in photosynthesis. The answer to this question

may explain the tolerance of some algal species to Al as a contaminant in aquatic ecosystem. When exposed to aluminium effect, contribution of individual algal species to total biomass growth may be changed. Therefore, understanding of this effect requires the investigation of Al effect on photosynthetic processes as the most important input for energy storage for biomass growth.

In this study, we used two algal species, *Chlamydomonas acidophila* and *Euglena gracilis*, having different levels of tolerance to metals, to investigate dependency between energy dissipation processes in photosynthesis and tolerance to Al³⁺ toxicity effect.

6.4 MATERIALS AND METHODS

6.4.1 Algae culture

Algal cultures of *Chlamydomonas acidophila* (UTCC 121) and *Euglena gracilis* (UTCC 95), tolerant to low pH (3.0), were used in this study. Algal species were obtained from University of Toronto Culture Collection (UTCC, Canada) and cultivated in a batch culture of 1 L in Modified Acid Medium according to Olaveson *et al.* (1989) under continuous illumination ($100 \pm 5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) provided by white fluorescent lamps (Sylvania @ GroLux F 36 W) at 25 ± 1 °C. Cultures were permanently aerated to maintain a constant CO₂ concentration in the growth medium. When the algal culture was in the exponential phase of growth, samples equivalents to 12.5 µg of total chlorophyll were used for Al exposures.

6.4.2 Aluminium treatment

The stock solution (0.25 mM) of Al was made with Al₂(SO₄)₃•18 H₂O (Fisher) dissolved in nanopure water. The exposure medium was similar to the growth medium with the exception that EDTA was omitted, while potassium and trace metals concentration were reduced by 50% to minimize metal competition with Al for surface binding sites. Initial chlorophyll concentration in all treatments was 0.25 µg/mL in a final volume of 50 mL,

where the pH was adjusted to 3.0 by addition of diluted H₂SO₄ or NaOH. It is important to mention that at this pH, growth of both species has been shown to be in the optimal range (Olaveson and Nalewajko, 2000 ; Gerloff-Elias *et al.*, 2006). Al speciation in the treatment medium was calculated by using the MINEQL+ v 4.5 software. Under these conditions, Al³⁺ free ion represented 27% of the total dissolved Al while AlSO₄⁺ and Al(SO₄)₂⁻ contributed 45 and 24% respectively (Table 1). Algal samples were exposed to 100 ± 7, 188 ± 6 and 740 ± 130 µM of Al for 24 hours, with samples where no Al was added as a control (measured Al concentration below detection limit (< 0.08 µM)). The pH of the culture was adjusted before addition of Al to avoid formation of insoluble Al complex. During Al exposure, samples were placed on an orbital shaker where light intensity and temperature conditions were the same as those used for growth culture.

6.4.3 Cellular density, dry weight, chlorophyll and aluminium content

After 24h of exposure, algal cells were filtered on a #1 Whatman filter papers and dried at 90°C during 24h for dry weight measurements and on cellulose nitrate membranes for the intracellular Al content. Cellular density was measured by using a flux cytometer (FacScan, Becton Dickinson Instruments) according to Franqueira *et al.* (2000). Total chlorophyll extraction from treated algal samples was done in 100% methanol at 65 °C and quantitative determination was done by measure of absorption of pigment extract at 652.4 and 665.2 nm, according to Lichtenthaler (1987).

At the end of the exposure period, algal cells were also harvested to determine the intracellular Al content by filtration on cellulose nitrate membranes. Al adsorbed to the surface of the cells was removed by rinsing three times with 10 mL of growth medium supplemented with EDTA (1 mM). Operationally defined intracellular Al was determined by mineralisation with concentrated HNO₃ and hydrogen peroxide at room temperature. After 24 hours, the solution was diluted to reach 6% HNO₃ and samples were analyzed for total Al by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES, Vista AX, Varian). Uptake values were normalized per unit mass (µg Al / mg algal dry weight).

6.4.4 Chlorophyll *a* fluorescence measurements

Prior to fluorescence measurements, treated algal samples were dark-adapted for 30 minutes to obtain oxidized steady state of PSII. Algal cells (5 μg of total chlorophyll) were placed on 13 mm glass fiber filter (Millipore #AP20 01300) by using low pressure filtration unit to form a humidified uniform layer of algal cells. Such application did not induce physiological stress of algal cells as we found by fluorescence measurements (no change of F_v/F_m , data not shown).

Rapid, polyphasic rise of chlorophyll *a* fluorescence was measured with a Plant Efficiency Analyser fluorimeter (PEA, Hansatech Ltd, UK). Under those conditions, maximum variable fluorescence yield P was obtained by application of a 2 sec saturating flash ($2500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). The rapid rise of fluorescence was measured according to Strasser *et al.* (2004), where fluorescence yield at 50 μs was considered to be F_0 value, noted as $F_{50\mu\text{s}}$; the maximum fluorescence yield P was considered as the maximal value of fluorescence yield under saturating illumination. The variable fluorescence yields for J and I transients were determined by 2 ($F_{2\text{ms}}$) and 30 ms ($F_{30\text{ms}}$), respectively. The ratio of total antenna size per active reaction center was $\text{ABS/RC} = ((M_0/V_j)/(F_v/F_M))$, where $M_0 = (4 \times (F_{300\mu\text{s}} - F_{50\mu\text{s}}) / (F_M - F_{50\mu\text{s}}))$ and $V_j = ((F_{2\text{ms}} - F_{50\mu\text{s}}) / (F_M - F_{50\mu\text{s}}))$, according to Strasser *et al.* (2004).

Modulated Chl *a* fluorescence kinetics was analyzed by using Pulse Amplitude Modulated fluorescence technique (PAM, FMS/2S, Hansatech Ltd.) according to (Rohacek and Bartak, 1999): The fluorescence F_0 is measured by using a modulated light (ML) with a low intensity ($1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) to avoid the reduction of the PSII primary electron acceptor, Q_A . In these conditions, fluorescence originates mainly from light-harvesting antennas of PSII. The maximal fluorescence yield F_M was induced by a short saturating pulse (SP) of white light ($2000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 0.7 s duration) which triggered the reduction of all Q_A . The value of F_s , representing the steady state fluorescence yield of variable fluorescence under actinic light (AL; $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), was used to evaluate PSII not participating in electron transport (Rohacek and Bartak, 1999). The maximal fluorescence yield F'_M was determined by application of a SP at steady-state of fluorescence when algal cells were exposed to

continuous illumination. At the steady state of electron transport AL is turned off and a far-red light (FR) is applied to ensure maximal oxidation of all PSII primary electron acceptor Q_A . Therefore, fluorescence F'_O obtained under this condition represents the fluorescence yield of light-harvesting antennas when most PSII reaction centers are in open state. The maximal PSII quantum yield, indicating efficiency of light energy transfer to primary acceptor Q_A , was the ratio $\Phi_{MII} = (F_M - F_O)/F_M$ according to (Bolh ar-Nordenkampf *et al.*, 1989). According to (Genty *et al.*, 1989), at steady state of fluorescence yield (12 min under continuous actinic light), the operational quantum yield was determined as $\Phi'_{MII} = (F'_M - F_S)/F'_M$, while the photochemical quenching value was evaluated as $Q_P = (F'_M - F_S)/(F'_M - F'_O)$ representing the proportion of light excitation energy converted to photochemical act by the active PSII reaction centers (Schreiber *et al.*, 1986). According to Van Kooten and Snel (1990), the fluorescence quenching not related to photochemistry of PSII was measured as $Q_N = 1 - ((F'_M - F'_O)/(F_M - F_O))$.

6.4.5 Data analysis and statistics

The experiments were done in three replicates for all treatments. Means and standard deviations were estimated for each treatment. Significant differences between control samples and Al exposed algal samples were determined by ANOVA where p value less than 0.05 was considered to be significant.

6.5 RESULTS AND DISCUSSION

We investigated *E. gracilis* and *C. acidophila* intracellular uptake properties for Al when they have been exposed during 24h to 100, 188 and 740 μM of measured Al concentration. When algal cultures were exposed to 100 and 188 μM of Al, we found that intracellular contents of aluminium for both species were less than 1 μg of Al per mg of dry weight and was never significantly different than control samples ($p > 0.05$). However, when both species were exposed to 740 μM , uptake of Al increased by two orders of magnitude. This large increase may have been caused by the adherence of polymeric Al complexes on

the cell wall or plasma membrane or even on the filter membrane that would not have been removed by the EDTA wash. *C. acidophila* had significantly lower Al content per dry weight of biomass unit compared to *E. gracilis*.

