UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EFFET D'UN INHIBITEUR DE LA P-HYDROXYPHÉNYLE PYRUVATE DIOXYGÉNASE SUR LES PROCESSUS PHOTOCHIMIQUES ET NON-PHOTOCHIMIQUES DE DISSIPATION DE L'ÉNERGIE CHEZ CHLAMYDOMONAS REINHARDTII

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

FRANCIS RACINE

DÉCEMBRE 2013

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 stipuie 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 [ii] possède un exemplaire.»

`` Tant que l'on n'a pas bien compris la liaison de toutes choses et l'enchaînement des causes et des effets, on est accablé par l'avenir. ``

-Alain

AVANT-PROPOS

La réalisation d'une maîtrise en biologie a été toute une aventure et cela n'aurait été possible sans le support de plusieurs personnes. Je prends ici le temps de les remercier.

Je remercie grandement mon directeur de laboratoire Pr Philippe Juneau pour ses connaissances transmises, ses conseils et pour tout son support. Je le remercie aussi de m'avoir accueilli dans son laboratoire tout en me laissant toute la liberté afin d'élaborer mon projet de recherche.

Je remercie aussi le Pr Philip Spear, pour ses connaissances sur le HPLC et son support très apprécié, qui a donné un second souffle à mon projet.

Je remercie tous mes collègues de laboratoire pour leurs contributions respectives; Merci à Gabrielle Vernouillet pour son soutien à mon arrivée dans le laboratoire en tant que stagiaire et pour les nombreuses discussions que l'on a eues tout au long de la maîtrise; Merci à Charles Deblois pour son enseignement sur la fluorescence et la photosynthèse et pour la générosité et la rigueur de ces commentaires scientifiques; Merci à Akash Sastri (Thank you Akash), pour le projet de méthode HPLC, cela fut un plaisir de collaborer avec toi; Merci à Annie pour sa rigueur, son professionnalisme et sa pertinence, qui nous a tous aidé à devenir de meilleurs scientifiques; Merci à Thibault Chesney pour les discussions nombreuses (sur tous les sujets) qui nous ont souvent permis de relâcher la tension et de rire un bon coup!; Merci à Kui Xu (谢谢), qui m'a beaucoup aidé pour l'analyse et la réalisation des expériences sur les états de transition.

J'ai eu la chance de collaborer avec un étudiant au doctorat d'une autre université (Concordia). Je remercie donc Medhi Sharapania (Thank you Medhi), pour sa bonne humeur contagieuse et pour m'avoir intégrer à un projet très avant-gardiste. Tu m'as redonné espoir en l'avenir de la planète.

Je remercie tous les techniciens du département des Sciences Biologiques de l'UQAM et Hélène Beaumier, pour m'avoir permis d'acquérir toute l'expérience d'enseignement que j'ai acquise en tant qu'auxiliaire d'enseignement. Je remercie aussi l'administration des Sciences Biologiques, vous avez tous été très accessibles et vous m'avez aidé rapidement quand il le fallait.

Je remercie mon père de m'avoir inspiré à devenir un homme de sciences et de m'avoir énormément soutenu, pendant de nombreuses années d'études! Je n'oublierai jamais les dimanches à regarder La semaine verte et Découverte. Je remercie ma mère, une femme exceptionnelle qui a tout fait afin que ces enfants ne manquent de rien. Tu as fait mieux que ça, car grâce à toi, je suis devenu un homme altruiste et optimiste, deux qualités humaines qui me permettent d'aider les autres, comme tu sais si bien le faire.

Je remercie enfin ma Claire, ton amour sera toujours la seule chose qui compte pour moi, je t'aime et nous vieillirons ensemble, je te le promets.

iv

TABLES DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS III
LISTE DES FIGURES
LISTE DES TABLEAUXXI
LISTE DES ABBRÉVIATIONS
RÉSUMÉ1
INTRODUCTION GÉNÉRALE
CHAPITRE I
LA PHOTOSYNTHÈSE
1.1 L'ACTIVITÉ PHOTOSYNTHÉTIQUE
1.1.1 Les complexes responsables du transport d'electrons dans le chiorophaste
1.1.3 La séparation de charges au centre réactionnel du PSII
1.1.4 Transport linéaire des électrons
1.2 LES ALGUES ET LA LUMIÈRE : IMPORTANCE DE LA DISSIPATION
1.2.1 Dissipation de l'énergie lumineuse au niveau du PSII
1.3 LA FLUORESCENCE CHLOROPHYLLIENNE
1.3.1 La cinétique de fluorescence rapide (phase OJIP)19
1.3.2 Cinétique de la fluorescence modulée ou Pulse-Amplitude Modulation (fluorométrie PAM)
1.4 LA DISSIPATION DE L'ÉNERGIE SOUS FORME NON-PHOTOCHIMIQUE 27
1.4.1 qE, un processus inductible et dépendant du pH 29
1.4.2 qT, associé aux états de transition ou déplacement des complexes antennaires collecteurs (LHC) entre les photosystèmes chez C. reinhardtii
1.4.3 qI, la photoinhibition
1.5 LES EFFETS DES INHIBITEURS DE L'ENZYME HPP-DIOXYGÉNASE
1.5.1 Les plastoquinones (PQ)41
152 Les toconhérols 44

153Les caroténoïdes 45
CHAPITRE II
IMPACT OF THE HYDROXYPHENYLPYRUVATE DIOXYGENASE (HPPD)
REINHARDTII
2.1 RESUME
2.2 ABSTRACT
2.3 INTRODUCTION
2.4 MATERIALS AND METHODS
2.4.1 Growth conditions
2.4.2 PAM fluorescence measurements
2.4.3 PEA fluorescence measurements
2.4.4 Pigment extraction
2.4.5 Chromatographic procedure
2.4.6 77k fluorescence measurements and FPSII/FPSI ratio
2.4.7 Statistical analysis
2.5 RESULTS AND DISCUSSION
2.5.1 Effect of mesotrione exposure
2.5.2 Effect of HL treatment
2.5.3 Combined effects of mesotrione and HL treatment
2.5.4 Recovery of the photosynthetic apparatus
2.6 ACKNOWLEDGEMENTS 67
2 7 REFERENCES 68
CONCLUSION 79
CONCLUSION
AUTRE CONTRIBUTION
RÉFÉRENCES

vi

LISTE DES FIGURES

Figure

Page

- 1.2 schématique de l'organisation de la Représentation membrane des thylakoïdes en cinq différents complexes protéines-pigments séparées par des transporteurs d'électrons. Les flèches représentent le chemin parcouru par les électrons ou les protons lors d'un transport linéaire chloroplastique. L'énergie lumineuse est collectée par les complexes antennaires composées de pigments collecteurs (chlorophylles a et b) et accessoires (caroténoïdes) transférée aux centres réactionnels du PSII vers celui du PSI via les transporteurs d'électrons (PQ, PC et complexe du cytochrome b₆f). Les protons générés par ce transport d'électrons linéaire sont pompés du stroma vers le lumen par les PQ et les complexe du cytochrome. Un gradient de protons s'établit et active le complexe enzymatique ATP synthétase qui convertit l'ADP en ATP, par repompage des protons vers le stroma. L'énergie libérée par ce transfert est convertie en ATP par l'ajout de phosphate inorganique à l'ADP (modifiée de Raven et

- 1.6 Voies de dissipation de l'énergie des chlorophylles excitées. Lorsqu'une Chl absorbe la lumière, celle-ci est excitée d'un état fondamental à un état excité de singulet, 1Chl*. À ce point, il existe plusieurs voies de relaxation de l'énergie afin de revenir à l'état fondamental : réémission sous forme de fluorescence (1), l'énergie peut être utilisée afin de fournir l'apport nécessaire aux réactions photochimiques (2) ou se relaxe par une dissipation sous forme de chaleur. Lorsque les mécanismes (2) et (3) sont présents, ils réduisent la quantité de fluorescence émise et sont paramétrés par qP et NPQ (parfois nommé qN). Pour finir, l'espèce 1Chl* peut produire une espèce de triplet 3Chl* (4), qui peut à son tour produire une espèce réactive oxygénée 1O2*(tirée de Müller et al., 2001).

- 1.9 Représentation schématique de l'induction de la cinétique de fluorescence obtenue à l'aide de la méthode de fluorométrie PAM. Les différents types de lumières utilisées durant les mesures sont indiqués (ML= lumière modulée ; SP=flash saturant ; AL=lumière actinique ; FR= lumière rouge lointain). Les rendements de fluorescence nécessaires aux calculs des différents paramètres de fluorescence sont aussi indiqués (F_o= fluorescence minimale ; F_m=fluorescence maximale ; F'm=fluorescence maximale adapté à la lumière ; F ou F_s= niveau de fluorescence à l'état stationnaire de transport d'électrons ; F'o=fluorescence minimale à l'état adapté à la lumière) (tirée de Juneau *et al.*, 2002).
- 1.10 Mesures de fluorescence chlorophyllienne modulée d'une feuille d'Arabidopsis. En présence d'une faible lumière de mesure, la fluorescence minimale (F₀) est observée. Lorsqu'un pulse de lumière saturante est apposé, permettant l'obtention de la fluorescence maximale (F_m), les processus photosynthétiques sont saturés. Sous illumination continue, le quenching photochimique (qP) et le quenching non-photochimique (qN=qT+qE+qI) sont responsables de la baisse du rendement de la fluorescence (F'_m). Après l'arrêt de la lumière actinique, la récupération en quelques minutes du F'_m, montre que la majorité du qN est dépendant du qE (tirée de Müller et al., 2001).

viii

- 1.11 Représentation schématique des réactions du cycle des xanthophylles et des différents cofacteurs nécessaires à son bon fonctionnement. La réaction purement biochimique est une transformation réversible du pool de violaxanthine en zéaxanthine via l'intermédiaire anthéraxanthine. Ces réactions d'époxydation sont catalysées par des enzymes situées en des sites opposés de la membrane du thylakoïde, soit la violaxanthine de-époxidase (VDE) située dans le lumen de la membrane du thylakoïde et la zéaxanthine époxidase (ZE) située dans le stroma du chloroplaste. L'activité de la VDE, nécessitant un cofacteur (l'acide ascorbique), est strictement régulée par le pH dans le lumen et devient active à un pH inférieur à 5.8. Cette conversion s'accomplit in vivo et in vitro dans des temps situés entre 10 et 30 minutes. De plus, ce processus, dépendant du pH, s'assure que la zéaxanthine soit accumulée en condition saturante de lumière, car c'est la zéaxanthine qui possède davantage le pouvoir antioxydant face aux conséquences de l'énergie excessive provenant de la lumière. Lors d'un retour au noir ou sous intensité faible de lumière, le pool de zéaxanthine se reconverti en violaxanthine à l'aide de l'enzyme ZE, qui l'effectue jusqu'à 10 fois plus lentement que la réaction

- 1.15 Représentation schématique résumée de la voie de biosynthèse des caroténoïdes. L'enzyme phytoène désaturase (PDS) affectée indirectement par la mésotrione, car les PQ oxydées pouvant accepter des électrons (et des H⁺) sont des cofacteurs de cette enzyme (et de la ζ-carotène désaturase aussi) (modifiée de Norris et al., 1995)............40

X

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU

PAGE

2.1 Effect of mesotrione, HL treatment and combined effect (HL + mesotrione) on fluorescence quenching repartition of energy (qP, qN, UQFrel) and photosynthetic activity parameters (ΦM and $\Phi'M$), in percentage from control. Measurements were done before and after a 75 minutes high light treatment ($1100\mu E/m2/s$) of low light acclimated C. reinhardtii cultures. Data are means \pm SD (n=5-6). Within the same treatment, values followed by one asterisk are significantly different from the control and by two asterisks, values are significantly different from control in HL (student test).

- 2.2 Effect of mesotrione, HL treatment and combined effect (HL + mesotrione) on qPQ, qEmax, ABS/RC and DI_o/RC, before and after a 75 minutes high light treatment $(1100\mu E/m^2/s)$ of C. reinhardtii, in percentage from control. Measurements were done before and after a 75 minutes high light treatment $(1100\mu E/m^2/s)$ of low light acclimated C. reinhardtii cultures. Data are means ± SD of two independent experiments in triplicate (n=6). Within the same treatment, values followed by one asterisk are significantly different from the control and by two asterisks, values are significantly
- 2.3 Effect of mesotrione, HL treatment and combined effect (HL + mesotrione) on pigment composition and α -tocopherol content per cell after a 75 minutes high light treatment (1100µE/m²/s) of C. reinhardtii, in percentage from control (% pg/cell). Measurements were done before and after a 75 minutes high light treatment $(1100\mu E/m^2/s)$ of low light acclimated C. reinhardtii cultures. Data are means \pm SD (n=4). Within the same treatment, values followed by one asterisk are significantly different from the control and by two asterisk, values are significantly different from control in HL (student-test).

2.4 Effect of mesotrione, HL and interaction between HL and mesotrione on ratio of antennas between PSII and PSI of C. reinhardtii whole-cells. Peaks wavelengths of PSII and PSI were determined graphically as 690.5nm and 720nm: ratio of PSII/PSI was then calculated by $F_{690.5nm}$ / F_{719nm} . Results are means ± (SD), calculated from one or two independent experiments in triplicates, in which each replicate was measured twice to assure reproducibility of the method (n=3-6). Within the same treatment, values followed by one asterisk are significantly different from the control and by two asterisks, values are significantly different from control in HL (Tukey test)......77



LISTE DES ABBRÉVIATIONS

.