We showed for Al to stimulate cellular division of both species, since cellular density (cell/mL) after treatment with 740 μ M Al was increased by 300 and 240 % for *E. gracilis* and *C. acidophila*, respectively (table 2). Such increase of cellular division was also observed earlier in the green alga *Scenedesmus obtusiusculus* exposed to Al (Greger *et al.*, 1992). However, we found that cellular division was not correlated with cellular dry weight. It appeared that, after Al exposure, cellular synthetic processes were affected because dry weight per cell was decreased by 50% (Table 2: 740 μ M). In earlier studies, a decrease of ATP cellular content and ATP synthesis in algae exposed to Al as been reported (Husaini *et al.*, 1996, Rai *et al.*, 1998). Such decrease of ATP content by Al may decrease energy storage available for biosynthetic processes. Photosynthesis as a one primary cellular productive process appeared to be affected by high Al concentration since chlorophyll content per cell was decreased by 65 and 50%, for *E. gracilis* and *C. acidophila*, respectively. It is evident that chlorophyll amount determine the capacity of the photosynthetic light harvesting complex (Owens, 1996) responsible for photosynthetic efficiency and consequently cellular synthesis processes. Therefore, by decrease of both dry weight and chlorophyll content per cell, we may expect Al to induce a change of photosynthetic activity. Indeed, we found for PSII primary photochemistry to be decreased by Al in both *E. gracilis* and *C. acidophila* (Table 3). However, primary processes of photosynthesis in *E. gracilis* appeared to be more affected by Al compared to *C. acidophila*, since PSII electron transport dependent to plastoquinone (PQ) reduction (fluorescence yield at P transient) was decreased by 50% in *E. gracilis*, while in *C. acidophila* by 20% when exposed to 740 μ M Al. Moreover, in *C. acidophila*, no differences were found between exposures of 100 and 740 μ M Al, which indicates resistance to such inhibitory effect (Figure 2). We found for Al to have no altering effects on kinetics of O-J-I-P fluorescence transients regardless of change in maximal fluorescence yield. Similar variable fluorescence quenching effects were found for copper and mercury, causing damage of water-splitting system (Samson and Popovic, 1988 ; Dewez *et al.*, 2005). This may indicates for Al to induce inactivation of some PSII reaction centers

and consequently diminish total PSII electron transport capacity toward PSI. In an earlier report, using reconstituted photosynthetic electron transport in chloroplasts of *Chlorella vulgaris*, it has been shown for aluminium to alter PSII-PSI electron transport (Rai *et al.*, 1998).

To evaluate Al effect on PSII photosynthetic electron transport and its dependant energy dissipation processes, we investigated the change of different PSII fluorescence parameters in the presence of Al. Comparing these parameters for *E. gracilis* and *C. acidophila* may indicate the level of susceptibility or resistance to Al. Maximal PSII quantum yield, Φ_{MII} , of *E. gracilis* was decreased from 0.66 to 0.25 while for *C. acidophila* the decrease was only from 0.70 to 0.62. However, drastic changes of PSII operational quantum yield, Φ'_{MII} , was found to decrease in *E. gracilis* from 0.27 to 0.07 and in *C. acidophila* from 0.62 to 0.48. These changes demonstrated that *C. acidophila* has some resistance to Al with regards to the PSII functional capacity. At this point, we do not have an adequate explanation why *C. acidophila* was more resistant even when aluminium cellular content was very high (see Figure 1). *C. acidophila* is known to demonstrate resistance to the effects of different metals such as cadmium, cobalt, copper and zinc on growth (Nishikawa and Tominaga, 2001). However, resistance to Al was not yet investigated by consideration of this effect on primary photosynthetic processes.

In this study, photosynthetic energy storage by PSII electron transport, indicated by photochemical quenching value (Q_P), showed also strong Al inhibitory effect on *E. gracilis* if compared to *C. acidophila*, since Q_P was decreased from 0.55 to 0.21 and from 0.74 to 0.61, respectively. However, energy not used for PSII electron transport, shown here by non-photochemical quenching (Q_N) effect, was increased rapidly when *E. gracilis* was exposed to Al in comparison with *C. acidophila* (see Table 3). While Al may induce inactivation of some PSII reaction centers therefore light-harvesting complex of antenna available per reaction center, ABS/RC, should consequently increase. Indeed, this increase was for *E. gracilis* from 5.05 to 8.42 while in *C. acidophila* the change was only from 1.06 to 1.39 (Table 3). Therefore, the Al resistant alga, *C. acidophila*, was found to demonstrate small changes of energy dissipation via non-photochemical pathway, since inactivation of PSII

reaction center by Al was not so evident, as shown by the ABS/RC ratio. Nevertheless, the change of those fluorescence parameters gives strong evidence for Al to affect photosynthetic activity differently in algal species. Inactivation of PSII reaction center and increase of energy dissipation via non-photochemical pathways (heat) will reduce total PSII reaction centers capacity to contribute in PSII-PSI electron transport activity and formation of proton gradient; therefore, consequently this will decrease ATP and NADPH formation. Such alteration may lead to reduce cellular biomass production in Al sensitive algae compared to Al resistant species. This further may explain the possible effect of Al in changing structural community of algae when this metal is available as an active ion (Havens and Heath, 1990 ; Kinross *et al.*, 2000).

6.6 ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the Natural Science and Engineering Council of Canada (NSERC) through Grant GP0093404 awarded to R. Popovic and Canadian International Development Agency (CIDA) fundings for A. Diallo. The authors thanks Michel Lavoie (INRS-ETE) for ICP-MS analysis of aluminium.

6.7 REFERENCES

- Ait Ali, N., P. Juneau, O. Didur, F. Perreault and R. Popovic. 2008. "Effect of dichromate on photosystem II activity in xanthophyll-deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*". *Photosynthesis Research*, vol. 95, p. 45-53.
- Ali, G. 2004. "Fluoride and aluminium tolerance in planktonic microalgae". *Fluoride*, vol. 37, p. 88-95.
- Bertrand, M., and I. Poirier. 2005. "Photosynthetic organisms and excess of metals". *Photosynthetica*, vol. 43, p. 345-353.
- Bolh ar-Nordenkampf, H. R., S. P. Long, N. R. Baker, G. Oquist, U. Schreiber and E. G. Lechner. 1989. "Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation". *Functional Ecology*, vol. 3, p. 497-514.

- Claesson, A., and L. Tornqvist. 1988. "The toxicity of aluminium to two acido-tolerant green algae". *Water Research*, vol. 22, p. 977-983.
- Danilov, R. A., and N. G. A. Ekelund. 2002. "Effects of short-term and long-term aluminium stress on photosynthesis, respiration, and reproductive capacity in a unicellular green flagellate (*Euglena gracilis*)". *Acta Hydrochimica and Hydrobiologia*, vol. 30, p. 190-196.
- Dewez, D., L. Geoffroy, G. Vernet and R. Popovic. 2005. "Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*". *Aquatic Toxicology*, vol. 74, p. 150-159.
- Driscoll, C.T., and W. D. Schecher. 1990. "The chemistry of aluminum in the environment". *Environmental Geochemistry and Health*, vol. 12, p. 28-49.
- Franqueira, D., M. Orosa, E. Torres, C. Herrero and A. Cid. 2000. "Potential use of flow cytometry in toxicity studies with microalgae". *Science of the Total Environment*, vol. 247, p. 119-126.
- Genty, B., J. M. Briantais and N. R. Baker. 1989. "The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence". *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 990, p. 87-92.
- Gerloff-Elias, A., E. Spijkerman and R. Proschold. 2005. "Effect of external pH on the growth, photosynthesis and photosynthetic electron transport of *Chlamydomonas acidophila* Negoro, isolated from and extremely acidic lake (pH 2.6)". *Plant, Cell and Environment*, vol. 28, p. 1218-1229.
- Gimmler, H., B. Treffny, M. Kowalski, U. Zimmermann. 1991. "The resistance of *Dunaliella acidophila* against heavy metals : The importance of the Zeta Potential". *Journal of Plant Physiology*, vol. 138, p. 708-716.
- Greger M., J. E. Tillber and M. Johansson. 1992. "Aluminium effects on *Scenedesmus obtusiusculus* with different phosphorus status. II. Growth, photosynthesis and pH". *Physiologia Plantarum*, vol. 84 p. 202-208.
- Havens, K. E. and Heath, R. T. 1990. "Phytoplankton successing during acidification with and without increasing aluminium levels". *Environmental Pollution*, vol. 68, p. 129-145.
- Husaini, Y., L. C. Rai and N. Mallick. 1996. "Impact of aluminium, fluoride and fluoroaluminate complex on ATPase activity of *Nostoc linckia* and *Chlorella vulgaris*". *Biometals*, vol. 9, p. 277-283.

- Kinross, J. H., P. A. Read and N. Christofi. 2000. "The influence of pH and aluminium on the growth of filamentous algae in artificial streams". *Archives fur Hydrobiologia*, vol. 149, p. 67-86.
- Lichtenthaler, H. K. 1987. "Chlorophylls and caretonoids : pigments of photosynthetic biomembranes". In *Methods in enzymology*, Vol 148, Editors, L. Packer and R. Douce, p 350-382. Academic Press, London.
- Harvey, H. H., R.C. Pierce, P. J. Dillon, J. P. Kramer and D. M. Whelpdale. 1981. "Acidification in the Canadian Aquatic Environment". Publ. NRCC No. 18475 of the Environment Secretariat, National Research Council, Canada.
- Nielsen, H., C. Brownlee, S. M. Coelho and M. T. Brown. 2003. "Inter-population differences in inherited copper tolerance involve photosynthetic adaptation and exclusion mechanisms in *Fucus serratus*". *New Phytologist*, vol. 160, p. 157-165.
- Nishikawa, K., and N. Tominaga. 2001. "Isolation, growth, ultrastructure, and metal tolerance of the green alga, *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta)". *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, vol. 65, p. 2650-2656.
- Olaveson, M. M., and P. M. Stokes. 1989. "Responses of the acidophilic alga *Euglena mutabilis* (Euglenophyceae) to carbon enrichment at pH 3". *Journal of Phycology*, vol. 25, p. 529-539.
- Olaveson, M. M., and C. Nalewajko. 2000. "Effects of acidity on the growth of two *Euglena* species". *Hydrobiologia*, vol. 433, p. 39-56.
- Owens, T. G. 1996. "Processing of excitation energy by antenna pigments". In *Photosynthesis and the environment*. Editor, N. R. Baker NR, p. 1-23. Kluwer Academic, The Netherlands.
- Parent, L., and P. G. C. Campbell. 1994. "Aluminum bioavailability to the green alga *Chlorella pyrenoidosa* in acidified synthetic soft water". *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 13, p. 587-598.
- Pätsikkä, E., M. Kairavuo, F. Sersen, E. M. Aro and E. Tyystjarvi. 2002. "Excess copper predispose photosystem II to photoinhibition in vitro by out competing iron and causing decrease in leaf chlorophyll". *Plant Physiology*, vol. 129, p. 1359-1367.
- Rai, L. C., Y. Husaini and N. Mallick. 1996. "Physiological and biochemical responses of *Nostoc linckia* to combined effects of aluminium, fluoride and acidification". *Environmental and Experimental Botany*, vol. 36, p. 1-12.
- Rai, L. C., Y. Husaini and N. Mallick. 1998. "pH-altered interaction of aluminium and fluoride on nutrient uptake, photosynthesis and other variables of *Chlorella vulgaris*". *Aquatic Toxicology*, vol. 42, p. 67-84.

- Rohacek, K. and M. Bartak. 1999. "Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications". *Photosynthetica*, vol. 37, p. 339-363.
- Samecka-Cymerman, A., and A. J. Kempers. 2001. "Concentrations of heavy metals and plant nutrients in water, sediments and aquatic macrophytes of anthropogenic lakes (former open cut brown coal mines) differing in stage of acidification". *Science of the Total Environment*, vol. 281, p. 87-98.
- Samson, G., and R. Popovic. 1988. "Use of algal fluorescence for determination of phytotoxicity of heavy metals and pesticides as environmental pollutants". *Ecotoxicological and Environmental Safety*, vol. 16, p. 272-278.
- Schecher, W. D. 1998. "MINEQL+: Version 4.5", Environmental Research Software. Hallowell, ME, USA.
- Schreiber, U., U. Schliwa and W. Bilger. 1986. "Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer". *Photosynthesis Research*, vol. 10, p. 51-62.
- Singh, A., and M. Agrawal. 2008. "Acid rain and its ecological consequences". *Journal of Environmental Biology*, vol. 29, p. 15-24.
- Strasser, R.J., A. Srivastava et M. Tsimilli-Michael. 2004. "Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient". In *Chlorophyll Fluorescence a Signature of Photosynthesis, Advances in Photosynthesis and respiration*. Editors G. Papageorgiou, Govindjee. vol. 19, pp. 321-362. The Netherlands : Kluwer Academic Publishers.
- Van Kooten, O., and J. F. H. Snel. 1990. "The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology". *Photosynthesis Research*, vol. 25, p. 147-150.
- Wigington Jr., P. J., D. R. DeWalle, P. S. Murdoch, W. A. Kretser, H. A. Simonin, J. Van Sickle and J. P. Baker. 1996. "Episodic acidification of small streams in the northeastern United States: Ionic controls of episodes". *Ecological Applications*, vol. 6, p. 389-407.

Table 6.1 : Distribution of Al ionic species in exposure media used for algal treatment (pH 3.0) (for more details, see material and methods).

Total Al	Aluminium species distribution (% of total Al)					
	Al^{3+}	AlSO_4^+	$\text{Al}(\text{SO}_4)^{2-}$	$\text{Al}_2\text{PO}_4^{3+}$	$\text{AlH}_2\text{PO}_4^{2+}$	AlHPO_4^+
100	27	45	24	0	2	2
188	27	45	24	0	2	1
740	27	45	23	2	2	1

Table 6.2 : Changes in cell density, dry weight and chlorophyll concentration in *E. gracilis* and *C. acidophila* cells as a function of Al concentration.

		Al concentration (μM)			
		Control	100	188	740
<i>E. gracilis</i>	Cell density (%)	100	121	130	304
	dry weight / cell ($\times 10^{-10}$ g)	7.01	5.02	5.30	4.11
	chlorophyll / cell ($\times 10^{-6}$ μg)	4.35	3.18	3.23	1.55
<i>C. acidophila</i>	Cell density (%)	100	187	235	243
	dry weight / cell ($\times 10^{-10}$ g)	1.34	0.85	0.76	0.71
	chlorophyll / cell ($\times 10^{-6}$ μg)	2.81	2.11	2.07	1.47

Table 6.3 The change of fluorescence parameters in *E. gracilis* and *C. acidophila* exposed to different Al concentrations (for more details, see material and methods).

	Fluorescence parameter	Al concentration (μM)		
		Control	188	740
<i>E. gracilis</i>	$\Phi_{M\Pi}$	0.66	0.39	0.25
	$\Phi'_{M\Pi}$	0.27	0.19	0.07
	Q_P	0.55	0.41	0.21
	Q_N	0.24	0.40	0.80
	ABS/RC	5.05	5.37	8.42
<i>C. acidophila</i>	$\Phi_{M\Pi}$	0.70	0.64	0.62
	$\Phi'_{M\Pi}$	0.62	0.55	0.48
	Q_P	0.74	0.70	0.61
	Q_N	0.63	0.70	0.80
	ABS/RC	1.06	1.46	1.39

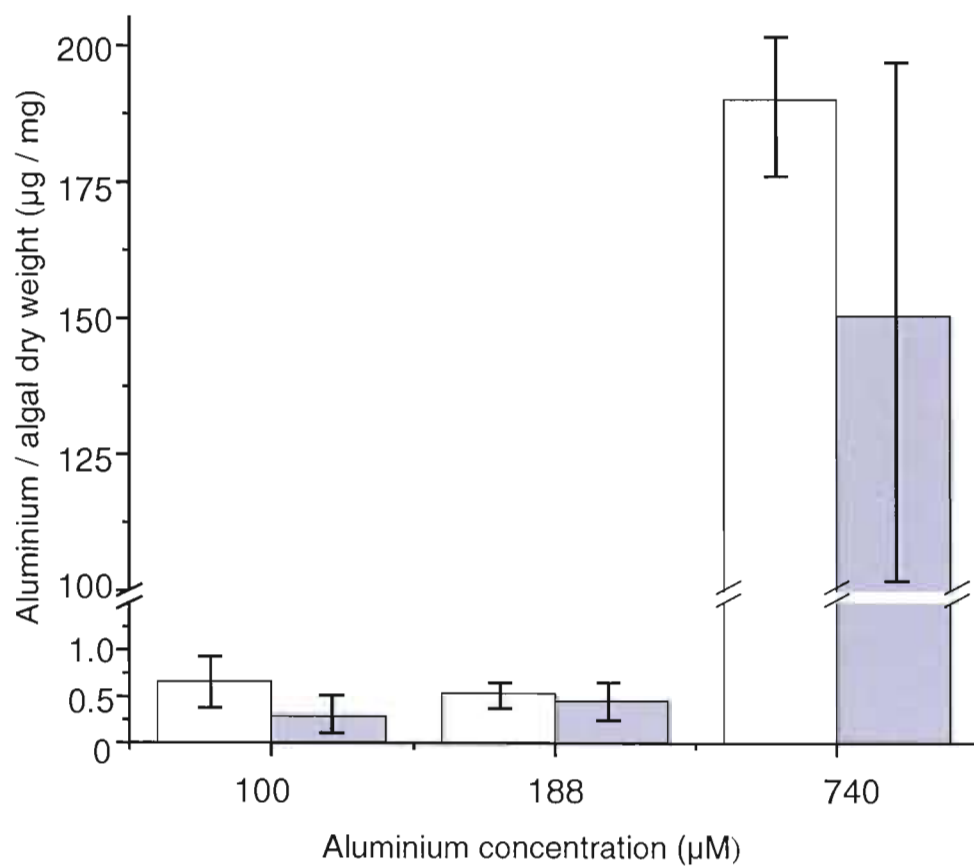


Figure 6.1 : Total intracellular Al in *E. gracilis* (white bars) and *C. acidophila* (grey bars) after 24h of exposure.