¹ Chl, ³ Chl	Chlorophylle excitée sous forme de singulet et triplet
¹ O ₂	Dioxygène excité sous forme de singulet
ABS	Absorbance
ADP	Adénosine diphosphate
Ant	Anthéraxanthine
ATP	Adénosine triphosphate
Car	Caroténoïdes
CDO	Complexe émetteur d'oxygène
Chl	Chlorophylle
Cyt. b ₆ f	Complexe du cytochrome b ₆ f
DI	Dissipation
ELL	Lumière d'intensité très faible $(2\mu E/m^2/s)$
ERO	Espèces réactives oxygénées
F'm	Niveau de fluorescence maximale, à l'état adapté à la lumière (centres réactionnels fermés)
F'o	Niveau de fluorescence minimale, à l'état adapté à la lumière
F _{690,5nm ou} F _{PSII}	Pic de fluorescence chlorophyllienne correspondant au PSII (à 77K)
F _{719nm} ou F _{PSI}	Pic de fluorescence chlorophyllienne correspondant au PSI (à 77K)
F _m	Rendement de fluorescence maximale lorsque les centres réactionnels des PSII sont fermés (quinones réduites)

xiv	
Fo	Rendement de fluorescence minimal lorsque les centres réactionnels des PSII sont ouverts (quinones oxydées)
F _{PSII} /F _{PSI}	Ratio de la fluorescence chlorophyllienne émise par le PSII et le PSI (à 77K)
Fs	Niveau de fluorescence à l'état stationnaire de transport d'électrons
HPPD	Enzyme p-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase
LHCII	Complexe collecteur de lumière du PSII (<i>light harvesting complex,</i> aussi nommé CPCII)
Lut	Lutéine
Mn	Atome de manganèse
NADPH, NADP ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite et oxydée
Neo	Néoxanthine
NPQ	«Non-photochemical quenching»
P680	Centre réactionnel du PSII
P700	Centre réactionnel du PSI
PAM	«Pulse-Amplitude-Modulated fluorescence»
PC	Plastocyanines (transporteur d'électrons)
PDS	Enzyme phytoène désaturase
PEA	«Plant Efficiency Analyzer»
Phéo	Phéophytine (transporteur d'électrons)
PQ	Plastoquinone oxydée
PQH ₂	Plastoquinol, plastoquinone réduite

PSII	Photosystème II
Q _A ou PQ _A	Quinone A, accepteur primaire d'électron du PSII
Q _B ou PQ _B	Quinone B, accepteur secondaire d'électron du PSII
qE	«Energy-dependant <i>quenching»</i> (associé à l'établissement d'un ΔpH transthylakoïdien)
q _{Emax}	«Maximal capacity of energy-dependant quenching» (associé à l'établissement d'un ΔpH transthylakoïdien)
qI	<i>Quenching</i> non-photochimique associé à la photoinhibition du PSII
qN	Quenching par voie non-photochimique
qN _{rel}	«Relative non-photochemical quenching coefficient»
qP	Quenching par voie photochimique
qPQ	Quenching réalisé par les plastoquinones oxydées
qP _{rel}	«Relative photochemical quenching coefficient»
qT	Quenching associé au mécanisme de state transition
RC	Centre réactionnel
<i>State-1</i> to <i>state-2</i> transition	Les complexes collecteurs de lumière du PSII (LHCII) se déplacent du PSII vers le PSI
State-2 to state-1 transition	Les complexes collecteurs de lumière du PSII se déplacent du PSI vers le PSII
t _{Fm}	Temps écoulé pour atteindre la fluorescence maximale (en millisecondes)
Toc.	Tocophérol

XVI	
Tyr. ou Z	Résidu d'acide aminé tyrosine
UQF _{rel}	«Relative unquenched fluorescence»
VDE	Violaxanthine de-époxydase
Viola	Violaxanthine
W	Watt
ZE	Enzyme zéaxanthine époxydase
Zea	Zéaxanthine
Φ' _M	Efficacité photochimique opérationnelle du PSII, à l'état stationnaire de transport des électrons
$\Phi_{\rm M}$ ou F _v /F _M	Efficacité photochimique maximale du PSII, à l'état adapté à la noirceur

RÉSUMÉ

Les effets d'un inhibiteur (mésotrione) de l'enzyme p-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase (HPPD) sur les mécanismes photochimiques et non-photochimiques de dissipation d'énergie au niveau du PSII ont été étudiés, lorsque des cultures de C. reinhardtii ont été exposées 24h à l'inhibiteur, soumises à un stress lumineux et retirées du stress lumineux, afin d'observer la récupération de leur activité photosynthétique. Les propriétés fonctionnelles du PSII et la dissipation sous forme photochimique et non-photochimique de l'énergie ont été évaluées par fluorescence chlorophyllienne à température ambiante. La composition pigmentaire (Chl, carotènes, xanthophylles) ainsi que la teneur en a-tocophérol ont été évaluées par chromatographie liquide à haute performance, tandis que l'évaluation des états de transition des antennes collectrices a été réalisée par fluorescence à basse température (77K). Nous avons conclu que les processus de dissipation de l'énergie sont affectés par l'inhibiteur et indiqué par une baisse du qE_{max} et par le mouvement d'une portion des antennes du PSI vers le PSII. Nous avons démontré qu'une certaine portion des LHCII est très sensible au niveau d'oxydoréduction des PQ, alors qu'un changement dans les états de transition a pu être induit par de minimes changements dans la quantité de lumière arrivant aux PSII. Nous suggérons que cette portion des LHC ne possède pas de rôle prépondérant dans le maintien de l'activité photosynthétique du PSII pour C. reinhardtii acclimaté sous lumière d'intensité faible. Lors de l'application du stress lumineux, nos résultats révèlent un effet de potentialisation de l'inhibiteur en présence d'un stress lumineux sur les processus non-photochimiques de dissipation de l'énergie et les propriétés fonctionnelles du PSII chez C. reinhardtii. Nous concluons que l'inhibition de l'enzyme HPPD induit une altération des mécanismes de dissipation de l'énergie en excès et cela indique que l'HPPD possède un rôle majeur dans la photosynthèse chez C. reinhardtii, particulièrement en situation de stress lumineux et de récupération après ce même stress.



INTRODUCTION GÉNÉRALE

La photosynthèse représente l'ensemble des réactions permettant aux organismes photosynthétiques de transformer l'énergie lumineuse en énergie chimique. L'absorption de la lumière par les antennes collectrices (par les chlorophylles et les caroténoïdes) crée la séparation de charges au centre réactionnel du PSII nécessaire à la scission de la molécule d'eau en oxygène et en protons. Le transport d'électrons s'effectue du centre réactionnel P680 (PSII) vers la phéophytine (Phéo) via une série de transporteurs membranaires (dans l'ordre Q_A , Q_B , PQ, cytochrome $b_6 f$, PC) et par conséquent la réduction du NADP⁺ en NADPH + H⁺, au niveau du P700 (PSI). Pendant ce transport d'électrons, des protons sont relargués dans le lumen du thylakoïde et l'établissement d'un gradient de protons transthylakoïdal active l'enzyme ATP synthétase, qui phosphoryle l'ADP en ATP, une molécule énergétique utilisable par l'organisme. L'ATP et le NADPH vont être utilisés afin de créer l'énergie chimique (glucides) via le cycle de Calvin. (Whitmarsh et Govindjee, 1999) Évidemment, tous ces processus, étant interdépendants sont devenus autant des cibles d'inhibition pour les herbicides modernes utilisés en majorité par les activités agricoles.

Il est reconnu que les herbicides peuvent affecter plusieurs voies du métabolisme cellulaire en étant, entre autres, des inhibiteurs de la photosynthèse ou des inhibiteurs de la biosynthèse des lipides, des protéines, des pigments photosynthétiques principaux (Chl-*a* et Chl-*b*) ou accessoires (caroténoïdes) (Juneau *et al.*, 2007 ; Tomlin, 2000). En milieu naturel, les plantes et les algues sont régulièrement exposées à des changements au niveau de la quantité de lumière qui leur provient du soleil.

Malgré le fait que les réactions qui convertissent l'énergie lumineuse en énergie chimique sont extrêmement efficaces, leur capacité peut être limitée par des stress environnementaux, incluant le stress lumineux, la sécheresse, la température, la limitation en nutriments et l'exposition aux métaux ou aux herbicides (Demmig-Adams et Adams, 1992; Juneau *et al.*, 2007).

Dans le contexte d'une exposition à une lumière plus intense que la lumière de croissance, l'organisme va absorber une quantité excessive d'énergie lumineuse, ce qui peut mener conséquemment à des altérations majeures de l'appareil photosynthétique si le stress lumineux se prolonge dans le temps.

Ce phénomène, nommé photoinhibition, est généralement dû au dommage oxydatif de l'appareil photosynthétique et il peut être constaté, entre autres, par une fermeture et/ou une destruction des centres réactionnels. Ce mécanisme peut à première vue paraître contreproductif pour l'organisme photosynthétique, mais il est justement un mécanisme important pour sa survie puisqu'il lui permet de diminuer l'absorption de l'énergie lumineuse pendant l'épisode de stress.

Heureusement, les organismes photosynthétiques ont développé des mécanismes de protection afin de limiter l'impact d'éventuelles absorptions excessives de l'énergie lumineuse. En particulier, les caroténoïdes jouent un rôle essentiel dans la photoprotection (Jahns *et al.*, 2009). En effet, ils possèdent la capacité d'absorber l'énergie excessive des chlorophylles (*i.e.* ³Chl) et des espèces réactives oxygénées (¹O₂) produites dans les antennes collectrices et les centres réactionnels des photosystèmes. Ces pigments protecteurs sont donc extrêmement importants et lorsque leur taux de biosynthèse diminue, leur rôle protecteur ne peut être maintenu dans l'organisme (Sandmann *et al.*, 1993).

Les tocophérols sont tout aussi indispensables à la réponse face au stress oxydatif, puisqu'ils désactivent, en se consumant, les ERO produites dans les centres réactionnels et les antennes collectrices (Trebst *et al.*, 2002). De plus, les tocophérols sont considérés comme des protecteurs des membranes du thylakoïde, car ils inhibent la peroxydation des lipides membranaires, empêchant ainsi la désorganisation des complexes transporteurs d'électrons (Havaux *et al.*, 2005; Kruk *et al.*, 2005).

Les plastoquinones possèdent trois rôles susceptibles d'influencer à la fois le transport d'électrons (réactions photochimiques) et la dissipation de l'énergie sous forme de chaleur ou de fluorescence (réactions non-photochimiques). Transporteur d'électrons (de Q_B vers le cyt. $b_6 f$) et de protons (établissement d'un ΔpH transthylakoïdien), les PQ sont aussi partiellement responsables de la régulation des transitions d'états (*state transition*) et de la synthèse des caroténoïdes par son rôle de cofacteur auprès de l'enzyme phytoène désaturase (PDS), l'enzyme impliquée dans la biosynthèse des caroténoïdes.

Dans le cadre de ce mémoire, un herbicide (mésotrione) inhibant compétitivement l'enzyme p-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase (HPPD) a été utilisé afin de caractériser l'importance et le rôle de cette enzyme dans les processus photochimiques et nonphotochimiques de dissipation de l'énergie lumineuse chez *Chlamydomonas reinhardtii*.

En résumé, l'enzyme HPPD, qui participe à la conversion du résidu tyrosine (Tyr) en PQ et en tocophérols, est aussi indirectement impliquée dans la biosynthèse des caroténoïdes via le rôle de cofacteur essentiel à l'activité de l'enzyme PDS réalisé par les PQ (Garcia *et al.,* 1999; Prisbylla *et al.,* 1993). À cela s'ajoute d'autres processus non-photochimiques de dissipation de l'énergie possiblement affectés par la mésotrione, comme le mouvement des antennes collectrices entre les photosystèmes et l'activation du cycle des xanthophylles.

En bref, on constate que les molécules dont la biosynthèse est théoriquement affectée par l'herbicide mésotrione (caroténoïdes, plastoquinones et α -tocophérol) sont des acteurs directs dans les mécanismes de protection contre l'excès d'énergie lumineuse absorbée par les organismes photosynthétiques. Malgré le fait qu'il existe des connaissances au niveau du mode d'action des inhibiteurs d'HPPD chez les plantes et les algues, il n'existe aucune étude sur leurs effets sur les processus de dissipation de l'énergie sous forme photochimiques et non photochimiques chez *C. reinhardtii.*

L'objectif global de notre travail de recherche consiste à étudier les effets d'un inhibiteur d'HPPD sur les processus de dissipation d'énergie sous formes photochimique et non-photochimique, sur la composition pigmentaire ainsi que la teneur en tocophérols. Au chapitre II, les effets de l'inhibition de l'HPPD sur la dissipation d'énergie dans la photosynthèse vont être étudiés dans le but de comprendre l'interdépendance entre les réactions photochimiques (transport d'électrons et de protons) et les différentes voies de dissipation d'énergie (*i.e.* cycle des xanthophylles, établissement d'un Δ pH transthylakoidien, *state transition*, photoinhibition).

Dans le but de caractériser la dissipation de l'énergie lumineuse absorbée chez *C. reinhardtii, les* deux modulateurs utilisés seront l'exposition à une lumière élevée (10 fois plus élevée que la lumière de croissance) ainsi que l'exposition à un inhibiteur d'HPPD. Dans notre étude, l'utilisation de la mésotrione à des concentrations qui n'affectent pas la croissance, peut offrir un grand avantage dans l'étude du rôle de l'enzyme HPPD et des molécules dont elle gère la synthèse (PQ, tocophérols, caroténoïdes).

CHAPITRE I

LA PHOTOSYNTHÈSE

1.1 L'ACTIVITÉ PHOTOSYNTHÉTIQUE

La photosynthèse représente l'ensemble des réactions permettant aux organismes photosynthétiques (algues, plantes supérieures et quelques bactéries (cyanobactéries)) de transformer l'énergie lumineuse en énergie chimique. Nous pouvons résumer la photosynthèse par l'équation suivante (Whitmarsh et Govindjee, 1999) :

 $6 \text{ CO}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O} + \text{Énergie lumineuse} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{ O}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O}$

La photosynthèse est divisée en deux phases distinctes : la phase photochimique (dépendante de la lumière) et la phase du cycle de Calvin ou phase biochimique (indépendante de la lumière). La phase photochimique inclue tous les processus photosynthétiques qui convertissent l'énergie lumineuse en énergie chimique. Les électrons et les protons générés par la photolyse de l'eau sont transportés afin de synthétiser l'adénosine triphosphate (ATP) et le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) (Hopkins, 2003).

La phase biochimique concerne toutes les réactions biochimiques ayant lieu dans le cycle de Calvin. Il est responsable de l'assimilation du CO_2 et de sa transformation en glucides, par consommation de l'ATP et du NAPDH synthétisés en présence de lumière. Le siège de l'ensemble des deux phases est le chloroplaste, un organite dont la structure est complexe mais bien connue (*Fig.1.1* A, B et C).



Figure 1.1 A) Micrographie électronique à transmission d'un chloroplaste. B) Structure schématique d'un chloroplaste. C) Micrographie électronique à transmission de thylakoïdes empilés (Grana ; riche en PSII) ou non (thylakoïdes stromatiques; enrichis en PSI) (modifiée à partir de Karp, 2009; Staehelin et Arntzen, 1986).

L'enveloppe extérieure du chloroplaste est composée de deux membranes (externe et interne). À l'intérieur du chloroplaste, on retrouve un liquide dense appelée stroma, dans lequel baignent des sacs membraneux aplatis appelés thylakoïdes. Les membranes du thylakoïdes, lieu où se déroulent les réactions photochimiques, délimitent l'espace intrathylakoïdien (lumen) et dépendant de leur organisation, sont nommés grana (empilement dense de membranes de thylakoïdes ou dits thylakoïdes accolés) ou thylakoïdes stromatiques (non-accolés). Dans les granas, les photosystèmes II (PSII) y sont enrichis, tandis que les photosystèmes I (PSI) sont concentrés dans les thylakoïdes de stroma (Ort *et al.*, 1996).

1.1.1 Les complexes responsables du transport d'électrons dans le chloroplaste

À la figure 1.2, on montre les cinq principaux complexes protéines-pigments responsables du transport d'électrons chloroplastique : 1. Les complexes antennaires collecteurs (sont composés de pigments de chlorophylles (a et b) et de caroténoïdes qui collectent l'énergie et la transfèrent par résonance jusqu'au centre réactionnel du PSII et du PSI, nommé P680 et P700); 2. Les centres réactionnels du PSII et du PSI (sièges des réactions photochimiques primaires provoquées par l'arrivée d'énergie des complexes antennaires collecteurs); 3. Des transporteurs d'électrons qui lient les PSII au PSI (les plastoquinones (PQ), les complexes cytochromes b_6f et les plastocyanines (PC)); 4. Le complexe NADP réductase qui, à l'aide d'un électron provenant de la ferrédoxine réduite et d'un proton provenant du stroma, transforme le NADP⁺ en NADPH, une molécule énergétique; 5. Le complexe de l'ATP synthétase (un système enzymatique transmembranaire, qui permet la synthèse d'ATP par pompage du flux de protons du lumen vers le stroma).

Ensemble, le transport d'électrons et la force proton-motrice vont permettre la synthèse du NADPH et de l'ATP, deux molécules énergétiques nécessaires, entre autres, à la fixation du carbone par le cycle de Calvin.

7



Figure 1.2 Représentation schématique de l'organisation de la membrane des thylakoïdes en cinq différents complexes protéines-pigments séparées par des transporteurs d'électrons. Les flèches représentent le chemin parcouru par les électrons ou les protons lors d'un transport linéaire chloroplastique. L'énergie lumineuse est collectée par les complexes antennaires composées de pigments collecteurs (chlorophylles a et b) et accessoires (caroténoïdes) transférée aux centres réactionnels du PSII vers celui du PSI via les transporteurs d'électrons (PQ, PC et complexe du cytochrome b₆f). Les protons générés par ce transport d'électrons linéaire sont pompés du stroma vers le lumen par les PQ et les complexe du cytochrome. Un gradient de protons s'établit et active le complexe enzymatique ATP synthétase qui convertit l'ADP en ATP, par repompage des protons vers le stroma. L'énergie libérée par ce transfert est convertie en ATP par l'ajout de phosphate inorganique à l'ADP (modifiée de Raven et Johnson, 2002).

1.1.2 L'absorption de la lumière et le complexe antennaire du PSII

L'absorption de la lumière s'effectue grâce aux complexes antennaires collecteurs, qui sont composés principalement de Chl-*a* et secondairement de Chl-*b* et de caroténoïdes chez la plupart des algues vertes et des plantes supérieures. Chaque pigment possède leur structure et leur spectre d'absorption de la lumière, ce dernier étant représenté à la figure 1.3 pour les principaux types de pigments photosynthétiques.



Figure 1.3 Spectre d'absorption des différents types de pigments photosynthétiques (tirée de Raven et al., 2003).

Les différents spectres d'absorption couvrent l'ensemble des longueurs d'ondes utilisées par la photosynthèse afin de former l'énergie chimique. La bonne régulation de la synthèse des pigments devient alors indispensable pour l'algue (et la plante) afin d'utiliser le plus d'énergie possible sans provoquer de dommages à la chaîne de transport d'électrons.

Le complexe antennaire du PSII peut se distinguer en deux types : une antenne interne et une antenne périphérique. L'antenne interne (*fig. 1.4*), associée au centre réactionnel du PSII, est constituée de protéines (CP43 et CP47), respectivement codées par les gènes correspondants *psbC* et *psbB*. Approximativement, 40 molécules de Chl et 10 β carotène lient l'antenne interne au centre réactionnel du PSII (P680), permettant le transfert de l'énergie lumineuse vers le P680 (Barber et Kühlbrandt, 1999).

L'antenne périphérique ou LHCII, est constituée de complexe protéinique (CP29, CP26 et CP24) et pigmentaires (composées de Chl-*a*, Chl-*b* et de caroténoïdes comme la lutéine, la violaxanthine et la néoxanthine) (Bassi *et al.*, 1997). Un changement dans les conditions environnementales de l'organisme photosynthétique permet la modulation de la composition et de la taille des complexes antennaires périphériques (Horton *et al.*, 1996). Ensemble les complexes antennaires périphériques (nommés Lhcb 1 à 3 pour le LHCII et Lhcb 4 à 6 pour les protéines CP29, CP26 et CP24) permettent le transfert d'énergie des LHCII jusqu'au centre réactionnel du PSII, en passant par les CP43 et CP47 (Bassi *et al.*, 1997).



Figure 1.4 Schématisation du centre réactionnel du PSII, des antennes internes (*inner antenna*) et externes (LHCII), du complexe émetteur d'oxygène (CDO) et des molécules impliquées dans la séparation de charge nécessaire au transport d'électrons chloroplastique. Le sens du transport d'électrons est représenté par des étapes distinctes (1 à 6). Les symboles suivants représentent : Mn=atome de manganèse; P680=Centre réactionnel du PSII; PQ_A et $PQ_B = Q_A$ et Q_B (tirée de Karp, 2009).

1.1.3 La séparation de charges au centre réactionnel du PSII

L'absorption de l'énergie lumineuse provoque rapidement (10^{-15} s) l'excitation des Chl dans les antennes collectrices et un transfert d'énergie s'effectue d'une molécule à l'autre. Ce transfert d'énergie par résonance s'effectue aléatoirement jusqu'à atteindre une paire de Chl spécialisées situées dans le centre réactionnel du PSII, le P680 : P680 passe alors de l'état stable à l'état excité (P680*) (illustré à la figure 1.5).

11

Lorsque le P680 absorbe 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 l'électron fourni par le complexe de dégagement d'oxygène (CDO). En résumé, il faut au minimum quatre charges positives sur le CDO, par conséquent quatre séparations de charge (4 photons) sont nécessaires pour la photooxydation de l'eau et le dégagement d'oxygène (Dekker et Van Grondelle, 2000).

La séparation de charge est présentée par les équations:

a) P680 + énergie lumineuse -----> P680*

b) P680* + Phéo----> P680⁺ + Phéo⁻

c) $P680^+ + Z = P680 + Z^+$

d) $Z^+ + CDO ----> Z + CDO^+$

e) $CDO^{4+} + 2 H_20 ----> CDO + O_2 + 4H^+$

1.1.4 Transport linéaire des électrons

Suivant la séparation de charge au PSII et la réduction de la Phéo, l'électron sera transféré vers des accepteurs d'électrons : les quinones (Q_A , Q_B et PQ), et ensuite au cytochrome b₆f et au plastocyanines (PC) (Figure 1.5). Le transfert des électrons est accompagné d'un transport transmembranaire de protons (Baker *et al.*, 2007). La PQ, liée au site Q_B accepte deux électrons de Q_A . Les deux charges négatives sur la PQ sont ensuite annihilées par deux protons (PQH₂) en provenance du *stroma*. Les plastoquinones réduites (PQH₂) se dissocient alors du site Q_B et les protons sont relargués dans le *lumen* du thylakoïde : le cycle peut alors recommencer (Helier *et al.*, 1998). Les protons relargués dans le lumen vont être utilisés par l'ATP synthase afin de produire l'ATP nécessaire à la synthèse des glucides dans le cycle de Calvin. Les PQ, libérées des protons, vont transférer leurs électrons au cytochrome b₆f et par une chaîne d'oxydoréduction seront transmis aux PC (les donneurs d'électrons du PSI). Le schéma en Z (Figure 1.5) représente fidèlement ces différents processus.



Figure 1.5 Schéma en Z de la photosynthèse. Le flux d'électrons provenant de l'H2O vers le NADP+ y est présenté. Les relations énergétiques entre les différents acteurs du transport d'électrons, sont déterminées par les potentiels d'oxydoréduction situé en ordonné : plus on s'élève sur l'ordonnée, plus l'énergie contenue dans les molécules concernées est importante (traduit de Whitmarsh, 2000).

1.2 LES ALGUES ET LA LUMIÈRE : IMPORTANCE DE LA DISSIPATION

En milieu naturel, les algues sont exposées régulièrement à des changements au niveau de la quantité de lumière qui leur provient du soleil. Malgré le fait que les réactions qui convertissent l'énergie lumineuse en énergie chimique sont extrêmement efficaces, leur capacité peut être limitée par des stress environnementaux, qui incluent la sécheresse, la température, la limitation en nutriments, l'exposition aux métaux ou aux herbicides (Demmig-Adams et Adams, 1992; Juneau *et al.*, 2007). Justement, les herbicides peuvent affecter plusieurs voies du métabolisme cellulaire en étant, entre autres, des inhibiteurs de la photosynthèse ou des inhibiteurs de la biosynthèse des lipides, des protéines, des pigments photosynthétiques principaux (Chl-a et Chl-b) ou accessoires (caroténoïdes) (Juneau *et al.*, 2007; Tomlin, 2000).

Il est connu que la lumière est essentielle à la croissance des plantes, mais elle peut aussi être néfaste aux végétaux (Müller *et al.*, 2001). D'ailleurs, l'absorption excessive d'énergie lumineuse peut mener à des altérations majeures de l'appareil photosynthétique. Afin d'éviter les dommages causés par une absorption excessive de lumière par l'organisme photosynthétique, ceux-ci ont développé plusieurs processus de dissipation de l'énergie, dont les principaux seront étudiés dans le cadre de ce mémoire. En particulier, nous étudierons la dissipation de l'énergie au niveau du PSII grâce, entre autres, à l'étude de la fluorescence chlorophyllienne. 1.2.1 Dissipation de l'énergie lumineuse au niveau du PSII

Quand la lumière excite une molécule de chlorophylle (Chl) des antennes ou des centres réactionnels des photosystèmes, celle-ci peut atteindre plusieurs états d'excitations (singulet, triplet). La Chl, sous forme excitée de triplet, peut interagir avec l'oxygène moléculaire en y transférant de l'énergie et l'espèce réactive oxygénée (ERO) ainsi produite peut à son tour oxyder des molécules environnantes (ex : lipides, protéines). Justement, le schéma de la figure 1.6 montre les différentes voies possibles de dissipation de l'énergie de la Chl excitée sous forme singulet ou triplet (tirée de Müller *et al.*, 2001) :

1. Dissipation sous forme de fluorescence

2. Dissipation par les voies de la photochimie

3. Dissipation sous forme de chaleur (non-photochimique)

4. Formation d'espèces réactives oxygénées (ERO)

Dans le cadre de ce mémoire, nous évaluerons les 3 premières formes de dissipation de l'énergie (fluorescence, photochimie et non-photochimique) en utilisant comme modulateurs, le stress lumineux et un herbicide affectant théoriquement l'une ou plusieurs de ces voies dissipatives de l'énergie. L'interdépendance de ces mécanismes de dissipation nous permettra une analyse globale des processus, en mesurant la dissipation sous forme de fluorescence principalement émise par les Chl-*a* du PSII.

16



Figure 1.6 Voies de dissipation de l'énergie des chlorophylles excitées. Lorsqu'une Chl absorbe la lumière, celle-ci est excitée d'un état fondamental à un état excité de singulet, 1Chl*. À ce point, il existe plusieurs voies de relaxation de l'énergie afin de revenir à l'état fondamental : réémission sous forme de fluorescence (1), l'énergie peut être utilisée afin de fournir l'apport nécessaire aux réactions photochimiques (2) ou se relaxe par une dissipation sous forme de chaleur. Lorsque les mécanismes (2) et (3) sont présents, ils réduisent la quantité de fluorescence émise et sont paramétrés par qP et NPQ (parfois nommé qN). Pour finir, l'espèce 1Chl* peut produire une espèce de triplet 3Chl* (4), qui peut à son tour produire une espèce réactive oxygénée 102*(tirée de Müller et al., 2001).
1.3 LA FLUORESCENCE CHLOROPHYLLIENNE

Dans des conditions physiologiques, les antennes collectrices du PSII sont la source dominante de fluorescence chlorophyllienne (Krause et Jahns, 2003). Après l'illumination d'un organisme photosynthétique, la fluorescence réémise par les appareils photosynthétiques présente une intensité variable lorsque observée en fonction du temps (cinétique) : cette cinétique de fluorescence, nommée «effet Kautsky» a été découvert par Kautsky et Hirsh (1931).

Lorsque les processus photochimiques et non-photochimiques de dissipation de l'énergie lumineuse sont affectés par un stress environnemental, la fluorescence émise augmente, puisque tous ces processus sont interdépendants (revoir figure 1.6). Par exemple, lorsque les processus photochimiques sont saturés (*i.e.* soit par une incidence lumineuse d'intensité élevée ou une exposition à un herbicide, qui tous deux provoquent un blocage du transport d'électrons), la proportion d'énergie absorbée par ces processus sera diminuée. Par conséquent, la proportion de l'énergie incidente qui ne peut être captée par les processus photochimiques, sera réémise sous forme de chaleur et/ou sous forme de fluorescence. Justement, la mesure de cette fluorescence permet d'évaluer le taux de performance photosynthétique et représente aussi l'état de l'appareil photosynthétique (Maxwell et Johnson, 2000 ; Ralph *et al.*, 2007). Un changement dans la fluorescence chlorophyllienne suite à l'exposition d'un organisme photosynthétique à un herbicide peut être mesuré et ainsi fournir une indication concernant son impact sur les processus photosynthétiques de l'organisme (Krause et Jahns, 2003).

La mesure de la fluorescence chlorophyllienne est une méthode rapide, sensible et non invasive (Samson *et al.*, 1999; White et Critchley, 1999).

Les fluorimètres sont des appareils qui mesurent d'infimes changements dans la fluorescence émise et nous permettra une analyse de l'état physiologique de l'algue en fonction des divers traitements.

18

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons étudié l'activité photosynthétique dans diverses conditions environnementales avec deux appareils de mesure de la fluorescence : par la cinétique de fluorescence rapide (Plant Efficiency Analyzer; Hansatech PEA) et la cinétique de fluorescence modulée (Pulse-Amplitude Modulated; Walz PAM).

1.3.1 La cinétique de fluorescence rapide (phase OJIP)

La cinétique de fluorescence rapide, permet d'analyser l'état du transport des électrons et l'état de réduction des quinones (Force *et al.*, 2003; Strasser et Strasser, 1995; Strasser *et al.*, 2000 ;). À partir de la valeur initiale (F_o) mesurée à 50 µs, l'intensité de la fluorescence atteint sa valeur maximale (F_m) en moins d'une seconde, à l'aide d'un flash saturant de lumière. Le fluorimètre PEA (*Plant Efficiency Analyser*) prend des mesures à intervalles réguliers (pendant 1 à 6 s) ce qui permet de tracer une courbe qui reflète le transport des électrons du complexe de dégagement d'oxygène jusqu'au pool de plastoquinones (Krause et Jahns, 2003 ; Strasser et Srivastava, 1995). Lorsque présentée sur une échelle logarithmique, la cinétique obtenue montre les transitions de phase nommée 0, J, I et P (figure 1.7). L'analyse des transitions de phase (*JIP-test*) paramétrée par Strasser et Strasser (1995), nous permet d'expliquer les flux d'énergie au niveau du centre réactionnel du PSII (figure 1.8).

Ces transitions représentent les différents états d'oxydoréduction des transporteurs d'électrons associés au PSII et permettent le calcul de nombreux paramètres reliés au flux d'énergie autour du PSII.



Figure 1.7 Cinétique typique de fluorescence rapide des Chl-*a* montrant les transitions OJIP mesurées pendant l'illumination (pic à 650nm; 3200 μ mol photons m⁻²s⁻¹) d'une feuille de luzerne adaptée à la noirceur, en fonction du temps en échelle logarithmique. Les transitions O, F₃₀₀, J, I et P représentent les valeurs de fluorescence aux temps 0.05, 0.30, 2, 30 et t_{Fm} (ms) (modifiée de Tsimilli-Michael *et al.*, 2000).

La complexité de la structure des antennes (arrangement des pigments, la migration de l'énergie et la connectivité des antennes) peut aussi être étudiée par cette méthode, ce qui en fait une technique de choix pour l'étude de la dissipation de l'énergie par le PSII.

20



Figure 1.8 Modèle simplifié des flux d'énergies au niveau de l'appareil photosynthétique et basé sur la théorie des flux d'énergie proposée par Strasser (1978, 1981).

21

Dans le cadre de ce mémoire, par l'utilisation de la cinétique de fluorescence rapide des chlorophylles, nous avons calculé les paramètres suivants :

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

 $ABS/RC = M_o / V_J / (F_M - F_{50 \mu sec} / F_M)$

(Force et al., 2003)

où :

 $M_o = F_{300\mu sec} - F_{50\mu sec} / (F_M - F_{50\mu sec}) X 0.25$ représente la vitesse initiale de l'induction de la fluorescence variable

 $V_J = (F_{2msec} - F_{50\mu sec} / F_M - F_{50\mu sec})$ représente le taux de la réduction de Q_A .