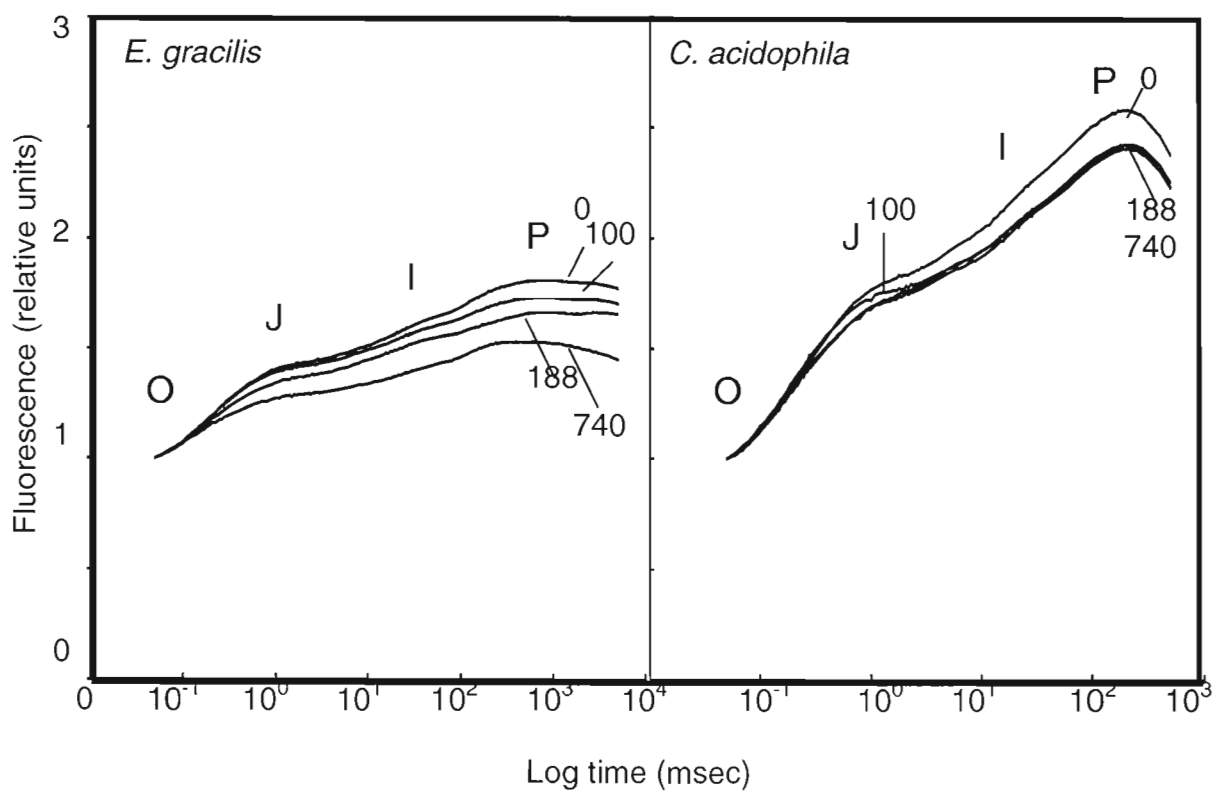


Figure 6.2 : Changes in the rapid polyphasic chl *a* fluorescence rise in *E. gracilis* and *C. acidophila* exposed to increasing concentrations of Al for 24h. Numbers represent Al concentrations in μM (For more details, see material and methods).

CONCLUSION

Les objectifs de notre projet de recherche portaient sur les effets du dichromate et de l'aluminium sur les mécanismes de dissipation d'énergie des photosystèmes II et I chez les algues. Notre travail a contribué à mieux comprendre comment les métaux affectent les propriétés structurales et fonctionnelles des PSII et PSI chez différentes espèces d'algues. Dans notre projet, trois problématiques ont été étudiées : 1) Investigation des effets du dichromate, comme inhibiteur du transport d'électrons photosynthétique, sur les mécanismes de dissipation d'énergie du PSII et du PSI. 2) Étude de rôle du cycle des xanthophylles, participant à la régulation de la dissipation d'énergie sous forme de chaleur, chez des algues mutantes de *C. reinhardtii* exposées aux effets du dichromate. 3) Investigation des effets de l'aluminium sur la photochimie primaire, la dissipation d'énergie et la production de biomasse chez *E. gracilis* et *C. acidophila*.

Dans la première partie de notre recherche, nous avons étudié les processus de dissipation d'énergie du PSII et du PSI chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* lorsqu'un changement des propriétés fonctionnelles et structurales de l'appareil photosynthétique était induit par l'effet toxique du dichromate. L'objectif était de déterminer comment l'action toxique du dichromate affecte la balance de la dissipation d'énergie au niveau du PSII et du PSI. Pour cette partie, notre approche méthodologique consistait à identifier le changement du contenu en protéine D1 par immunobuvardage de type *Western blot*, la composition des pigments par chromatographie liquide à haute performance et le transport des électrons et les processus de dissipation d'énergie du PSII et PSI par fluorescence chlorophyllienne et changement d'absorbance. Nos résultats montrent que le dichromate induit une altération structurale du PSII, indiquée par une diminution du contenu en protéine D1 et par un changement dans la composition des pigments photosynthétiques. Ce changement impliquait une augmentation du ratio zeaxanthine / Chl *a + b* qui indique une activation du cycle des xanthophylle et une augmentation de la dissipation d'énergie sous forme de chaleur. Nos résultats montrent que la diminution du transport d'électron du PSII et du PSI par le dichromate est associée avec une forte augmentation de la dissipation d'énergie

via les voies non-photochimiques non-réglées du PSII. Ce changement indique un dommage au niveau du PSII lorsque les algues sont exposées au dichromate. Cependant, la dissipation d'énergie par le PSI suggère un autre site possible d'inhibition du dichromate situé du côté accepteur du PSI. Les résultats de cette partie indiquent que le dichromate altère la dissipation d'énergie des deux photosystèmes. Donc, l'inhibition du transport d'électrons photosynthétique par le dichromate entraîne un dommage au niveau du PSII et une augmentation de la dissipation non-photochimique non-réglée.

Dans la deuxième partie de nos recherches, nous avons étudié le rôle du cycle des xanthophylles, comme mécanisme de régulation de la dissipation d'énergie lumineuse par le PSII, quand des algues mutantes du cycle des xanthophylles ont été exposées au dichromate. Deux mutants de *C. reinhardtii* ayant un cycle de xanthophylles non fonctionnel, identifiés par *npq1* (déficient en zéaxanthine) et *npq2* (accumulant la zéaxanthine) ont été utilisés pour cette étude. Nous avons utilisé différentes intensités de lumière pour évaluer les effets du dichromate sur l'efficacité du fonctionnement du PSII chez les mutants caractérisés par une déficience du cycle des xanthophylles. Deux publications scientifiques ont été obtenues avec les résultats de nos recherches. Dans le premier rapport, les mutants *npq1* et *npq2* ont été exposés au dichromate pendant 24h et l'altération des propriétés fonctionnelles de PSII a été étudiée par la mesure de la fluorescence chlorophyllienne modulée. La dissipation d'énergie du PSII a été évaluée par les processus suivants : la dissipation par le transport d'électrons de PSII, la dissipation non photochimique d'énergie impliquant des mécanismes régulateurs et la dissipation non-photochimiques non-réglée. Nos résultats nous ont permis d'établir un modèle indiquant la dépendance entre l'effet de la toxicité du dichromate et la photoinhibition induite par la lumière chez les algues ayant un cycle de xanthophylles modifié. Lorsque ces mutants d'algues ont été exposés aux effets toxiques du dichromate et à une intensité lumineuse élevée, la dissipation d'énergie, sous forme non photochimique impliquant des processus non régulateurs est devenue majoritaire, atteignant la valeur de 80 %. Conséquemment, les mutants *npq1* et *npq2* étaient plus sensibles aux effets toxiques du dichromate. Dans le deuxième rapport, la sensibilité du mutant *npq1* (déficient en zéaxanthine) a été évaluée lorsque les algues ont été exposées au dichromate sous une faible

($35 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) et une haute ($320 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) intensité lumineuse. L'altération fonctionnelle du transport d'électrons photosynthétique a été évaluée par la détermination du changement des voies de dissipation d'énergie au niveau des PSII et PSI. Le changement structurel du PSII a été évalué par l'étude du contenu en protéine D1 du PSII en utilisant l'immunobuvardage. Lorsque la souche sauvage de *C. reinhardtii* et le mutant *npq1* sont exposés au dichromate sous une faible intensité lumineuse, aucun effet délétère sur la protéine D1 du PSII n'est observé. Cependant, sous haute intensité lumineuse et $25 \mu\text{M}$ de dichromate, le mutant *npq1* est plus sensible à la photoinhibition que la souche sauvage. Sous ces conditions, la photochimie du PSII diminue de plus de deux fois en comparaison avec l'échantillon témoin, alors que la dissipation d'énergie sous forme non-photochimique non-réglée est augmentée jusqu'à 65% et 46% chez le mutant et la souche sauvage, respectivement. Nos résultats indiquent que le mutant *npq*, caractérisé par une déficience en zéaxanthine, est plus sensible à la photoinhibition induite par les effets du dichromate sur le transport d'électrons photosynthétique. Les mécanismes de régulation de la dissipation d'énergie ont donc un rôle dans la protection de l'appareil photosynthétique lorsque les algues sont exposées au dichromate.

Dans la troisième partie de notre recherche, nous avons étudié les effets de l'aluminium sur l'activité photosynthétique chez les algues *Euglena gracilis* et *Chlamydomonas acidophila*. L'objectif de ce travail était d'évaluer les effets de l'aluminium sous la forme d'ion libre dans un milieu à pH 3,0. Le changement du transport d'électrons photosynthétique, la dissipation d'énergie au niveau du PSII ainsi que la croissance et la production de biomasse des algues ont été évalués. Dans notre étude, la densité cellulaire, le poids sec et la quantité de Chl par cellule sont utilisés comme indicateurs de la production de biomasse et de la croissance cellulaire. En utilisant les fluorimètres PAM et PEA, nous avons déterminés les effets de l'aluminium sur l'activité du PSII. Nous avons conclu que l'aluminium stimule la division cellulaire mais diminue la synthèse de matière sèche et la quantité de Chl par cellule. Les rendements photochimique maximal et opérationnel du PSII ont été moins affectés chez *C. acidophila*, résistante aux effets des métaux, que chez *E. gracilis*. Cette diminution s'est manifestée par une diminution du nombre de centres réactionnels actifs du PSII chez *E. gracilis*. Par les résultats de notre recherche, nous avons

conclu que l'inactivation des centres réactionnels du PSII augmente la dissipation d'énergie sous forme de chaleur et diminue la capacité des PSII-PSI pour le transport d'électrons et la formation du gradient de protons. Cette inhibition va entraîner une diminution de la production d'ATP et de NADPH menant à une diminution de la production de biomasse chez les algues sensible à l'aluminium, comme *E. gracilis*. Ces résultats peuvent contribuer à expliquer les effets de l'aluminium à changer la structure des communautés algales lorsqu'il est disponible sous forme d'ion libre.