-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_o) est évaluée par le ratio, DI_o / RC :

 $DI_{o} / RC = ABS/RC - M_{o} / V_{J}$

(Strasser et al., 2000)

-Le *quenching* de la fluorescence du PSII associé aux plastoquinones oxydées du pool de PQ ou l'amplitude maximale du *quenching* par les PQ (q_{PQ}) :

$$q_{PO} = (F_M - F_{30ms}) / (F_M - F_{50us})$$

(Strasser et al., 1999)

-La capacité maximale du *quenching* non-photochimique dépendant du ΔpH transthylakoïdien (qE_{max}):

 $qE_{max} = (F_M - F_{6s}) / F_M \qquad (Strasser et al., 1999)$

1.3.2 Cinétique de la fluorescence modulée ou Pulse-Amplitude Modulation (fluorométrie PAM)

Sensible et rapide, cette technique est maintenant reconnue pour sa grande efficacité à évaluer l'effet de stress environnementaux sur les processus photosynthétiques (Havaux *et al.*, 2000; Juneau *et al.*, 2007; Krause et Weis, 1991; Marwood *et al.*, 2000; Schreiber *et al.*, 1994, 2002). Afin d'oxyder les quinones Q_A (l'accepteur primaire des électrons provenant du PSII), après 15 minutes au noir, la fluorescence initiale constante (F_o) est mesurée par l'entremise d'une lumière modulée (ML) de faible intensité (Schreiber *et al.*, 1986). Voir la figure 1.9 pour une représentation schématique d'une cinétique d'induction de la fluorescence PAM.

Le F_o représente le rendement de fluorescence lorsque les centres réactionnels des PSII sont ouverts, les Q_A étant complètement oxydées. La fluorescence maximale (F_m) est induite par un court flash de lumière saturante (SP) qui provoque la réduction de toutes les Q_A . Par la suite, le changement dans le rendement de fluorescence, qui se produit durant une illumination assurée par une lumière actinique (AL), induit l'effet Kautsky (Kautsky et Hirsh, 1931). Simultanément, le changement de la fluorescence maximale (F'_m) est induit par des flashs de lumière saturante (SP) à environ tous les 30 secondes. À l'état stationnaire de transport des électrons (F_s), l'AL est éteinte et remplacée par une lumière de longueur d'onde correspondante au rouge lointain (FR) afin de réoxyder rapidement les Q_A . Dans ces conditions, F'_o est mesuré et représente le rendement de fluorescence lorsque les centres réactionnels des PSII sont ouverts et ce, dans un état adapté à la lumière.



Figure 1.9 Représentation schématique de l'induction de la cinétique de fluorescence obtenue à l'aide de la méthode de fluorométrie PAM. Les différents types de lumières utilisées durant les mesures sont indiqués (ML= lumière modulée ; SP=flash saturant ; AL=lumière actinique ; FR= lumière rouge lointain). Les rendements de fluorescence nécessaires aux calculs des différents paramètres de fluorescence sont aussi indiqués (F_o = fluorescence minimale ; F_m =fluorescence maximale ; F'm=fluorescence maximale adapté à la lumière ; F ou F_s = niveau de fluorescence à l'état stationnaire de transport d'électrons ; F'o=fluorescence minimale à l'état adapté à la lumière) (tirée de Juneau *et al.*, 2002).

Dans le cadre de ce mémoire, à partir des mesures de cinétique de la fluorescence chlorophyllienne modulée (Fluorométrie PAM), nous avons calculé les paramètres suivants :

 F_o et F_m permettent l'évaluation de l'efficacité photochimique maximale du PSII (Φ_m) (Kitajima et Butler, 1975) :

$$\Phi_m = (F_m - F_o)/F_m$$

À l'état stationnaire de transport des électrons, l'efficacité photochimique opérationnelle du PSII (Φ'_m) est obtenu par le rapport suivant (Genty *et al.*, 1989) :

$$\Phi'_m = (F'_m - F_s) / F'_m$$

Le « quenching » photochimique (qP), qui montre la proportion de l'énergie d'excitation provenant de la lumière étant convertie par les réactions photochimiques assurées par les centres réactionnels des PSII, est évalué par (Schreiber *et al.*, 1986) :

$$qP = [(F'_{m} - F_{s})/(F'_{m} - F'_{o})] \times (F'_{o} - F_{s})$$

Le « quenching » photochimique relatif (qP_{rel}), représentant la proportion d'énergie lumineuse excitatrice qui est convertie en processus photochimiques accomplis par les PSII actifs à l'état stationnaire de transport linéaire d'électron, est évalué par (Buschmann, 1995) :

$$qP_{rel} = [(F'_m - F_s)/(F'_m - F'_o)]$$

Le «quenching» non-photochimique (qN), qui représente tous les processus d'extinction (quenching) du signal de fluorescence des Chl du PSII qui ne sont pas issus de la photochimie est évalué par ce rapport (Schreiber *et al.*, 1986) :

$$qN = 1 - [(F'_m - F'_o)/(F_m - F_o)]$$

Le « quenching » non-photochimique relatif (qN_{rel}), qui représente tous les processus d'extinction (quenching) du signal de fluorescence des Chl du PSII qui ne sont pas issus de la photochimie, est évalué par ce rapport, mais cette formule est issue d'un autre modèle (Buschmann, 1995) :

$$qN_{rel} = (F_m - F'_m)/(F_m - F'_o)$$

Le paramètre UQF_{rel} (« unquenched » fluorescence), qui représente l'état de réduction des PSII à l'état stationnaire de transport d'électrons, est calculé (Juneau *et al.*, 2005) :

$$UQF_{rel} = (F_s - F'_o)/(F_m - F'_o)$$

Tous ces paramètres réunis permettent une analyse globale de la réaction physiologique de l'algue face à un contaminant et/ou tout autre stress environnemental, comme le stress lumineux. Plus particulièrement, les processus non-photochimiques de dissipation de l'énergie lumineuse seront étudiés, en ayant comme objectif d'évaluer leurs composantes en présence d'un herbicide (mésotrione), dont le mode d'action perturbe la synthèse de molécules indispensables au bon fonctionnement des processus de dissipation de l'énergie sous forme non-photochimique.

1.4 LA DISSIPATION DE L'ÉNERGIE SOUS FORME NON-PHOTOCHIMIQUE

Lorsque les processus photochimiques (*i.e.* réduction CO_2 dans le cycle de Calvin, production d'ATP par l'ATP synthétase, transport d'électrons dans la chaîne de transport chloroplastique) sont saturés par l'arrivée soudaine d'une quantité plus élevée de lumière, les algues possèdent des processus de dissipation de l'énergie par voie non-photochimique, afin d'éliminer cet excès d'énergie. Comme vu à la figure 1.6, l'énergie contenue dans les chlorophylles singulet (¹Chl^{*}) doit être éliminée dans le but d'empêcher la formation de molécules hautement énergétiques pouvant créer des dommages particulièrement importants aux photosystèmes (PSII et PSI) et aux complexes antennaires collecteurs (LHC), soit les chlorophylles triplet (³Chl^{*}) et l'oxygène singulet (¹O₂) (Müller *et al.*, 2001).

Afin d'évaluer sous quel processus sera utilisée l'énergie contenue dans les ¹Chl^{*} (photochimique, fluorescence ou dissipation non-photochimique (chaleur), sous des conditions environnementales diverses, la fluorescence est utilisée, même si l'émission d'énergie sous cette forme se situe entre 0.6% et 3% de l'émission totale (Krause and Weis, 1991).

Puisque ces trois processus sont interdépendants, lorsque la fluorescence s'abaisse (phénomène nommé *quenching* ou atténuation du signal), un des deux autres processus compense cette perte en s'activant.

D'ailleurs, en comparant la cinétique de relaxation de la fluorescence dans l'obscurité et après une illumination, trois différentes composantes du *quenching* non-photochimique ont été classifiées selon leur temps de relaxation : qE (~30 secondes), qT (~8 minutes) et qI (~30 minutes) (Laisk et Oja, 2000).

La figure 1.10 montre une courbe de fluorescence chlorophyllienne qui schématise l'importance de chacun de ces processus de dissipation de l'énergie.



Figure 1.10 Mesures de fluorescence chlorophyllienne modulée d'une feuille d'*Arabidopsis*. En présence d'une faible lumière de mesure, la fluorescence minimale (F_o) est observée. Lorsqu'un *pulse* de lumière saturante est apposé, permettant l'obtention de la fluorescence maximale (F_m), les processus photosynthétiques sont saturés. Sous illumination continue, le *quenching* photochimique (qP) et le *quenching* non-photochimique (qN=qT+qE+qI) sont responsables de la baisse du rendement de la fluorescence (F'_m). Après l'arrêt de la lumière actinique, la récupération en quelques minutes du F'_m, montre que la majorité du qN est dépendant du qE (tirée de Müller *et al.*, 2001).

1.4.1 qE, un processus inductible et dépendant du pH

En premier lieu, le processus de dissipation de l'excès d'énergie le plus important chez les plantes et surtout chez *C. reinhardtii* est qE, le processus inductible et dépendant du pH (Laisk et Oja, 2000).

Son activation rapide s'effectue à la lumière et est induite par un pH acide dans la lumière des thylakoïdes du chloroplaste (Jahns *et al.*, 2009). qE peut être considéré comme une valve de sécurité pour la photosynthèse parce qu'il est principalement régulé par l'amplitude du Δ pH généré par le transport d'électrons chloroplastique. En effet, l'absorption de photons en excès cause l'établissement d'un Δ pH élevé, donc la réduction de pH dans le lumen devient essentielle pour qE. Cette réduction du pH dans le lumen a pour effet d'activer le cycle des xanthophylles (voir figure 1.11), en permettant à l'enzyme violaxanthine de-époxidase (VDE) de convertir la violaxanthine en zéaxanthine (Yamamoto, 1979). Justement, il existe une corrélation directe entre l'établissement du qE et le taux de déépoxydation des violaxanthines en zéaxanthines et cela a été démontré pour une grande variété de plantes supérieures dans des conditions environnementales et de laboratoire (Demmig-Adams et Adams, 2006). Chez les plantes supérieures, lorsque la protéine PsbS associée aux LHC (et au PSII) est protonnée, elle peut se lier à des molécules de zéaxanthine. Ensemble, ces deux processus vont provoquer un changement de conformation du photosystème II (PSII), qui dissipera plus efficacement l'énergie sous forme de chaleur (Horton *et al.*, 1996).

Par contre, chez *C. reinhardtii*, il a été démontré que le *quenching* nonphotochimique maximal est très peu dépendant (Niyogi *et al.*, 1998), voire totalement indépendant de l'accumulation de zéaxanthine en conditions de stress oxydatif (Bonente *et al.*, 2011).

Cela est peut-être due à des différences marquées au niveau de la physiologie de l'établissement du qE : entre autres, l'absence de protéines régulatrices PsbS chez C. reinhardtii, même en conditions de stress lumineux (Allmer et al., 2006 ; Bonente et al., 2008).

Contrairement aux plantes supérieures, d'autres xanthophylles (*i.e.* violaxanthine et lutéine) sont peut-être impliqués dans ce *quenching* (qE) chez *C. reinhardtii* (Jahns et Holzwarth, 2012). En résumé, la relaxation du *quenching* non-photochimique chez *C. reinhardtii* est strictement dépendante de l'élimination du ΔpH généré par le transport d'électrons (Jahns et Holzwarth, 2012).

The Violaxanthin Cycle



Figure 1.11 Représentation schématique des réactions du cycle des xanthophylles et des différents cofacteurs nécessaires à son bon fonctionnement. La réaction purement biochimique est une transformation réversible du pool de violaxanthine en zéaxanthine via l'intermédiaire anthéraxanthine. Ces réactions d'époxydation sont catalysées par des enzymes situées en des sites opposés de la membrane du thylakoïde, soit la violaxanthine de-époxidase (VDE) située dans le lumen de la membrane du thylakoïde et la zéaxanthine époxidase (ZE) située dans le stroma du chloroplaste. L'activité de la VDE, nécessitant un cofacteur (l'acide ascorbique), est strictement régulée par le pH dans le lumen et devient active à un pH inférieur à 5.8. Cette conversion s'accomplit *in vivo* et *in vitro* dans des temps situés entre 10 et 30 minutes. De plus, ce processus, dépendant du pH, s'assure que la zéaxanthine soit accumulée en condition saturante de lumière, car c'est la zéaxanthine qui possède davantage le pouvoir antioxydant face aux conséquences de l'énergie excessive provenant de la lumière. Lors d'un retour au noir ou sous intensité faible de lumière, le pool de zéaxanthine se reconverti en violaxanthine à l'aide de l'enzyme ZE, qui l'effectue jusqu'à 10 fois plus lentement que la réaction catalysée par la VDE (tirée de Jahns *et al.*, 2009).

1.4.2 qT, associé aux états de transition ou déplacement des complexes antennaires collecteurs (LHC) entre les photosystèmes chez C. reinhardtii

Le phénomène des états de transition a été observé pour la première fois chez des organismes photosynthétiques unicellulaires (Bonaventura et Myers, 1969). Chez les plantes et les algues, les états de transition sont définis comme le changement d'association des complexes antennaires collecteurs principaux (LHCII) entre le PSII (*state 1*) et le PSI (*state 2*) (Allen, 1992; Gal *et al.*, 1997; Wollman, 2001). La régulation de ce processus est essentiellement accomplie grâce à la phosphorylation des LHC par une kinase membranaire. Une portion des LHC ainsi phosphorylée, va migrer à distance de la région du thylakoïde de type accolé (grana), enrichie en PSII, et à travers la phase lipidique en direction d'une région thylakoïdienne non-accolée enrichie en PSI (Albertsson, 2001; Allen, 1992; Gal *et al.*, 1997; Wollman, 2001). Il a été suggéré que les états de transition sont provoqués par un détachement des granas du thylakoïde, issue de l'ajout de charges négatives sur les LHC (phosphore) et d'un renversement des PSII vers les PSI (Georgakopoulos et Argyroudi-Akoyunoglou, 1994).

À ce point, il est important de discuter de la régulation intrinsèque du système LHCII kinase/phosphatase dans diverses conditions environnementales. Premièrement, on sait que les LHCII-kinase membranaires sont activées par la réduction du pool de plastoquinone et le rôle de ces molécules dans les états de transition est résumé dans la figure 1.12. La réduction du pool de PQ (par la réduction du PSII ou par d'autres produits du métabolisme) active la kinase, qui est ensuite inactivée par la réoxydation de ce même pool (issue de l'activité du PSI). La déphosphorylation des LHCII-P_i est accomplie par une phosphatase dite constitutive (Allen, 1992), quoiqu'une régulation impliquant la protéine TLP ait été suggérée (Fulgosi *et al.*, 1998).

Tel que montré dans la figure 1.12, le complexe du cytochrome b_6f transfère le signal de réduction des PQ à la kinase et cela a été prouvé par l'absence remarquée du *state* transition chez des mutants *C. reinhardtii* incapables d'assembler le complexe cytochrome b_6f (Gal et al., 1997).

De plus, d'autres auteurs ont suggéré que les thioredoxines réguleraient négativement les kinases en situation de stress lumineux (HL) (Rintamäki *et al.*, 2000). Par contre, un changement conformationnel des LHC, provoqué par un stress lumineux, pourrait aussi limiter physiquement l'accès aux kinases (Adir *et al.*, 2003; Zer et Ohad, 2003). Conjointement, ces deux possibilités semblent représenter un mécanisme utile, puisque les états de transition en situation de stress lumineux sont beaucoup moins importants qu'en lumière faible ou modérée et ce, même si le pool de PQ est majoritairement sous forme réduite (Bendall, 1982).

Au niveau physiologique, les états de transition sont beaucoup plus importants chez C. reinhardtii que chez les plantes supérieures : jusqu'à 85% des LHCII peuvent être impliqués dans ce processus (chez C. reinhardtii; Delosme et al., 1996) et seulement 20 à 25% des LHCII (chez les plantes supérieures; Allen, 1992). Chez C. reinhardtii, les états de transition ne semblent pas être responsables de la répartition de l'énergie entre le PSII et le PSI, mais semblent plutôt activer le PSI à l'instar du PSII. Pour cette raison, les états de transition pourraient représenter un mécanisme permettant le changement d'un transport linéaire d'électrons vers un transport cyclique d'électrons au PSI (Vallon et al., 1991). En state 1 (LHCII majoritairement au PSII), les cellules algales produisent de l'ATP et du NADPH, mais seulement de l'ATP en state 2 : donc la fonction majeure du state transition chez C. reinhardtii semble être l'ajustement des niveaux d'ATP (et du ratio ATP/NADPH) par rapport aux demandes cellulaires (Wollman, 2001). En résumé, les états de transition peuvent être influencés par l'activité de l'ATP synthétase (Bulté *et al.*, 1990), du cytochrome b_6f (Munekage *et al.*, 2001) ou par le transport cyclique d'électrons autour du PSI (Miyake *et al.*, 2005).



Figure 1.12 Schématisation du système de régulation du state transition par le système kinase/phosphatase chez C. reinhardtii (tirée de Allen, 1992; Finazzi, 2004).

1.4.3 qI, la photoinhibition

Cette troisième composante du *quenching* non-photochimique est la plus hétérogène, puisqu'elle est considérée comme le *quenching* restant après la relaxation de qE et qT (Demmig-Adams and Adams, 2006). D'ailleurs, qI dépend partiellement des xanthophylles (reconversion des zéaxanthines en violaxanthine par la zéaxanthine époxidase (ZE)), mais aussi de la photoinhibition des PSII (Štroch *et al.*, 2004).

La relaxation de ce processus est très lente et cela peut prendre des heures jusqu'à une journée, dépendant de l'intensité du stress environnemental (Demmig-Adams et Adams, 2006 ; Garcia-Mendoza et Colombo-Pallotta, 2007).

Le processus de photoinhibition est souvent exprimé comme étant la baisse maintenue du F_v/F_m , le rendement maximal du PSII. Lorsque l'on augmente considérablement la lumière actinique d'exposition, le *quenching* (qE) devient saturé et la composante majeure du qN devient qI (Walters et Horton, 1993). Évidemment, l'intensité et la durée de l'illumination sont deux facteurs importants dans la modulation du phénomène de photoinhibition. La photoinhibition du PSII et le *quenching* de la fluorescence sont associés à l'inactivation du PSII (au niveau du centre réactionnel) causée par l'altération irréversible de la protéine D1 : protéine dont la resynthèse est très rapide. D'ailleurs, la régulation de la synthèse *de novo* de la protéine D1 est considérée comme un système de réparation (Aro *et al.*, 1993). En présence de stress lumineux, les PSII ainsi inactivés s'accumulent, mais la synthèse *de novo* de protéines D1 s'effectue presque au même rythme que leur dégradation (protéolyse) (Aro *et al.*, 1992; Schnettger *et al.*, 1992, 1994). Plus précisément, deux phases de relaxation du qI ont été distinguées par leur temps de relaxation suivant une exposition à un stress lumineux : une phase rapide associée à la reconversion des zéaxanthines en violaxanthines (Thiele *et al.*, 1996 ; 1998) et une phase lente associée au système de destruction/réparation de la protéine D1 (Leitsch *et al.*, 1994; Thiele *et al.*, 1996).

En résumé, qI est composé de trois sous-phénomènes basés sur : (1) un ΔpH persistant et l'accumulation des zéaxanthines, (2) en absence de ΔpH , la présence de xanthophylles *de-époxydés* (comme zéaxanthine) qui maintiennent physiquement un état favorisant la dissipation de l'énergie dans le PSII et (3), par inactivation des PSII. La figure 1.13 montre la régulation du phénomène de photoinhibition.



Figure 1.13 Schéma hypothétique des différents états de dissipation de l'énergie au niveau du PSII en relation avec les processus non-photochimiques. Lorsque ces mécanismes de protection sont surtaxés, s'en suit une formation plus importante d'espèces réactives oxygénées, ce qui inactive les protéines D1 du centre réactionnel (tirée de Thiele *et al.*, 1996).

37

1.5 LES EFFETS DES INHIBITEURS DE L'ENZYME HPP-DIOXYGÉNASE

Les herbicides qui inhibent l'enzyme HPP-dioxygénase (HPPD) ont été découverts relativement récemment. Ils sont membre de la famille des tricétones (*i.e.* mésotrione, sulcotrione) et agissent en compétition avec le substrat de l'enzyme, l'acide homogentisique (Schulz *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1997, 1998; Pallett *et al.*, 1998; Viviani *et al.*, 1998; Crouch *et al.*, 1997).

Chez les plantes, l'inhibition de cet enzyme perturbe la biosynthèse des caroténoïdes, ce qui à pour conséquence une dégradation des chlorophylles et un blanchissement foliaire (Lee *et al.*, 1997; Mitchell *et al.*, 2001). Malgré le fait que les symptômes sont semblables aux effets des inhibiteurs de l'enzyme phytoène désaturase (PDS) (Kim *et al.*, 1999, 2002), l'inhibition de l'HPPD représente un mécanisme d'action distinct (Lee *et al.*, 1997). L'inhibiteur utilisé dans ce mémoire est l'herbicide mésotrione.

La mésotrione est un herbicide qui inhibe compétitivement l'enzyme phydroxyphénylpyruvate dioxygénase (HPPD). Cette enzyme participe à la conversion de la tyrosine en plastoquinone (cofacteur essentiel à l'activité de la phytoène désaturase (PDS), qui est impliquée dans la biosynthèse des caroténoïdes) et en α -tocophérol (Prisbylla *et al.*, 1993 ; Garcia *et al.*, 1999). Indirectement, l'inhibition de l'HPPD affecte la synthèse des caroténoïdes puisqu'elle réduit le pool de plastoquinones (Pallett *et al.*, 1998). L'implication de l'enzyme HPPD dans la synthèse des plastoquinones (PQ) et des tocophérols est schématisée à la figure 1.14, tandis que le rôle de cofacteur des PQ sur l'activité de la PDS est présenté à la figure 1.15.



Figure 1.14 Représentation schématique de la voie de biotransformation de l'acide aminée tyrosine en plastoquinone et en α -tocophérol. L'enzyme HPPD, qui est inhibée par l'herbicide mésotrione, participe à la transformation du 4-hydroxyphénylpyruvate en homogensinate l'intermédiaire nécessaire à l'accomplissement de la biosynthèse des plastoquinones et des α -tocophérol (tirée de Fiedler *et al.*, 1982).



Figure 1.15 Représentation schématique résumée de la voie de biosynthèse des caroténoïdes. L'enzyme *phytoène désaturase* (PDS) affectée indirectement par la mésotrione, car les PQ oxydées pouvant accepter des électrons (et des H^+) sont des cofacteurs de cette enzyme (et de la ζ -carotène désaturase aussi) (modifiée de Norris *et al.*, 1995).

1.5.1 Les plastoquinones (PQ)

Les plastoquinones sont des molécules hydrophobes solubilisées dans la membrane du thylakoïde. Dans la chaîne de transport d'électrons photosynthétiques, les PQ constituent un lien fonctionnel entre le PSII et le cytochrome b_6f . Les PQ sont des accepteurs d'électrons pour la phytoène désaturase (figure 1.15) et le PSII (figure 1.2) et des transporteurs de protons.

L'état rédox des PQ (oxydé = plastoquinone (PQ); réduit = plastoquinol (PQH₂)) joue un rôle crucial dans la régulation de plusieurs processus, dont le transport linéaire d'électrons, la chlororespiration et le transport cyclique des électrons autour du PSI (Bennoun, 2002; Haldimann et Tsimilli-Michael, 2002; Heber et Walker, 1992; Kramer et Crofts, 1993). De plus, l'état rédox des PQ, en combinaison avec celui des ferrédoxines et des thioredoxines, jouent aussi un rôle dans la régulation transcriptionnelle de certains gènes reliés au transport d'électrons photosynthétiques (Allen, 1993; Escoubas *et al.*, 1995; Trebitsh et Danon, 2001).

En situation d'illumination intense (HL), les plastoquinones sont majoritairement sous forme de plastoquinols. Justement, les plastoquinols peuvent agir en tant qu'éliminateurs des espèces réactives oxygénées (ERO) générées au niveau de la membrane du thylakoïde. Par opposition, un pool de PQ fortement oxydé augmente considérablement la peroxydation des lipides et la destruction des pigments (Hundal *et al.*, 1995). En situation de stress oxydatif (provoqué par un stress lumineux), les plastoquinols (tout comme les tocophérols) peuvent être décomposées par leur réaction avec les ERO générés au niveau du PSII (Kruk et Trebst, 2008).

Afin de contrer cette perte, le taux de synthèse des PQ (et des tocophérols) est régulée à la hausse pendant l'illumination intense : la synthèse compense alors pour la dégradation (Kruk et Trebst, 2008; Trebst *et al.*, 2004).

Le lien des PQ avec les états de transition est résumé ici : la réduction des PQ active les kinases LHCII, qui en ajoutant des phosphates inorganiques (P_i) aux antennes collectrices LHCII, provoquent la migration de celles-ci vers le centre réactionnel du PSI (*state* 2).

Par contre, en condition de stress oxydatif, des auteurs ont suggéré que les kinases LHCII étaient incapables d'atteindre le site de phosphorylation sur les LHCII, suite à un changement conformationnel des antennes (Zer et Ohad, 2003).

Afin de vérifier la proportion des antennes liées au PSII et au PSI en diverses conditions, la fluorescence chlorophyllienne en basse température (77K) a été utilisée. La figure 1.16 montre un spectre typique d'émission de la fluorescence à 77K de cellules intactes de *C. reinhardtii et de C. subcaudata* (tirée de Morgon *et al.*, 1998).



Figure 1.16 Spectre d'émission de la fluorescence chlorophyllienne à 77K de cellules entières provenant des espèces C. subcaudata (—) et C. reinhardtii (…). La longueur d'onde d'excitation de la Chl est de 435nm. Les maximums d'émission sont indiqués (en nm) au dessus des pics correspondants. Toutes les données sont normalisées au pic du PSII afin d'obtenir une fluorescence relative (tirée de Morgon *et al.*, 1998).

D'ailleurs, nous proposons que l'utilisation de cette technique soit une caractérisation indispensable de l'espèce étudiée, puisque les mesures de fluorescence chlorophyllienne à température ambiante peuvent être altérées par les états de transition.

En résumé, les PQ participent à la régulation de nombreux processus liés au transport d'électrons (*i.e.* transport linéaire d'électrons, la chlororespiration et le transport cyclique des électrons autour du PSI), de protons (établissement d'un gradient de pH transmembranaire) et d'accepteur d'électrons pour la PDS.

43

Les PQ jouent aussi le rôle de régulateur des états de transition chez C. reinhardtii, puisque sa forme réduite (PQH₂) est reconnu comme un activateur de l'enzyme LHCII kinase.

Bien que plusieurs études chez *C. reinhardtii* aient démontré que les inhibiteurs de l'enzyme HPPD affectent le rendement photosynthétique au niveau du PSII et le taux de biosynthèse des PQ en situation de stress lumineux, aucune étude n'a évalué la dissipation de l'énergie sous forme photochimique et non-photochimique. Plus particulièrement, l'effet d'un inhibiteur d'HPPD (mésotrione) sur les états de transition n'a pas encore été étudié chez *C. reinhardtii*. Les PQ sont donc des molécules jouant des rôles à la fois dans les états de transition, le transport d'électrons, le transport de protons, l'activation de la PDS, tous des rôles indispensables au maintien et à la régulation de la dissipation de l'énergie sous forme photochimique chez *C. reinhardtii*.

1.5.2 Les tocophérols

Les tocophérols sont des molécules amphiphiles synthétisées exclusivement par les organismes photosynthétiques (Fryer, 1992). Leur structure se compose d'une tête hydrophile de chromanol (exposée à la surface de la membrane thylakoïdienne) et d'une chaine latérale hydrophobe de prényl (associée aux lipides membranaires) (Grusak et Della Penna, 1999). Havaux *et al.* (2005) ont proposé (qu'en combinaison avec le cycle des xanthophylles), les tocophérols accomplissent deux rôles indispensables à la protection face au stress oxydatif dans le chloroplaste : préserve le PSII de la photoinhibition et protège les lipides membranaires du thylakoïde de la peroxydation (Kruk *et al.*, 2005; Trebst *et al.*, 2002).

D'ailleurs, l'implication des tocophérols dans la photoprotection est supporté par une synthèse accrue de ces molécules, en présence de stress environnementaux provoquant le stress oxydatif (Fryer *et al.*, 2002; Havaux *et al.*, 2000).

Des expériences *in vitro* sur des membranes lipidiques bicouches contenant des tocophérols ont démontré que ces composés peuvent inhiber la réaction d'oxydation en chaîne créant des radicaux libres d'acides gras polyinsaturés nocifs pour l'organisme.

La présence de tocophérols permet la conversion des radicaux libres lipidiques en radicaux moins énergétiques pouvant être éliminés (réduits) par réaction avec l'ascorbate : par cette même réaction, les tocophérols sont régénérés (Kamal-Eldin et Appelqvist, 1996). Les tocophérols, quoique que moins efficaces que les caroténoïdes, peuvent aussi réduire les ERO en espèces moins réactives (Di Mascio *et al.*, 1990). Par contre, cela est accompagné par la destruction des tocophérols, conséquence du stress oxydatif.

1.5.3 Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des composés isopréniques lipidiques possédant une chaîne de carbone (C40). Ces composés liposolubles sont associés aux antennes collectrices (LHC), où ils transfèrent l'énergie lumineuse vers le centre réactionnel. La formation des caroténoïdes commence avec la réaction de dimérisation d'isoprènes géranyl-géranyl pyrophosphate afin de produire du phytoène (C40) (Figure 1.15). La phytoène désaturase catalyse une réaction de désaturation qui transforme le phytoène en ζ -carotène.

Ensuite, le lycopène se forme aussi par désaturation avant de créer deux types de caroténoïdes : les caroténoïdes de la branche β -carotène et de la branche α -carotène. La lutéine provient de la branche α -carotène, tandis que la néoxanthine et les caroténoïdes spécialisés (xanthophylles) zéaxanthine, anthéraxanthine et violaxanthine sont formés à partir de la branche β -carotène (Niyogi *et al.*, 1997a,b).

Les caroténoïdes jouent des rôles majeurs dans la photoprotection des chloroplastes en réduisant la quantité de radicaux libres. D'ailleurs, la désactivation des chlorophylles triplet excitées (³Chl) et des oxygènes singulet (¹O₂) dans le centre réactionnel ainsi que dans les antennes collectrices est constitutivement accomplie grâce aux caroténoïdes qui y sont fortement liés (*i.e.* principalement la β -carotène et la lutéine). S'ajoute à cela, un processus (réversible et inductible à la lumière) de dissipation de l'énergie dans les antennes du PSII, qui est facilité par l'action des caroténoïdes spécialisées, soit les xanthophylles du cycle portant le même nom. Ce cycle permet le changement réversible du rôle des antennes collectrices : adapté à une lumière faible (elles absorbent) et adapté à une intensité élevée (elles dissipent l'énergie). Sa cible de photoprotection est la désactivation des chlorophylles singulet (¹Chl) qui s'accumulent dans les LHC en condition de stress lumineux (Demmig-Adams, 1990; Horton *et al.*, 1996). La régulation du cycle des xanthophylles, dépendante du pH, est présentée à la figure 1.11. Les xanthophylles sont aussi reconnues comme des inhibiteurs de la peroxydation des lipides membranaires (Frank et Cogdell, 1996).