Notre recherche nous permet de conclure que les mécanismes de régulation de la dissipation d'énergie au niveau de l'appareil photosynthétique peuvent protéger les algues lorsqu'elles sont exposées aux effets des métaux. Le dichromate induit une augmentation de la dissipation d'énergie par des mécanismes non-régulés, ce qui indique la présence d'une photoinhibition du PSII. L'inhibition du transport d'électrons du côté accepteur du PSI peut contribuer à augmenter la sensibilité à la photoinhibition chez les algues exposées aux métaux. La présence de mécanismes de régulation de la dissipation d'énergie comme le cycle des xanthophylles aide les algues à se protéger de la photoinhibition induite par les métaux. Ceci a été démontré par la sensibilité des algues mutantes *npq1* et *npq2* de *C. reinhardtii* aux effets du dichromate. De plus, l'exposition des algues aux effets de l'aluminium peut induire une plus grande augmentation de la dissipation d'énergie sous forme non-photochimique. Ces résultats peuvent indiquer que les mécanismes de régulation de la dissipation d'énergie sont impliqués dans la résistance aux métaux affectant le transport d'électrons des PSII et PSI. Cependant, la régulation de la dissipation d'énergie par l'appareil photosynthétique est un mécanisme complexe impliquant plusieurs processus qui nécessitent plus d'études pour mieux comprendre la dépendance entre les mécanismes de dissipation d'énergie et les effets toxiques des métaux chez les algues.

AUTRES CONTRIBUTIONS

- Popovic, R., F. Perreault, D. Dewez, J. Dionne et P. Juneau. 2008. "Alteration of O-J-I-P chlorophyll induction kinetics by dichromate effect on water splitting system". In *Energy from the sun*. Editors J. Allen, E. Gantt, J. Golbeck et B. Osmond, 9 pages. (sous presse)
- Dewez, D., N. Ait Ali, F. Perreault et R. Popovic. 2007. "Rapid chlorophyll *a* fluorescence transient of *Lemna gibba* leaf as an indication of light and hydroxylamine effect on photosystem II activity". *Photochemical and Photobiological Sciences*, vol. 6, p. 532-538.

RÉFÉRENCES

- Ait Ali, N., D. Dewez, O. Didur et R. Popovic. 2006. "Inhibition of photosystem II photochemistry by Cr is caused by the alteration of D1 protein and oxygen evolving complex". *Photosynthesis Research*, vol. 89, p. 81-87.
- Appenroth, K. J., J. Stöckel, A. Srivastava and R. J. Strasser. 2001. "Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrhiza* as probed by OJIP chlorophyll a fluorescence measurements". *Environmental Pollution*, vol. 115, p. 49-64.
- Appenroth, K. J., A. Keresztes, E. Sarvari, A. Jaglarz et W. Fischer. 2003. "Multiple effects of chromate on *Spirodela polyrhiza*: electron microscopy and biochemical investigations". *Plant Biology*, vol. 5, p. 315-323.
- Aravind, P., et M. N. V. Prasad. 2004. "Zn protects chloroplasts and associated photochemical functions in cadmium exposed *Ceratophyllum demersum* L., a freshwater macrophyte". *Plant Sciences*, vol. 166, p. 1321-1327.
- Asada, K. 1994. "Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues". In *causes of photooxydative stress and amelioration of defence systems in plants*. Editors C. H. Foyer et P. M. Mullineaux, p. 77-104. Boca Raton : CRC Press.
- Atal, N., P. P. Saradhi et P. Mohanty. 1991. "Inhibition of the chloroplast photochemical reactions by treatment of wheat seedlings with low concentrations of cadmium : Analysis of electron transport activities and changes in fluorescence yield". *Plant Cell Physiology*, vol. 32, p. 943-951.
- Baker, N. R., J. Harbinson et D. M. Kramer. 2007. "Determining the limitations and regulation of photosynthetic energy transduction in leaves". *Plant, Cell and Environment*, vol. 30, p. 1107-1125.
- Barber, J., et W. Kuhlbrandt. 1999. "Photosystem II". *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 9, p. 469-475.
- Baroli, I., A. D. Do, T. Yamane et K. K. Niyogi. 2003. "Zeaxanthin accumulation in the absence of a functional xanthophyll cycle protects *Chlamydomonas reinhardtii* from photooxidative stress". *The Plant Cell*, vol. 15, p. 992-1008.
- Bassi, R., D. Sandona et R. Croce. 1997. "Novel aspect of chlorophyll *alb* binding proteins". *Physiologia Plantarum*, vol. 100, p. 769-779.
- Bellafiore, S., F. Barneche, G. Peltier et J.-D. Rochaix. 2005. "State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7". *Nature*, vol. 433, p. 892-895.

- Ben-Shem, A., F. Frolow et N. Nelson. 2003. "Crystal structure of plant photosystem I". *Nature*, vol. 426, p. 630-635.
- Bertrand, M., et I. Poirier. 2005. "Photosynthetic organisms and excess of metals". *Photosynthetica*, vol. 43, p. 345-343.
- Blankenship, R. R. 1992. "Origin and early evolution of Photosynthesis". *Photosynthesis Research*, vol. 33, p. 91-111.
- Blankenship, R. E. 2002. "Molecular mechanisms of Photosynthesis". Oxford : Blackwell Science Ltd., pp. 328.
- Boisvert, S., D. Joly, S. Leclerc, S. Govindachary, J. Harnois et R. Carpentier. 2007. "Inhibition of the oxygen-evolving complex of photosystem II and depletion of extrinsic polypeptides by nickel". *Biometals*, vol. 20, p. 879-889.
- Boucher, N., et R. Carpentier. 1999. "Hg²⁺, Cu²⁺, and Pb²⁺-induced changes in Photosystem II photochemical yield and energy storage in isolated thylakoid membranes: A study using simultaneous fluorescence and photoacoustic measurements". *Photosynthesis Research*, vol. 59, p. 167-174.
- Boyer, P. D. 1993. "The binding change mechanism for ATP synthase – some probabilities and possibilities". *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1140, p. 215-250.
- Buchanan, B. B., W. Gruissem et R. L. Jones. 2000. *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists. Maryland : Rockville, 1367 p.
- Butler, W. L., et M. Kitajima. 1975. "A tripartite model for chloroplast fluorescence". *Proceedings, 3rd International Congress on Photosynthesis*, p. 13-24.
- Catling, D. C., et M. W. Claire. 2005. "How Earth's atmosphere evolved to an oxic state: A status report". *Earth and Planetary Science Letters*, vol. 237, p. 1-20.
- Caspi, V., M. Droppa, G. Horváth, S. Malkin, J. B. Marder et V. I. Raskin. 1999. "The effect of copper on chlorophyll organization during greening of barley leaves". *Photosynthesis Research*, vol. 62, p. 165-174.
- Chitnis, P. R. 2001. "Photosystem I : Function and Physiology". *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, vol. 52, p. 593-626.
- Claesson, A., et L. Tornqvist. 1988. "The toxicity of aluminium to two acido-tolerant green algae". *Water Research*, vol. 22, p. 977-983.
- Clijsters, H., et F. Van Assche. 1985. "Inhibition of photosynthesis by heavy metals". *Photosynthesis Research*, vol. 7, p. 31-40.