L'élévation des teneurs en zéaxanthine, anthéraxanthine et lutéine, durant une exposition en lumière d'intensité élevée chez *C. reinhardtii*, est consistante avec le rôle de ces xanthophylles dans la photoprotection (Niyogi *et al.*, 1997a, b). L'importance des caroténoïdes dans la photoprotection est aussi démontrée par certains phénotypes d'organismes photosynthétiques qui ne peuvent synthétiser les caroténoïdes, par inhibition de leur synthèse (*i.e* norflurazon ou un inhibiteur d'HPPD) ou par utilisation de mutants (Böger et Sandmann, 1993; Niyogi *et al.*, 1997a, b).

Nous connaissons déjà le mode d'action de l'herbicide (mésotrione) utilisé dans cette recherche : il inhibe l'enzyme HPP-dioxygénase (HPPD), l'enzyme clé dans la synthèse des plastoquinones, des tocophérols et indirectement des caroténoïdes. Par contre, l'étude des processus de dissipation de l'énergie lumineuse en présence de ce type d'inhibiteur n'a pas encore été réalisée.

Notre étude permettra d'approfondir nos connaissances sur le rôle de l'enzyme HPPD dans la dissipation de l'énergie par voie photochimique et non-photochimiques chez l'algue verte *C. reinhardtii* en présence ou non de stress lumineux et sur la récupération, suite au stress lumineux, de l'activité photosynthétique. Nous allons évaluer la composition pigmentaire (Chl-a, Chl-b, caroténoïdes dont la β -carotène et les xanthophylles) et la teneur en tocophérols de l'algue par chromatographie liquide à haute performance.



CHAPITRE II

IMPACT OF THE HYDROXYPHENYLPYRUVATE DIOXYGENASE (HPPD) INHIBITION ON THE PSII ENERGY DISSIPATION OF CHLAMYDOMONAS REINHARDTII

Francis Racine, Kui Xu and Philippe Juneau*

Department of Biological Sciences, TOXEN, Ecotoxicology of Aquatic Microorganisms Laboratory, Université du Québec à Montréal, Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada

*Author for correspondence

To be submitted to Plant cell physiology.

Contribution dans ce chapitre : Pour ce chapitre, j'ai élaboré les idées principales avec l'aide de P. Juneau. J'ai travaillé avec K. Xu pour les expériences de fluorescence à basse température (77K). J'ai effectué toutes les autres expériences de laboratoire. J'ai contribué à l'analyse des résultats et la rédaction des différentes versions de l'article avec K. Xu et P. Juneau.

2.1 RÉSUMÉ

La mésotrione inhibe une enzyme clé dans la biosynthèse des PO, des α -tocophérol et indirectement des caroténoïdes, soit l'enzyme p-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase (HPPD). Les changements dans l'activité photosynthétique, les processus de dissipation de l'énergie, la composition pigmentaire (Chlorophylles, carotènes et xanthophylles) et la teneur en α-tocophérol ont été étudiés lorsque des cultures algales de C. reinhardtii ont été exposées 24h à l'herbicide mésotrione. Ceci n'a pas induit de photoinhibition au niveau du PSII, tandis que la capacité maximale du quenching ΔpH -dépendant s'est réduite (qE_{max}: -33%). Par conséquent, une inhibition des états de transition (state 1 to state 2) en présence de mésotrione a été observée (hausse de 36% du F_{PSII}/F_{PSI}). Bien que les cultures algales exposées possédaient un ratio Car:Chl-a diminué par rapport au témoin, aucun changement dans l'ABS/RC ou la DI₀/RC n'a été observé. Sous illumination intense (HL), le rendement photosynthétique maximal et opérationnel du PSII a respectivement diminué de 22% et 76% pour les algues non-traités et beaucoup plus, soit de 40% et 88% pour les algues traitées à la mésotrione. Dans les mêmes conditions, le quenching non-photochimique (qN) était 2.3 fois plus élevé pour les cultures traitées, tandis que l'activation du cycle des xanthophylles (%Z/(Z+A+V)) a été similaire dans les deux cas. Sous HL, qE_{max} s'est élevé pour les algues non-traitées (+40%), mais réduit pour les algues traitées (-57%), tandis que qPQ est maintenu pour les algues non-traitées, mais diminué pour les algues en présence de mésotrione (-49%). La baisse de teneur en β -carotène par cellule en combinaison avec la baisse de capacité de qE en HL ont eu un impact négatif sur la récupération de l'activité photosynthétique du PSII des algues traitées, puisque cette récupération n'était pas complétée après 120 minutes.

2.2 ABSTRACT

Mesotrione is known to inhibit the p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD), a key enzyme for PQ, α -tocopherol and indirectly for carotenoid biosynthesis. Modifications of photosynthetic activity, energy dissipation processes, pigment composition (chlorophylls, carotenes and xanthophylls) and α -tocopherol content were investigated when C. reinhardtii cultures were exposed 24h to mesotrione. These conditions did not induce PSII photoinhihition, while maximal energy-dependent quenching has strongly decreased (q_{Emax} : -33%). For the treated algae the decrease in Car:Chl-a ratio was not accompanied by changes in ABS/RC and DI_c/RC and this was explained by the unchanged α -tocopherol content per Chl-a and by low light growth conditions, that did not induce xanthophyll cycle. State 1 to state 2 transition seemed to be inhibited by mesotrione as the PSII/PSI was 32% higher than in the control. Upon high light conditions (HL), PSII activity was highly affected, since maximal and operational PSII quantum yields have decreased for the non-treated algae by -22% and -76% respectively, while the mesotrione-treated algae were more affected (-40% and -88%). In the same conditions, non-photochemical quenching (qN), was more than twofold higher for the inhibited cultures, while xanthophyll cycle activation (%Z/(Z+A+V)) of control and treated samples was similarly increased. The unquenched fluorescence related to the reduction level of PSII at steady-state electron transport (UQF_{rel}) was higher for the HL and mesotrione-HL treated algae compared to the control, thus showing lower capacity of the electron transport chain to drain electrons under these conditions. qEmax was increased for the HL exposed algae (+40%), but strongly decreased for the HL-mesotrione-treated sample (-57%), while the quenching of oxidized PQ (qPQ) was stable for the HL and decreased (-49%) when mesotrione was present. HL did not induce obvious state transition for both mesotrione-treated and non-treated algae. Moreover, β -carotene content per cell and qE capacity decreased after HL treatment and had a strong effect on the recovery of PSII photosynthetic activity in mesotrione-treated cells under low-light conditions since recovery was not completed after 2 h under LL conditions, while recovery for the control was almost achieved after 30 min.

Keywords: Mesotrione, High light stress, Photoinhibition, Recovery, Shikimic acid pathway inhibition, Photosynthetic energy dissipation

2.3 INTRODUCTION

Mesotrione is an inhibitor of p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) known to convert tyrosine into the precursors of plastoquinones (PQ) and tocopherols (Lee et al., 1997; Garcia et al., 1999). PQ are soluble electron carriers that play a major role in the PSII-PSI electron transport, as they are the link between the PSII primary electron acceptors (QA and Q_B) and the cytochrome $b_6 f$ (cyt $b_6 f$). Concomitantly, PQ also play a role in the formation of the transthylakoidal proton gradient needed for chloroplastic ATP synthesis (Cramer et al., 1991; Kramer et al., 2003). PQ are essential co-factors of phytoene desaturase (PDS) involved in the carotenoid biosynthesis pathway (Mayer et al., 1990; Norris et al., 1995). PQ can also regulate state transition via the binding of reduced PQ (PQH2) to Cyt b6f that activates a transducing signal of LHCII kinase activation, that allows the LHCII antennas to move from PSII to PSI (state 1 to state 2 transition) (Allen et al., 1981; Horton and Black, 1981; Zito et al., 1999). The known bleaching effect of HPPD-inhibitors on plants is thought to be linked to a decreased PQ content (Lee et al., 1997; Schulz et al., 1993) since carotenoids are photoprotector pigments and may prevent chlorophyll degradation (Demmig-Adams et al., 1996; Frank and Cogdell, 1996). This decrease of carotenoid concentration will increase the sensitivity of photosynthetic organisms to oxidative stress since these pigments are known to be powerful antioxidants (Demmig-Adams et al., 1996; Frank and Cogdell, 1996). Furthermore, special carotenoid pigments, the xanthophylls, participate in excess energy dissipation through the xanthophyll cycle (Yamamoto, 1979; Bilger and Björkman, 1990; Demmig-Adams, 1990). Under high light (HL) stress condition, violaxanthin is deepoxydated into antheraxanthin and finally into zeaxanthin, thus inducing conformational changes that induce dissipation of excess energy through heat permitting to decrease photoinhibitory effect (Demmig-Adams and Adams, 1992; Thiele and Krause, 1994; Thiele et al., 1996).

In addition to the HPPD inhibition effects on PQ, the decrease of tocopherol content may increase lipid peroxidation (Fryer, 1992; Munné-Bosch and Alegre, 2002a, b; Havaux *et al.*, 2003; Maeda *et al.*, 2005). Tocopherols are efficient lipid antioxidants that are present in thylakoid membranes and can act as reactive oxygen species (ROS) quencher (Kruk *et al.*, 2005; Havaux *et al.*, 2005).

Tocopherol radicals formed by the reaction with lipid peroxyl radicals, can be regenerated in tocopherols by ascorbate (or another antioxidant) (Munné-Bosch and Alegre, 2002b). This process prevents lipid peroxidation and destruction of tocopherol in the thylakoid membrane, therefore preserving PSII activity under high light illumination (Fryer, 1992; Munné-Bosch and Alegre, 2002b; Trebst et al., 2004). Under HL conditions, if tocopherol and PQ contents are decreased by HPPD inhibitors, a higher possibility of PSII photoinhibition related to ROS production within the chloroplast can occur (Kruk and Trebst, 2008). High light treatments (HL) are known to inhibits LHCII phosphorylation (and state-1 to state-2 transition), while conformational change of the LHCII prevents its phosphorylation (Zer et Ohad, 2003). Even if the PO pool is largely reduced under HL, kinetic limitation of the PQ pool reoxidation at the Q_o site, may prevent the binding of plastoquinol to this site (Bendall, 1982). Even if the effects of HPPD-inhibitors on PQ and tocopherol synthesis and their degradation rates (under high light) are well documented, effects on PSII energy dissipation processes are not yet known. Therefore, in this study we have investigated the effects of an HPPD inhibitor (mesotrione) combined to high light stress on PSII energy dissipation processes and pigment composition of a green alga, Chlamydomonas reinhardtii, and we have studied the recovery of photosynthetic activity following these treatments under LL condition.
2.4 MATERIALS AND METHODS

2.4.1 Growth conditions

Chlamydomonas reinhardtii cultures (cc125, Chlamydomonas center) were acclimated at 24 °C to low light intensity (LL; 100 μ E/m²/s) provided by 40W Osram/Mitsubishi white fluorescent lamps with a light:dark cycle (16h:8h). Growth was performed in 500mL Erlenmeyer flask (Final volume: 200mL) in High Salt Medium (HSM at pH 6.8) and cultures were maintained in exponential growth phase. High light intensity treatment (HL; 1100 μ E/m²/s for 75 min) was provided by Osram halogen photo optic lamp (250W; Winchester, UK) and temperature was kept at 25°C during HL treatments using a thermo-regulated water bath. The 2h-recovery after HL treatment took place under low light intensity (35 μ E/m²/s; 40W Osram/Mitsubishi white fluorescent lamps). Mesotrione (99.6% purity; Syngenta Crop Protection, Greensboro, NC) was dissolved by agitation at 50°C for 1h into distilled water and pH was adjusted to 6.8 with concentrated NaOH (2N). Solution was then filtered through Millipore GF/C filters (25mm diameter; 1.2 µm pore size). Mesotrione was added 24h before the measurements at a final concentration of 5mg/L (14.7µM).

2.4.2 PAM fluorescence measurements

PAM Measurements were done according to Schreiber *et al.* (1986) using a Water-PAM fluorometer (Walz, Germany). The maximal PSII quantum yield, $\Phi_{\rm M} = (F_{\rm m}-F_{\rm o})/F_{\rm m} = F_{\rm v}/F_{\rm m}$ (Kitajima and Butler, 1975) was determined after 15 minutes dark incubation of the sample. At the steady state of electron transport, the operational PSII quantum yield, $\Phi'_{\rm M}$, was obtained by the ratio $(F'_{\rm M}-F_{\rm S})/F'_{\rm M}$ (Genty *et al.*, 1989). The photochemical *quenching* value (qP), showing the proportion of light excitation energy converted to photochemical act by the active PSII reaction centers, was also obtained at steady-state conditions: $qP = (F'_{\rm M}-F_{\rm S})/(F'_{\rm M}-F'_{\rm O})$ (Schreiber *et al.* 1986). The non-photochemical *quenching* (qN), representing all *quenching* processes of the PSII chlorophyll fluorescence not directly related to photochemistry, was calculated by the ratio 1–[(F'_{\rm M}-F'_{\rm O})/(F_{\rm M}-F_{\rm O})] (Schreiber *et al.* 1986).

54

The relative unquenched fluorescence (UQF_{rel}), representing the reduction state of PSII at steady-state electron transport was calculated by the ratio (F_S-F'₀)/(F_M-F₀) (Juneau *et al.*, 2005). Actinic light intensities during induction curve were respectively, for LL and HL measurements, 65 μ E/m²/s and 1585 μ E/m²/s. Saturating pulses were at 2300 μ E/m²/s (1 s duration every 30s).

2.4.3 PEA fluorescence measurements.

Chl-*a* fast-rise fluorescence emission was measured, after an incubation of 15 minutes in the dark, with a plant efficiency analyzer (PEA, Hansatech, Instruments Ltd, UK). Liquid samples were illuminated 6 sec with continuous light (650 nm peak wavelength, 3000 μ E/m²/s). The maximal capacity of *quenching* energy by Δ pH-dependant NPQ (qE_{max}) was calculated as the ratio (F_M-F_{6s})/F_M (Strasser *et al.*, 1999). The *quenching* of the PSII fluorescence by oxidized quinones of the PQ pool (or the relative PQ pool size participating in the ETC) (qPQ) was calculated as the ratio (F_M-F_{30ms})/(F_M-F_{50µs}) (Strasser *et al.*, 1999). The antenna size of an active RC of PSII, ABS/RC, was calculated as followed: ABS/RC = M₀ / V_J / (F_M-F_{50µs}) / F_m, where M₀ = (F_{300µs}-F_{50µs}) / (F_M-F_{50µs}) × 0.25 and V_J = (F_{2ms}-F_{50µs}) / (F_M-F_{50µs}) (Krüger *et al.*, 1997). Non-photochemical energy dissipation of active PSII RC (DIo/RC) was calculated by (ABS/RC) - (M₀ × (1 / V_J)) (Krüger *et al.*, 1997).

2.4.4 Pigment extraction

C. reinhardtii algae cultures (30 ml) were filtered through Millipore GF/C filters (25mm diameter; 1.2 μ m pore size), placed inside 15mL Falcon tubes and immediately immersed into liquid nitrogen. Pigment extraction was done by adding 3mL of acetone 90% (with internal standard) to each sample at -20°C for 12h. Pigment extraction solutions were filtered through 13mm diameter PTFE membrane syringe filters (Acrodisk; 0.2 μ m pore size).