- Connel, D. W. 2005. *Basic concepts of environmental chemistry*. 2eme édition. Boca Raton (Florida) : Taylor and Francis Group, CRC Press, 662 p.
- Danilov, R. A., et N. G. A. Ekelund. 2001. "Response of photosynthetic efficiency, cell shape and motility in *Euglena gracilis* (Euglenophyceae) to short-term exposure to heavy metals and pentachlorophenol". *Water, Air and Soil Pollution*, vol. 132, p. 61-73.
- Dat, J., E. Vandenaabeele, M. Vranova, V. Montagu, D. Inzé et F. Van Breusegem. 2000. "Dual action of the active oxygen species during plant stress response". *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 57, p. 779-795.
- Dau, H. 1994. "Molecular mechanisms and quantitative models of variable photosystem II fluorescence". *Photochemistry and Photobiology*, vol. 60, p. 1-23.
- De Las Rivas, J. D., M. Balsera et J. Barber. 2004. "Evolution of oxygenic photosynthesis : genome-wide analysis of the OEC extrinsic proteins". *Trends in Plant Science*, vol. 9, p. 18-25.
- Dekker, J. P., et E. J. Boekema. 2005. "Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants". *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1706, p. 12-39.
- Dekker, J. P., et R. Van Grondelle. 2000. "Primary charge separation in photosystem II". *Photosynthesis Research*, vol. 63, p. 195-208.
- Demmig-Adams, B., et W. W. III Adams. 1996. "The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis". *Trends in Plant Science*, vol. 1, p. 21-26.
- Dewez, D., L. Geoffroy, G. Vernet et R. Popovic. 2005. "Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*". *Aquatic toxicology*, vol. 74, p. 150-159.
- Duysens, L. N. M., et H. E. Sweers. 1963. "Mechanism of the two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence". In *Studies on microalgae and photosynthetic bacteria*. Editors, L. N. M. Duysens et H. E. Sweers, p. 353-372. Japanese Society of Plant Physiologists. Tokyo: University of Tokyo Press.
- Faller P., K. Kienzler, A. Krieger-Liszkay. 2005. "Mechanism of Cd²⁺ toxicity: Cd²⁺ inhibits photoactivation of Photosystem II by competitive binding to the essential Ca²⁺ site". *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1706, p. 158-164.
- Force, L., C. Critchley et J. J. S. Van Rensen. 2003. "New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants". *Photosynthesis Research*, vol. 78, p. 17-33.
- Fujita, Y. 1997. "A study on the dynamic features of photosystem stoichiometry: Accomplishments and problems for future studies". *Photosynthesis Research*, vol. 53, p. 83-93.

- Genty, B., J.-M. Briantais et N. R. Baker. 1989. "The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence". *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 990, p. 87-92.
- Gobets, B., I. H. M. Van Stokkum, M. Rögner, J. Kruip, E. Schlodder, N. V. Karapetyan, J. P. Dekker et R. Van Grondelle. 2001. "Time-resolved fluorescence emission measurements of photosystem I particles of various cyanobacteria, a unified compartmental model". *Biophysical Journal*, vol. 81, p. 407-424.
- Golbeck, J. H. 1987. "Structure, function and organization of the photosystem I reaction center complex". *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 895, p. 167-204.
- Govindjee, et R. Govindjee. 1974. "The absorption of light in photosynthesis". *Scientific American*, vol. 231, p. 64-82.
- Govindjee, et W. T. Coleman. 1990. "How plants make oxygen". *Scientific American*, vol. 262, p.50-58.
- Green, B. R., et D. G. Durnford. 1996. "The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis". *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, vol. 47, p. 685-714.
- Haumann, M., et W. Junge. 1999. "Evidence for impaired hydrogen-bonding of tyrosine YZ in calcium-depleted photosystem II". *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1411, p. 121-133.
- Hauska, G., M. Schütz et M. Büttner. 1996. "The cytochrome b_6f complex - composition, structure and function". In *Advances in Photosynthesis, Oxygenic Photosynthesis*. Editors, D. R. Ort, C. F. Yokum, p. 377-398. Dordrecht, The Netherlands : Kluwer Academic Publishers.
- Havaux, M., R. J. Strasser et H. Greppin. 1991. "A theoretical and experimental analysis of the Q_P and Q_N coefficients of chlorophyll fluorescence quenching and their relation to photochemical and nonphotochemical events". *Photosynthesis Research*, vol. 27, p. 41-55.
- Heber, U., W. Bilger et V. A. Shuvalov. 2006. "Thermal energy dissipation in reaction centres and in the antenna of photosystem II protects desiccated poikilohydric mosses against photo-oxidation". *Journal of Experimental Botany*, vol. 57, p. 2993-3006.
- Heller, R., R. Esnault et C. Lance. 1998. *Physiologie végétale. I. Nutrition*. Paris : Dunod, pp. 323.

- Hendrickson, L., M. C. Ball, C. B. Osmond, R. T. Furbank et W. S. Chow. 2003. "Assessment of photoprotection mechanisms of grapevines at low temperature". *Functional Plant Biology*, vol. 30, p. 631-642.
- Heredia, P. et J. De Las Rivas. 2003. "Calcium dependant conformational change and thermal stability of the isolated PsbO protein detected by FTIR spectroscopy". *Biochemistry*, vol. 42, p. 11831-11838.
- Heung, W., M. J. Yun, D. P. Chang, P. G. Green et C. Halm. 2007. "Emissions of chromium (VI) from arc welding". *Journal of Air Waste Management Association*, vol. 57, p. 252-260.
- Hiyama, T. 1985. "Quantum yield and requirement for the photooxidation of P700". *Physiologie végétale*, vol. 23, p. 605-610.
- Hörsik, Z. T., L. Kovacs, R. Laposi, I. Meszaros, G. Lakatos et G. Garab. 2007. "Effect of chromium on photosystem 2 in the unicellular green alga, *Chlorella pyrenoidosa*". *Photosynthetica*, vol. 45, p. 65-69.
- Horton, P., A. V. Ruban et R. G. Walters. 1996. "Regulation of light harvesting in green plants". *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, vol. 47, p. 655-684.
- Jahns, P., B. Depka et A. Trebst. 2000. "Xanthophyll cycle mutants from *Chlamydomonas reinhardtii* indicate a role for zeaxanthin in the D1 protein turnover". *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 38, p. 371-376.
- Jensen, P. E., R. Bassi, E. J. Boekema, J. P. Dekker, F. Jansson, D. Leister, C. Robinson and H. V. Scheller. 2007. "Structure, function and regulation of plant photosystem I". *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1767, p. 335-352.
- Johnson, J., L. Schewel et T. E. Graedel. 2006. "The contemporary anthropogenic chromium cycle". *Environmental Sciences and Technology*, vol. 40, p. 7060-7069.
- Jordan, P., P. Fromme, H. T. Witt, O. Kuklas, W. Saenger et N. Krauss. 2001. "Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å". *Nature*, vol. 411, p. 909-917.
- Juneau, P. A. El Berdey et R. Popovic. 2002. "PAM fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornatum* and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper". *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 42, p. 155-164.
- Juneau, P., D. Dewez, Matsui S., S. G. Kim et R. Popovic. 2001. "Evaluation of different algal species sensitivity to mercury and metachlor by PAM-fluorometry". *Chemosphere*, vol. 45, 589-598.

- Juneau, P., et R. Popovic. 1999. "Evidence for the rapid phytotoxicity and stress evaluation using the PAM fluorometric method: importance and future application". *Ecotoxicology*, vol. 8, p. 449-455.
- Jupin, H., et A. Lamant. 1999. *La photosynthèse*. Paris, Dunod, 268 p.
- Kanervo, E., M. Suorsa et E. M. Aro. 2005. "Functional flexibility and acclimation of the thylakoid membrane". *Photochemical and Photobiological Sciences*, vol. 4, p. 1072-1080.
- Karapetyan, N. V., E. Schlodder, R. Van Grondelle et J. P. Dekker. 2006. "The long-wavelength chlorophylls of photosystem I". In *Photosystem I : The light-driven, Plastocyanin:Ferredoxin Oxidoreductase*, Editors, J. H. Golbeck, p. 177-192. The Netherlands, Springer.
- Kautsky, H., et A. Hirsch. 1931. "Neue Versuche zur kohlenensäureassimilation". *Naturwissenschaften*, vol. 19, p. 964.
- Khrouchtchova, A., M. Hansson, V. Paakkarinen, J. P. Vainonen, S. P. Zhang, P. E. Jensen, H. V. Scheller, A. V. Vener, E. M. Aro et . Haldrup. 2005. "A previously found thylakoid membrane protein of 14 kDa (TMP14) is a novel subunit of plant photosystem I and is designated PSI-P". *FEBS Letters*, vol. 579, p. 4808-4812.
- Kinross, J. H., P. A. Read et N. Christofi. 2000. "The influence of pH and aluminium on the growth of filamentous algae in artificial streams". *Archives fur Hydrobiologia*, vol. 149, p. 67-86.
- Klughammer, C., et U. Schreiber. 1994. "An improved method, using saturating light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via P700+ -absorbance changes at 830 nm". *Planta*, vol. 191, p. 261-268.
- Klughammer, C., et U. Schreiber. 2008. "Saturation Pulse method for assessment of energy conversion in PS I". *PAM Application Notes*, vol. 1, p. 11-14.
- Knauert, S., et K. Knauer. 2008. "The role of reactive oxygen species in copper toxicity to two freshwater green algae". *Journal of Phycology*, vol. 44, p. 311-319.
- Knoetzel, J., A. Mant, A. Haldrup, P. E. Jensen et H. V. Scheller. 2002. "A new 10-kDa subunit of eukaryotic photosystem I". *FEBS Letters*, vol. 510, p. 145-148.
- Kobayashi, J. S., T. Kakizono, N. Nishio, S. Nagai, Y. Kurimara et Y. Tsuji. 1997. "Antioxidant role of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*". *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 48, p. 351-356.