2.4.5 Chromatographic procedure

The high performance liquid chromatographic (HPLC) method was adapted from Garcia-Plazaola and Becerril (1999). Analyses were performed using a Beckmann Gold system equipped with a model 128 pump module, a rheodyne manual injector (injection loop volume : 100μ L), a diode array detector module 168, which was used to measure peaks in the range 200-600 nm. The chromatographic system was controlled by a computer using System Gold V810 by Beckmann. Peak separation was carried out on an Inertsil ODS-80A reversed phase column (150 mm X 4.6 mm; 5 um particle size; Canada Life Science, ON, Canada) protected by a Nova-Pak C-18 guard column (20 X 3.9 mm i.d.; 40 µm particle size; Waters, Milford, USA). The solvent flow rate was 1.2 mL/min, with working pressures around 1200 psi. The injection volume (100 μ L) was measured by a 100 μ L glass syringe. Between each test, the syringe was washed at least 4 times with clean ACN 100% before the washing of the manual injector (500 µL of clean ACN 100% was used to wash the injector). For overnight storage the column was flushed with ACN 100%. Peaks were detected and integrated at 445 nm for carotenoids and chlorophylls and at 295 nm for tocopherols; areas under peaks were calculated using System Gold V810 software. Pigments and α -tocopherol were identified by comparison of retention times and spectral characteristics with the corresponding authentic standards and were quantified using external standard curves for each analyte.

2.4.6 77k fluorescence measurements and FPSII/FPSI ratio

The 77-K fluorescence emission spectra between 620 nm to 760 nm of algae were measured under 435 nm excitation by fluorescence spectrometer (LS 50-B, Perkin Elmer). Samples were put in small glass tubes for the high light exposure (photoinhibitory treatment), then quickly immersed in liquid nitrogen before measurements. A band-pass green filter (λ = 493nm; Edmund 46052, Barrington, NJ) and a red long-pass filter (λ > 600nm; Edmund 66065, Barrington, NJ) were used for excitation and emission light, respectively. Fluorescence peak at 690.5nm (PSII) and 719nm (PSI) were assumed as the maxima of each PS.

2.4.7 Statistical analysis

Statistical analysis linked with student-test was done with JUMP 6.0 software and statistical analysis linked with pairwise multiple comparison (Tukey test) was done with Sigma Plot 11.0 software. These comparisons were performed in order to confirm significant differences between treatments.

2.5 RESULTS AND DISCUSSION

2.5.1 Effect of mesotrione exposure

As seen in Table I, inhibition of p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) by mesotrione did not induce modification of the maximum PSII quantum yield (Φ_M) of *Chlamydomonas reinhardtii* (p=0.2819).

This indicates that the PSII reaction centers were not damaged by the effect of mesotrione. Although the operational PSII quantum yield (Φ'_{M}) was shown to be more sensitive than Φ_{M} (Frankart *et al.* 2003; Juneau *et al.* 2001, 2007) to evaluate toxicity of pollutants, since it integrates the effect of pollutants on the entire electron transport chain and, at some extent, on the processes not directly linked to electron transport, Φ'_{M} was only slightly affected when *C. reinhardtii* was treated 24h to mesotrione (-3%; p=0.0168). Similarly, inhibition of HPPD did not induce modification of the photochemical *quenching* (qP) (p=0.7930).

These results are in accordance with previous work done on *C. reinhardtii* where photosynthetic activity was not altered in presence of an HPPD inhibitor under low light intensity (Trebst *et al.* 2002). Inhibition of photosynthesis by an inhibitor of HPPD was previously observed in cucumber mature cotyledons, but not in developing tissues (Kim *et al.* 1999; 2002).

This indicates clearly that the effects of HPPD inhibitors on photosynthetic electron transport are different when cells are actively dividing (algae and developing tissues) compared to mature tissues. On the other hand, the other PSII energy dissipation pathways (qN and UQF_{rel}) were affected (although not significantly for UQF_{rel}) in presence of mesotrione compared to the control (Table I; qN (-44%; p=0.0483)), indicating that HPPD products (PQ and tocopherol) seem to play a role in these photosynthetic energy dissipation pathways under LL condition. The maximal capacity of Δ pH-dependant non-photochemical *quenching* (qE_{max}) was decreased by 33% compared to the control (Table II; p=0.0004).

However, the PQ pool size participating in the electron transport, qPQ (Strasser *et al.*, 1999), was not significantly affected by mesotrione (Table II; p=0.4208), indicating that inhibition of PQ synthesis by this herbicide does not seem to be sufficient to alter PQ pool participating in photosynthetic electron transport.

The inhibition of HPPD had also no effect on the effective antenna size of active RC (ABS/RC) and on the effective energy dissipation of active RC (DI₀/RC), indicating that the ratio of active/inactive RCs was not greatly altered by mesotrione (p=0.6290; p=0.8872).

We can notice that pigment composition of C. reinhardtii exposed to the HPPD inhibitor was altered (Table III). Chlorophyll a and b content decreased in presence of mesotrione by 43% (p=0.006) and 35% (p=0.023) respectively compared to the control. We found also that the total carotenoid content was strongly affected (-62%; p=0.001) by mesotrione. Since mesotrione is not known to affect chlorophyll synthesis, we may advance that the observed decrease in carotenoid content is responsible for the lower content in chlorophylls, because carotenoids are powerful antioxidant molecules and efficient to dissipate excess energy that might be harmful to chlorophylls (Frank and Cogdell, 1996; Demmig-Adams *et al.*, 1996). This decrease in the total carotenoid content is the consequence of the lower content in β -carotene (-77%), lutein (-63%), neoxanthin (-50%), violaxanthin (-52%) and zeaxanthin (-50%) (p<0.001; p=0.002; p=0.001; p<0.001; p=0.03).

The decrease of the carotenoid content may be explained by the co-factor role that PQ plays in the carotenoid synthesis pathway (for the phytoene desaturase) (Norris *et al.*, 1995). Indeed, since mesotrione is known to inhibit PQ synthesis (Mitchell *et al.*, 2001) enzymatic reactions involving this co-factor would also be inhibited, inducing a decrease in the cell content of carotenoids (Norris *et al.*, 1995).

Our results on the decrease in the Car:Chl-a ratio (-35% from control; Table III; p=0.026) are in accordance with the observations done previously in cucumber developing tissues treated with norflurazon, a direct inhibitor of phytoene desaturase (Jung *et al.*, 2000).

The α -tocopherol content per cell, known to be important for the protection of PSII during high-light stress (Kruk and Trebst, 2008), was also decreased (by 35% compared to the control; p=0.022)) in presence of the HPPD inhibitor (Table III).

However, this apparent decrease in α -tocopherol content per cell associated to the decrease in the carotenoid content per cell did not affect the maximal and operational PSII quantum yields, indicating no evidence of PSII damage in the treated samples after 24h of exposure. This might be explained by the fact that when we normalized α -tocopherol and carotenoid molecules on a Chl-*a* basis (which is closely linked to PSII), no modification in the ratio was observed. The observed decrease in qE capacity does not seem to be related to the xanthophyll cycle, but may be related to the decrease in lutein content, since this pigment is important for the induction of qE (Müller *et al.*, 2001).

Reduced PQ are also known as activators of the LHCII kinase, thus allowing state-1 to state-2 transition of the LHCII (Allen *et al.*, 1981; Horton and Black, 1981). Moreover, the first step in the signal transduction pathway of state-1 to state-2 transition is the binding of plastoquinol to the quinol binding site of the cytochrome complex (Zito *et al.*, 1999).

In order to verify the influence of PQ-synthesis inhibitors on the *state transition*, we evaluated the 77K. Chl-fluorescence emission of both photosystems in whole cells. Interestingly, in mesotrione treated algae, PSI related 77K-fluorescence peak (relative to PSII fluorescence peak) was slightly lower than in the control. As a consequence, in mesotrione-treated algal cells PSII:PSI fluorescence ratio was 32% higher (3.81) than in the control (2.89) (Table IV; pairwise Tukey test; p<0.001).

These data strongly suggest that, in low-light acclimated *C. reinhardtii* cells, PQ biosynthesis inhibition induced a state-2 to state-1 transition of a certain amount of the LHC. Indeed, smaller PQ pool size potentially found in presence of mesotrione may be responsible for a lower PQH₂ content, thus allowing a lower transducing signal to the LHCII kinase (via cyt b_6 f). This was in accordance with the observed lower (33%) maximal capacity to establish transthylakoidal ΔpH (q_{Emax}) in presence of mesotrione (Table II).

Since light intensity used in this part of the experiment was similar to the growth light intensity, and therefore relatively low $(100\mu \text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1})$, we may advance that low ROS production was induced. Also, under this low light condition, the xanthophyll cycle (conversion of violaxanthin into zeaxanthin) as photoprotection mechanism was not induced for mesotrione-treated algae (Table III). We can therefore advance that, if higher ROS production occurs under our light conditions, stable α -tocopherol to Chl-*a* ratio and other processes, such as the enzymatic antioxidant system, may be responsible of the protection at the PSII level.

2.5.2 Effect of HL treatment

Exposure to high light (HL) for 75 min induced drastic changes in the energy dissipation pathways of *C. reinhardtii* (Table I). The maximum PSII quantum yield (Φ_M) decreased by 22% compared to the control, indicating photoinhibitory effect (Table I; p<0.0001).

The operational PSII quantum yield (Φ'_{M}) was strongly affected by this HL treatment since it was decreased by 76% compared to the control (p<0.0001). Our results of HL treatment on the PSII quantum yields are in accordance with previous studies where HL induced strong photoinhibitory effect on phytoplankton (Falk *et al.*, 1990, 1992; Singh *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 2012). This alteration of PSII quantum yields occurred simultaneously with a decrease in the photochemical *quenching* (qP, -63%; p<0.0001) and an expected increase of the non-photochemical *quenching* (qN, 1.6 time higher than the control; p=0.0158). As previously demonstrated (Adir *et al.*, 2003; Zer et Ohad, 2003), *state transition* was not induced by HL treatment (Table IV).

On the other hand, part of qN related to the maximal capacity of energy-dependant *quenching* (q_{Emax}) was increased by 40% compared to the control (Table II; p<0.0001). This increase in q_{Emax} was also reflected in the total energy dissipation (DI₀/RC) that was 317% of the control value (p=0.0002). We also noticed an increase of 62% of the effective antenna size of active RCs (ABS/RC) in HL exposed algae (p=0.0007). Since both parameter values (ABS/RC and DI₀/RC) are relative to the numbers of open and functional PSII, closure of PSII would have a direct impact on these energy dissipation pathways. We have shown that PQ pool size participating in the electron transport (q_{PQ}) was not significantly changed by HL treatment (Table II; p=0.1581) and that the relative unquenched fluorescence (UQF_{rel}), as an indication of the redox state of PSII RCs (Juneau *et al.* 2005), was highly increased by the HL exposure (an increase of almost 10 times compared to the control; p<0.0001). These results suggest that the electron transport carriers beyond PSII are less efficient to drain electrons and that PSII RCs are highly reduced (or closed) after 75 minutes HL treatment compared to the control.

Concomitantly to these changes in the photosynthetic energy dissipation pathways, some pigment contents per cell were also affected by the HL treatment (Table III).

As expected under HL stress conditions, xanthophyll cycle was highly activated, since de-epoxydation of violaxanthin [Z/(Z+A+V)] was highly induced (+272%) after HL treatment (Table III; p<0.001) indicating that xanthophyll cycle is an important protective mechanism as it was previously demonstrated for different microalgae (Maxwell et al., 1995; Jahns *et al.*, 2000; Jahns and Holzwarth, 2012). Chl-*a*, Chl-*b* and β -carotene cell content were significantly decreased by 35%, 35%, 43% respectively compared to the control (p=0.017; p=0.022; p=0.04). On the other hand, when reported on a Chl-*a* basis, the carotenoid level increased by 44% compared to the control (p=0.006).

In addition, lutein content per cell tended to increase (+21%; Table III; p=0.306) when the algae were exposed 75 minutes to HL. As demonstrated by Niyogi and coworkers (1997b), *C. reinhardtii* grown in LL ($70\mu E/m^2/s$) and exposed to HL ($350\mu E/m^2/s$) showed an increase in lutein and also significant increases in antheraxanthin and zeaxanthin per cell. These higher levels of zeaxanthin, antheraxanthin and lutein were also reported for many vascular plants and algae grown under HL (Thayer et Björkman, 1990; Maxwell *et al.*, 1995; Jahns *et al.*, 2000).

Similarly to previous studies on *C. reinhardtii* (Nowicka and Kruk, 2012) we have shown that after HL treatments, α -tocopherol content normalized to Chl-*a* was maintained showing that degradation rate of α -tocopherol occurred at the same rate than for Chl-*a*. Indeed, when α -tocopherol quenched oxygen radicals (${}^{1}O_{2}$) the molecule is destroyed irreversibly (Munné-Bosch and Alegre, 2002b). Therefore, when α -tocopherol molecules were destroyed by highly energetic molecules, Chl-*a* was also destroyed, thus confirming an unchanged α -tocopherol to Chl-*a* ratio (p=0.221). The higher ROS content generated under HL treatment (Asada et Takahashi, 1987), has certainly enhanced α -tocopherol synthesis rate (Kruk *et al.*, 2005) and ascorbate (or other antioxidant like glutathion) may have participated in maintaining a certain portion of the tocopherol pool during HL treatment (Smirnoff and Wheeler, 2000; Munné-Bosch and Alegre, 2002b).

62

However, it seems that the induction of the xanthophyll cycle and the high levels of protective pigments and α -tocopherol were not sufficient to entirely protect the photosynthetic apparatus of *C. reinhardtii* exposed to HL.

2.5.3 Combined effects of mesotrione and HL treatment

We have demonstrated that the combined effect of HL and mesotrione had a potentiation effect on the maximal and operational PSII quantum yields (Table I). Indeed, algae treated with mesotrione alone did not have any effect and the combined effect of mesotrione and HL exposure significantly increased the inhibition of Φ_M and Φ'_M respectively from 22 to 40% (p<0.0001) and from 76 to 89% (p<0.0001) compared to HL treatment alone.

Interestingly, photochemical *quenching* was affected (-60% from control; p<0.0001), but at the same extent than the non-HPPD inhibited HL treated algae (p=0.0363). On the other hand, non-photochemical *quenching* (qN) was increased by 267% compared to the control (p<0.0001) and was more than 2.3 fold higher than the HL exposed algae without mesotrione (p<0.0001). Although mesotrione alone decreased the non-photochemical *quenching*, it appears that HL stress in combination with mesotrione reversed this effect on non-photochemical *quenching*. These results showed that qP, as an indicator of the active PSII RCs only, is less indicative than $\Phi'_{\rm M}$ and qN, probably due to the fact that $\Phi'_{\rm M}$ and qN integrate the effects of the herbicide and HL on photosynthetic electron transport and related energy dissipation processes (Genty *et al.* 1989; Seaton and Walker 1992; Juneau *et al.*, 2002).

Moreover, PQ pool participating in the electron transport (qPQ, 51% from the control; Table II; p<0.0001) was significantly lower than the control in HL (p<0.0001), thus showing lower capacity of sinking excess energy by PSII-PSI electron transport chain when both mesotrione and HL stress were applied.

The effective antenna size of active RCs also increased and was 3.7 times higher than the control (p<0.0001), indicating a strong decrease of the active PSII RC population. We can advance that this enhancing phenomenon is due to the fact that mesotrione, by affecting synthesis of PQ and tocopherols (and also indirectly carotenoids), may sensitize the organism under exposure to HL, then, non-photochemical processes are highly activated in order to prevent as much as possible the damage to the photosynthetic apparatus.