- Kok, B., B. Forbush et M. McGloin. 1970. "Cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution. I. A linear four-step mechanism". *Photochemistry and Photobiology*, vol. 11, p. 457-475.
- Kovacs, L., W. Wiessner, M. Kis, F. Nagy, D. Mende et S. Demeter. 2000. "Short- and long-term redox regulation of photosynthetic light energy distribution and photosystem stoichiometry by acetate metabolism in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*". *Photosynthesis Research*, vol. 65, p. 231-247.
- Kramer, D. M., G. Johnson, O. Kiirats et G. E. Edwards. 2004. "New fluorescence parameters for the determination of Q_A redox state and excitation energy fluxes". *Photosynthesis Research*, vol. 79, p. 209-218.
- Krause, G.H., et E. Weis. 1991. "Chlorophyll fluorescence and photosynthesis : the basis". *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, vol. 42, p.313-349.
- Kumar, P., R. K. Tewari et P. N. Sharma. 2008. "Cadmium enhances generation of hydrogen peroxide and amplifies activities of catalase, peroxidases and superoxide dismutase in maize". *Journal of Agronomy and Crop Science*, vol. 194, p. 72-80.
- Küpper, H., F. Kupper et M. Spiller. 1998. "In situ detection of heavy metal substituted chlorophylls in water plants". *Photosynthesis Research*, vol. 58, p. 123-133.
- Krupa, Z., Oquist, G., and Huner, N. 1993. "The effects of cadmium on photosynthesis of *Phaseolus vulgaris*- a fluorescence analysis". *Physiologia Plantarum*, vol. 88, p. 626-630.
- Krupa, Z., E. Skórzyńska, W. Maksymiec et T. Baszyński. 1987. "Effect of cadmium treatment on the photosynthetic apparatus and its photochemical activities in greening radish seedlings". *Photosynthetica*, vol. 21, p. 156-164.
- Lazár, D. 1999. "Chlorophyll a fluorescence induction". *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1412, p. 1-28.
- Lehninger, A. L., D. L. Nelson et M. M. Cox. 1994. *Principes de biochimie*. 2ème édition. Paris : Médecine-Sciences Flammarion, 1120 p.
- Malkin, R., et K. Niyogi. 2000. "Photosynthesis". In *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville : Maryland, pp. 568-628.
- Masojidek, J., G. Torzillo, J. Kopecky, M. Koblizek, L. Nidiaci, J. Komenda, A. Lukavska et A. Sacchi. 2000. "Changes in chlorophyll fluorescence quenching and pigment composition in the green alga *Chlorococcum sp.* grown under nitrogen deficiency and salinity stress". *Journal of Applied Phycology*, vol.12, p. 416-426.

- Mathis, P., I. Ikegami et P. Setif. 1988. "Nanosecond flash studies of the absorption spectrum of the Photosystem I primary acceptor Ao". *Photosynthesis Research*, vol. 16, p. 203-210.
- McKersie, B. D., et Y. Y. Leshem. 1994. "Oxidative stress". In *Stress and stress coping in cultivated plants*. Editors, B. D. McKersie et Y. Y. Leshem, p. 15-54. Dordrecht, Pays-Bas : Kluwer Academic Publishers.
- Melis, A., A. Murakami, J. A. Nemson, K. Aizawa, K. Ohki et Y. Fujita. 1996. "Chromatic regulation in *Chlamydomonas reinhardtii* alters photosystem stoichiometry and improves the quantum efficiency of photosynthesis". *Photosynthesis Research*, vol. 47, p. 253-265.
- Mendoza-Cózalt, D.G., et R. Moreno-Sánchez. 2005. "Cd²⁺ transport and storage in the chloroplast of *Euglena gracilis*". *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1706, p. 88-97.
- Mitchell, P. 1974. "A chemiosmotic molecular mechanism for proton-translocating adenosine triphosphatases". *FEBS Letters*, vol. 43, p. 189-194.
- Miyao, M., et Murata, N. 1984. "Role of the 33-kDa polypeptide in preserving Mn in the photosynthetic oxygen-evolving system and its replacement by chloride ions". *FEBS Letters*, vol. 170, p. 350-354.
- Monnet, F., N. Vaillant, P. Vernay, A. Coudret, H. Sallanon et A. Hitmi. 2001. "Relationship between PSII activity, CO₂ fixation, and Zn, Mn and Mg contents of *Lolium perenne* under zinc stress". *Journal of Plant Physiology*, vol. 158, p. 1137-1144.
- Moronsito, T., S. Caffari, L. Dall'Osto et R. Bassi. 2003. "Mechanistic aspect of the xanthophyll dynamics in higher plant thylakoids". *Physiologia Plantarum*, vol. 119, p. 347-354.
- Müller, P., X.-P. Li et K. K. Niyogi. 2001. "Non-photochemical quenching. A response to excess light energy". *Plant Physiology*, vol. 125, p. 1558-1566.
- Mustárdy, L., et G. Garab. 2003. "Granum revisited. A three-dimensional model where things fall into place". *Trends in Plant Science*, vol. 8, p. 117-122.
- Murakami, A., Y. Fujita, Nemson J. A. et A. Melis. 1997. "Chromatic regulation in *Chlamydomonas reinhardtii*: Time course of photosystem stoichiometry adjustment following a shift in growth light quality". *Plant Cell Physiology*, vol. 38, p. 188-193.
- Mysliwa-Kurdziel, B., et K. Strzalka. 2005. "Influence of Cd(II), Cr(VI) and Fe(III) on early steps of deetiolation process in wheat: fluorescence spectral changes of protochlorophyllide and newly formed chlorophyllide". *Agriculture, Ecosystems and Environment*, vol. 106, p. 199-207.

- Nagel, K., U. Adelmeier, J. Voigt. 1996. "Subcellular distribution of cadmium in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*". *Journal of Plant Physiology*, vol. 149, p. 86-90.
- Neubauer, C., et U. Schreiber. 1987. "The polyphasic rise of chlorophyll fluorescence upon onset of strong continuous illumination : I. Saturation characteristics and partial control by the photosystem II acceptor side". *Zeitschrift für Naturforschung*, vol. 42, p. 1246-1254.
- Nishikawa, K., et N. Tominaga. 2001. "Isolation, growth, ultrastructure, and metal tolerance of the green alga, *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta)". *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, vol. 65, p. 2650-2656.
- Nishiyama, Y., S.I. Allakhverdiev et N. Murata. 2006. "New paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II". *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1757, p. 742-749.
- Niyogi, K. K., O. Björkman et A. R. Grossman. 1997a. "The role of specific xanthophylls in photoprotection". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 94, p. 14162-14167.
- Niyogi, K. K. , O. Bjorkman and A. R. Grossman. 1997b. "*Chlamydomonas* xanthophylls cycle mutants identified by video imaging of chlorophyll fluorescence quenching". *The Plant Cell*, vol. 8, p. 1369-1380.
- Niyogi, K. K. 1999. "Photoprotection revisited : Genetic and molecular approaches". *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, vol. 50, p. 333-359.
- Niyogi, K. K. 2000. "Safety valves for photosynthesis". *Current opinions in Plant Biology*, vol. 3, p. 455-460.
- Niyogi, K. K., X.-P. Li, V. Rosenburg et H.-S. Jung. 2004. "Is PsbS the site of non-photochemical quenching in photosynthesis?". *Journal of Experimental Botany*, vol. 56, p. 375-382.
- Otero, S., E. Nunez-Olivera, J. Martinez-Abaigar, R. Tomas, M. Arroniz-Crespo et N. Beaucourt. 2006. "Effects of cadmium and enhanced UV radiation on the physiology and the concentration of UV-absorbing compounds of the aquatic liverwort *Jungermannia exsertifolia* subsp. *Cordifolia*". *Photochemical and Photobiological Sciences*, vol. 5, p. 760-769.
- Pagliano, C., M. Raviolo, F. D. Vecchia, R. Gabrielli, C. Gonnelli, N. Rascio, R. Barbato et N. La Rocca. 2006. "Evidence for PSII donor-side damage and photoinhibition induced by cadmium treatment on rice (*Oryza sativa* L.)". *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, vol. 84, p. 70-78.

- Palozza, P., et N. I. Krinsky. 1992. "Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model". *Archives of Biochemistry and Biophysic*, vol. 297, p. 291-295.
- Papageorgiou, G. 1975. "Chlorophyll fluorescence: an intrinsic probe of photosynthesis". In *Bioenergetics of photosynthesis*. Editor, Govindjee. New York : Academic Press, pp. 319-372.
- Pätsikkä, E., E.-M. Aro et E. Tyystjärvi. 1998. "Increase in the quantum yield of photoinhibition contributes to copper toxicity in vivo". *Plant Physiology*, vol. 117, p. 619-627.
- Pätsikkä, E., E.-M. Aro et E. Tyystjärvi. 2001. "Mechanism of copper-enhanced photoinhibition in thylakoid membranes". *Physiologia Plantarum*, vol. 113, p. 142-150.
- Pawlisz, A. V, R. A. Kent, U. A. Schneider et C. Jefferson. 1997. "Canadian water quality guidelines for Cr". *Environmental Toxicology and Water Quality*, vol. 12, p. 185-193.
- Popelkova, H., S. D. Betts, N. Lydakis-Symantiris, M. M. Im, E. Swenson et C. F. Yocum. 2006. "Mutagenesis of basic residues R151 and R161 in manganese-stabilizing protein of photosystem II causes inefficient binding of chloride to the oxygen evolving complex". *Biochemistry*, vol. 45, p. 3107-3115.
- Poulson, M., G. Samson et J. Whitmarsh. 1995. "Evidence that cytochrome b559 protects photosystem II against photoinhibition". *Biochemistry*, vol. 34, p. 10932-10938.
- Prasad, M. N. V., et K. J. Dietz. 1999. "Heavy metals stress in plants". In *Free radical and reactive oxygen species as mediator of heavy metal*. Editor, B. Heidelberg, Elsevier, pp. 73-97.
- Randhawa, V. K., F. Zhou, X. Jin, C. Nalewajko et D. J. Kushner. 2001. "Role of oxydative stress and thiol antioxydant enzymes in nickel toxicity and resistance in strains of the green alga *Scenedesmus acutus f. alternans*". *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 47, p. 987-993.
- Rai, L. C., Y. Husaini et N. Mallick. 1996. "Physiological and biochemical responses of *Nostoc linckia* to combined effects of aluminium, fluoride and acidification". *Environmental and Experimental Botany*, vol. 36, p. 1-12.
- Rai, L. C., Y. Husaini et N. Mallick. 1998. "pH-altered interaction of aluminium and fluoride on nutrient uptake, photosynthesis and other variables of *Chlorella vulgaris*". *Aquatic Toxicology*, vol. 42, p. 67-84.
- Rai, V., P. Vajpayee, S. N. Singh et S. Mehrota. 2004. "Effect of chromium accumulation on photosynthetic pigments, oxidative stress defense system, nitrate reduction, prolin level

- and eugenol content of *Ocimum tenuiflorum* L.". *Plant Science*, vol. 167, p. 1159-1169.
- Raines, C. 2003. "The Calvin cycle revisited". *Photosynthesis Research*, vol. 75, p. 1-10.
- Raven, J. A., M. C. W. Evans et R. E. Korb. 1999. "The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂-evolving organisms". *Photosynthesis Research*, vol. 60, p. 111-149.
- Rawn, J.D. 1990. "La photosynthèse". Dans *Traité de biochimie*, p. 489-532, Bruxelles, Belgique : De Boeck-Wesmael.
- Rodriguez M. C., L. Barsanti, V. Passarelli, V. Evangelista, V. Conforti et P. Gualtieri. 2007. "Effects of chromium on photosynthetic and photoreceptive apparatus of the alga *Chlamydomonas reinhardtii*". *Environmental Research*, vol. 105, p. 234-239.
- Rohacek, K. et M. Bartak. 1999. "Technique of the modulated chlorophyll fluorescence : basic concepts, useful parameters, and some applications". *Photosynthetica*, vol. 37, p. 339-363.
- Rutherford, A. W., et P. Heathcote. 1985. "Primary photochemistry in photosystem I". *Photosynthesis Research*, vol. 6, p. 293-316.
- Sas, K. N., L. Kovacs, O. Zsiros, Z. Gombos, G. Garab, L. Hemmingsen et E. Danielsen. 2006. "Fast cadmium inhibition of photosynthesis in cyanobacteria in vivo and in vitro studies using perturbed angular correlation of γ -rays". *Journal of Biological and Inorganic Chemistry*, vol. 11, p. 725-734.
- Samson, G., et R. Popovic. 1988. "Use of algal fluorescence for determination of phytotoxicity of heavy metals and pesticides as environmental pollutants". *Ecotoxicological and Environmental Safety*, vol. 16, p. 272-278.
- Samson, G., et R. Popovic. 1990. "Inhibitory effects of mercury on photosystem II photochemistry in *Dunaliella tertiolecta* under in vivo conditions". *Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology*, vol. 5, p. 303-310.
- Schmid, V. H. R., P. Potthast, M. Wiener, V. Bergauer, H. Paulsen et S. Storf. 2002. "Pigment binding of photosystem I light-harvesting proteins". *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, p. 37307-37314.
- Schreiber, U., U. Schliwa et W. Bilger. 1986. "Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer". *Photosynthesis Research*, vol. 10, p. 51-62.
- Seidler, A. 1996. "The extrinsic polypeptides of photosystem II". *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1277, p. 35-60.

- Shimoni, E., O. Rav Hon, I. Ohad, V. Brumfeld et Z. Reich. 2005. "Three dimensional organisation of higher-plant chloroplast thylakoid membranes revealed by electron tomography". *The Plant Cell*, vol. 17, p. 2580-2586.
- Sigfridsson, K. G. V., G. Bernat, F. Mamedov et S. Styring. 2004. "Molecular interference of Cd²⁺ with Photosystem II". *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1659, p. 19-31.
- Staehelin, L. A., et G. W. M. Van der Staay. 1996. "Structure, composition, fonctional organization and dynamic properties of thylakoid membranes". Dans *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*. Editors, D. R. Ort et C. F. Yocum, p. 11-30. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Strasser, R. J. 1997. "Donor side capacity of photosystem II probed by chlorophyll a fluorescence transients". *Photosynthesis Research*, vol. 52, p. 147-155.
- Strasser, R. J., et Govindjee. 1991. "The Fo and O-J-I-P fluorescence rise in higher plants and algae". Dans *Regulation of chloroplast biogenesis*. Editor, J. H. Argyroudi-Akoyunoglou, p. 423-426. New York : Plenum Press.
- Strasser, R. J., A. Srivastava et Govindjee. 1995. "Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria". *Photochemistry and Photobiology*, vol. 61, p. 32-42.
- Strasser, R. J., A. Srivastava et M. Tsimilli-Michael. 2000. "The fluorescence transient as tool to characterize and screen photosynthetic samples". Dans *Probing photosynthesis : mechanisms, regulation and adaptation*. Editors, M. Yunus, U. Pathre et P. Mohanty, p. 445-483. Taylor and Francis, London.
- Strasser, R.J., A. Srivastava et M. Tsimilli-Michael. 2004. "Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient". Dans *Chlorophyll Fluorescence a Signature of Photosynthesis, Advances in Photosynthesis and respiration*. Editors G. Papageorgiou, Govindjee. vol. 19, pp. 321-362. The Netherlands : Kluwer Academic Publishers.
- Strasser, R. J., et A. D. Stirbet. 2001. "Estimation of the energetic connectivity of PSII centers in plants using the fluorescence rise O-J-I-P fitting of experimental data to three different PSII models". *Mathematics and Computers in Simulation*, vol. 56, p. 451-461.
- Subrahmanyam, D., et V. S. Rathore. 2000. "Influence of manganese toxicity on photosynthesis in ricebean (*Vigna umbellata*) seedlings". *Photosynthetica*, vol. 38, p. 449-453.
- Takahashi, S., et N. Murata. 2008. "How do environmental stresses accelerate photoinhibition?" *Trends in Plant Science*, vol. 13, p. 178-182.

- Thornber, J. P., D. T. Morishige, S. Anadan et G. F. Peter. 1991. "Chlorophyll-carotenoid proteins of higher plant thylakoids". Dans *Chlorophylls*. Editor, H. Scheer, p. 549-585. Londres : CRC Press.
- Tripathy, B. C., B. Bhatia et P. Mohanty. 1981. "Inactivation of chloroplast photosynthetic electron-transport activity by Ni²⁺". *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 638, p. 217-224.
- Tripathy, B. C., B. Bhatia et P. Mohanty. 1983. "Cobalt ions inhibits electron-transport activity of photosystem II without affecting Photosystem I". *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 722, p. 88-93.
- Van Kooten, O., et J. F. H. Snel. 1990. "The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology". *Photosynthesis Research*, vol. 25, p. 147-150.
- Vredenberg, W.J. 2000. "A three-state model for energy trapping and chlorophyll fluorescence in photosystem II incorporating radical pair recombination". *Biophysical Journal*, vol. 79, p. 26-38.
- Walker, C. H., S. P. Hopkin, R. M. Sibly et D. B. Peakall. 1996. *Principles of ecotoxicology*. Taylor and Francis Inc., Bristol, USA, 321 pp.
- Whitmarsh, J. 1998. "Electron transport and energy transduction". Dans *Photosynthesis: A Comprehensive Treatise*. Editors, A. S. Raghavendra, p. 87-107. Cambridge University Press, Cambridge.
- Whitmarsh, J., et Govindjee. 1999. "The photosynthetic process". Dans *Concept in Photobiology Photosynthesis and Photomorphogenesis*. Editors, G. S. Singhal, G. Renger, S. K. Sopory, K.D. Irragang and Govindjee, p. 11-51. New Delhi, India, Dordrecht, The Netherlands : Kluwer Academic Publishers.
- Williams, L. E., J. K. Pittman et J. L. Hall. 2000. "Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants". *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1465, p. 104-126.
- Wincencjusz, H., C. F. Yocum et H. J. Van Gorkom. 1999. "Activating anions that replace Cl⁻ in the O₂-evolving complex of photosystem II slow the kinetics of the terminal step in water oxidation and destabilize the S2 and S3 states". *Biochemistry*, vol. 38, p. 3719-3725.
- Wollman F. A. 2001. "State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus". *The EMBO Journal*, vol. 20, p. 3623-3630.
- Yi, X., M. McChargue, S. Laborde, L. K. Frankel et T. M. Bricker. 2005. "The manganese-stabilizing protein is required for photosystem II assembly/stability and photoautotrophy in higher plants". *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, p. 16170-16174.

- Zhou, W., P. Juneau et B. Qiu. 2006. "Growth and photosynthetic responses of the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to elevated levels of cadmium". *Chemosphere*, vol. 65, p. 1738-1746.
- Zrýd, J. P., M. Lanoz, F. Rachidi et P. Zweiacker. 2002. "Influence of HF electromagnetic fields on the development and the molecular biology of the moss *Physcomitrella patens* and the nematode *Caenorhabditis elegans*". *14th International Symposium on Electromagnetic Compatibility*, Proceedings Supplement, p. 179-180.