Similar rise in the non-photochemical *quenching* accompanied by substantial inhibition of photosynthetic activity was obtained with norflurazon (that acts indirectly on photosynthesis by inhibiting carotenoid biosynthesis) for treated *Cucumis sativus* leaves and *Lemna minor* plants (Jung *et al.*, 2000; Frankart *et al.*, 2003).

Since the combined effect of mesotrione and HL caused a decrease in maximal ΔpH dependant NPQ (qE_{max}) (-57% from control; p<0.0001) and an activation of the xanthophyll cycle to the same extent than for the HL treated algae without mesotrione (% deepoxydation = 419% of the control; Table III; p<0.001), we can advance that other parts of the nonphotochemical energy dissipation process are highly effective (qT or qI) to explain the drastic increase in the total qN observed under these conditions (Table I).

Accorded to our results, qT was not induced by HL treatments, as shown by the unchanged PSII/PSI 77K fluorescence ratio between mesotrione-treated and non-treated algae (Table IV). This reveals that qI may be mostly responsible for the qN rise during HL treatments for both conditions. This is reflected to some extent in the high increase observed in the effective energy dissipation of active RCs (DI₀/RC, more than 10 times of the control (p<0.0001) and 3.2 times higher than the algae exposed to HL without mesotrione; Table II; p=0.0085).

The higher qN and lower qE capacity of HPPD inhibited algae in presence of HL stress compared to control exposed to HL could not be explained by a change in neoxanthin, violaxanthin, antheraxanthin and zeaxanthin content per cell, since these pigment contents were similar in these conditions (Table III).

On the other hand, β -carotene is known to be a good quencher of singlet oxygen within the PSII RC, but not an important contributor to light harvesting or triplet Chl *quenching* (Telfer, 2002). We showed that β -carotene content per Chl-*a* was maintained at a low content after HL exposure of HPPD inhibited algae (-70% from the control; p=0.002) and was 50% less than the control in HL (p=0.005).

This strong decrease may partially explain the destruction or the wrong assembly of D1 protein under these conditions, since it is known that β -carotene plays an essential role in the turnover and assembly of D1 protein into functional PSII (Trebst and Depka, 1997).

Furthermore, it was shown that β -carotene present in a damaged RC can be hydroxylated into zeaxanthin and therefore causing a decrease in the β -carotene content (Depka *et al.*, 1998). Therefore, on top of the induction of xanthophyll cycle, this may also explain why in our conditions, zeaxanthin content per cell did rise respectively by 35% (nonsignificant for the control; p=0.065) and by 72% (significant for the mesotrione inhibited algae; p=0.004) when LL acclimated cells were transferred 75 min in HL (Table III).

These results showed that inhibition of the HPPD by mesotrione induced alteration of the HL stress protection mechanisms, indicating that HPPD activity has a major role for photosynthesis when *C. reinhardtii* was exposed to HL.

2.5.4 Recovery of the photosynthetic apparatus

While HPPD products (PQ and tocopherol) do not seem to play a critical role in photosynthetic energy dissipation in LL, they seem to be critical when algal culture is exposed to HL stress. We showed that a potentiation effect of the herbicide effect occurred in HL and was linked to the HPPD role (*i.e.* equilibrating photochemistry and energy dissipation), thus preserving most of the PSII photosynthetic activity.

Furthermore, we have shown that the combined effect of mesotrione and HL had deleterious effect on the capacity of the energy-dependant *quenching* (qE) of *C. reinhardtii*. In addition, a decrease in β -carotene content was observed under these conditions.

Since β -carotene plays an essential role in the turnover and assembly of D1 protein into functional PSII (Trebst and Depka, 1997) and since it was shown for *C. reinhardtii* that the relaxation of the non-photochemical *quenching* is mostly correlated to qE (Niyogi *et al.*, 1997a, b), we hypothesized that recovery in low light of photosynthetic activity after HL exposure may be affected by mesotrione. In order to validate this hypothesis, the recovery of the maximal PSII photochemical yield (Φ_M), ABS/RC and DI_o/RC were followed during recovery after 75 minutes exposure to HL in control and mesotrione treated algae (Fig. 1).

We demonstrated that the recovery of the maximal PSII quantum yield of the HPPD inhibited *C. reinhardtii* after HL exposure was strongly diminished. Indeed, Φ_M was not recovered after 120 min under low light while after 90 min it was completely recovered when no mesotrione was added before the HL exposure. The ABS/RC recovery was also drastically altered by the presence of mesotrione since after 120 min recovery under low light, the ABS/RC value was still 4 times higher compared to the initial value before the HL treatment (p<0.001). On the other hand, for the non-mesotrione-treated algae, 30 minutes were enough to recover completely as the parameter was similar than the initial value before the HL treatment (p<0.001).

Similarly, DI_o/RC did not reach its pre-HL-treatment level when the algae were exposed to both HL and mesotrione. The energy dissipation was, after 2 hours recovery, still 5 times higher than the pre-treatment value (p<0.001).

When compared to the control in HL, Φ_M decreased by 2.3 fold for mesotrione treated samples after HL exposure, thus showing higher closure or destruction of PSII RCs. Therefore, this closure or destruction of RC induced higher ABS/RC and DI_o/RC values as it was also shown for *C. reinhardtii* exposed 24h to dichromate, a pollutant known to decrease D1 protein content (Perreault *et al.*, 2009).

In *C. reinhardtii*, non-photochemical *quenching* relaxation was shown to be mostly linked to qE and less on xanthophyll cycle as it occurs in higher plants (Niyogi *et al.*, 1997ab). Therefore, the slower and delayed recovery observed for the mesotrione HL treated algae may be explained, at least partially, by their much lower qE capacity (-57%, see Table II).

The observed impact on the recovery mechanisms may also be linked to the drastic lost of β -carotene in mesotrione treated samples after HL (Table III), as these molecules are needed for PSII RCs assembly and stability (Trebst and Depka 1997).

We have shown in this study that for *C. reinhardtii* the important role of the HPPD products (PQ and tocopherols) on pigment composition, energy dissipation processes and photosynthetic activity was mainly revealed during HL treatment and recovery under LL.

2.6 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors want to thank Philip Spear for his generous support for HPLC analyses. Financial support was provided by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (to P.J.).

2.7 REFERENCES

- Adir N, Zer H, Shochat S, Ohad I (2003) Photoinhibition-a historical perspective. Photosynthesis Research 76 (1):343-370
- Allen JF, Bennett J, Steinback KE, Arntzen CJ (1981) Chloroplast protein phosphorylation couples plastoquinone redox state to distribution of excitation energy between photosystems. Nature 291 (5810):25-29
- Asada K, Takahashi M (1987) Production and scavenging of active oxygen in chloroplasts. In DJ Kyle, CB Osmond, CJ Arntzen, eds, Photoinhibition. Elsevier, Amsterdam, pp 227-287
- Bendall, D. S. (1982). Photosynthetic cytochromes of oxygenic organisms. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Bioenergetics 683(2): 119-151.
- Bilger W, Björkman O (1990) Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. Photosynthesis Research 25 (3):173-185
- Cramer WA, Furbacher PN, Szczepaniak A, Tae G-S (1991) Electron transport between photosystem II and photosystem I. In CP Lee, ed, Current Topics in Bioenergetics, Vol.16. Academic Press, San Diego, pp.179-222
- Demmig-Adams B (1990) Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin. Biochimica et Biophysica Acta 1020 (1):1-24
- Demmig-Adams B, Adams III W (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. Annual Review of Plant Biology 43 (1):599-626
- Demmig-Adams B, Gilmore A, Adams WW (1996) Carotenoids 3: in vivo function of carotenoids in higher plants. The FASEB Journal 10 (4):403-412
- Depka B, Jahns P, Trebst A (1998) β-Carotene to zeaxanthin conversion in the rapid turnover of the D1 protein of photosystem II. FEBS Letters 424 (3):267-270.
- Falk S, Samuelsson G, Öquist G (1990) Temperature-dependent photoinhibition and recovery of photosynthesis in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* acclimated to 12 and 27°C. Physiologia Plantarum 78 (2):173-180.

- Frank HA, Cogdell RJ (1996) Carotenoids in photosynthesis. Photochemistry and Photobiology 63 (3):257-264
- Frankart C, Eullaffroy P, Vernet G (2003) Comparative effects of four herbicides on nonphotochemical fluorescence *quenching* in *Lemna minor*. Environmental and Experimental Botany 49 (2):159-168.
- Fryer M (1992) The antioxidant effects of thylakoid Vitamin E (α-tocopherol). Plant, Cell & Environment 15 (4):381-392
- Garcia I, Rodgers M, Pepin R, Hsieh TF, Matringe M (1999) Characterization and subcellular compartmentation of recombinant 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Arabidopsis* in *transgenic tobacco*. Plant Physiology 119 (4):1507-1516
- García-Plazaola JI, Becerril JM (1999) A rapid high-performance liquid chromatography method to measure lipophilic antioxidants in stressed plants: simultaneous determination of carotenoids and tocopherols. Phytochemical Analysis 10 (6):307-313.
- Genty B, Briantais JM, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and *quenching* of chlorophyll fluorescence. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects 990 (1):87-92
- Havaux M, Lütz C, Grimm B (2003) Chloroplast Membrane Photostability in *chlPTransgenic* Tobacco Plants Deficient in Tocopherols. Plant Physiology 132 (1):300-310
- Havaux M, Eymery F, Porfirova S, Rey P, Dörmann P (2005) Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Cell Online 17 (12):3451-3469
- Horton, P. and M. T. Black (1981). Light-induced redox changes in chloroplast cytochrome b₆f after phosphorylation of membrane proteins. FEBS Letters 132(1): 75-77.
- Jahns P, Depka B, Trebst A (2000) Xanthophyll cycle mutants from *Chlamydomonas* reinhardtii indicate a role for zeaxanthin in the D1 protein turnover. Plant Physiology and Biochemistry 38 (5):371-376
- Jahns P, Holzwarth AR (2012) The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Bioenergetics 1817 (1):182-193.
- Juneau P, Dewez D, Matsui S, Kim SG, Popovic R (2001) Evaluation of different algal species sensitivity to mercury and metolachlor by PAM-fluorometry. Chemosphere 45 (4-5):589-598

- Juneau P, El Berdey A, Popovic R (2002) PAM fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper. Archives of environmental contamination and toxicology 42 (2):155-164
- Juneau P, Green B, Harrison P (2005) Simulation of Pulse-Amplitude-Modulated (PAM) fluorescence: Limitations of some PAM-parameters in studying environmental stress effects. Photosynthetica 43 (1):75-83
- Juneau P, Qiu B, Deblois CP (2007) Use of chlorophyll fluorescence as a tool for determination of herbicide toxic effect: Review. Toxicological and Environ Chemistry 89 (4):609-625
- Jung S, Kim JS, Cho KY, Tae GS, Kang BG (2000) Antioxidant responses of cucumber (*Cucumis sativus*) to photoinhibition and oxidative stress induced by norflurazon under high and low PPFDs. Plant Science 153 (2):145-154
- Kim JS, Jung S, Hwang IT, Cho KY (1999) Characteristics of chlorophyll *a* fluorescence induction in cucumber cotyledons treated with diuron, norflurazon, and sulcotrione. Pesticide Biochemistry and Physiology 65 (2):73-81
- Kim JS, Kim TJ, Kwon O, Cho K (2002) Mcchanism of action of sulcotrione, a 4hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitor, in developed plant tissues. Photosynthetica 40 (4):541-545
- Kitajima M, Butler W (1975) *Quenching* of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics 376 (1):105-115
- Kramer DM, Cruz JA, Kanazawa A (2003) Balancing the central roles of the thylakoid proton gradient. Trends in Plant Science 8 (1):27-32
- Krüger GHJ, Tsimilli M, Strasser RJ (1997) Light stress provokes plastic and elastic modifications in structure and function of photosystem II in *camellia* leaves. Physiologia Plantarum 101 (2):265-277
- Kruk J, Holländer-Czytko H, Oettmeier W, Trebst A (2005) Tocopherol as singlet oxygen scavenger in photosystem II. Journal of plant physiology 162 (7):749-757
- Kruk J, Trebst A (2008) Plastoquinol as a singlet oxygen scavenger in photosystem II. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics 1777 (2):154-162
- Lee DL, Prisbylla MP, Cromartie TH, Dagarin DP, Howard SW, Provan WML, Ellis MK, Fraser T, Mutter LC (1997) The discovery and structural requirements of inhibitors of p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. Weed science:601-609

- Maeda H, Sakuragi Y, Bryant DA, DellaPenna D (2005) Tocopherols protect Synechocystis sp. strain PCC 6803 from lipid peroxidation. Plant Physiology 138 (3):1422-1435
- Maxwell DP, Falk S, Huner NPA (1995) Photosystem II excitation pressure and development of resistance to photoinhibition (I. light-harvesting complex II abundance and zeaxanthin content in *Chlorella vulgaris*. Plant Physiology 107 (3):687
- Mayer MP, Beyer P, Kleinig H (1990) Quinone compounds are able to replace molecular oxygen as terminal electron acceptor in phytoene desaturation in chromoplasts of *Narcissus pseudonarcissus L*. European journal of biochemistry 191 (2):359-363
- Mitchell G, Bartlett DW, Fraser TEM, Hawkes TR, Holt DC, Townson JK, Wichert RA (2001) Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize. Pest management science 57 (2):120-128
- Müller P, Li XP, Niyogi KK (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. Plant Physiology 125 (4):1558-1566
- Munné-Bosch S, Alegre L (2002a) The function of tocopherols and tocotrienols in plants. Critical Reviews in Plant Sciences 21 (1):31-57
- Munné-Bosch S, Alegre L (2002b) Interplay between ascorbic acid and lipophilic antioxidant defences in chloroplasts of water-stressed Arabidopsis plants. FEBS Letters 524 (1-3):145-148
- Niyogi KK, Bjorkman O, Grossman AR (1997a) *Chlamydomonas* xanthophyll cycle mutants identified by video imaging of chlorophyll fluorescence *quenching*. The Plant Cell Online 9 (8):1369-1380
- Niyogi KK, Björkman O, Grossman AR (1997b) The roles of specific xanthophylls in photoprotection. Proceedings of the National Academy of Sciences 94 (25):14162
- Norris SR, Barrette TR, DellaPenna D (1995) Genetic dissection of carotenoid synthesis in *Arabidopsis* defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. The Plant Cell Online 7 (12):2139-2149
- Nowicka B, Kruk J (2012) Plastoquinol is more active than α-tocopherol in singlet oxygen scavenging during high light stress of *Chlamydomonas reinhardtii*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Bioenergetics 1817 (3):389-394.

- Perreault F, Ait Ali N, Saison C, Popovic R, Juneau P (2009) Dichromate effect on energy dissipation of photosystem II and photosystem I in Chlamydomonas reinhardtii. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 96 (1):24-29
- Schreiber U, Schliwa U, Bilger W (1986) Continuous recording of photochemical and nonphotochemical chlorophyll fluorescence *quenching* with a new type of modulation fluorometer. Photosynthesis Research 10 (1):51-62
- Schulz A, Ort O, Beyer P, Kleinig H (1993) SC-0051, a 2-benzoyl-cyclohexane-1, 3-dione bleaching herbicide, is a potent inhibitor of the enzyme p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. FEBS Letters 318 (2):162-166
- Seaton GGR, Walker DA (1992) Validating chlorophyll fluorescence measures of efficiency: observations on fluorimetric estimation of photosynthetic rate. Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences 249 (1324):41-47
- Singh KK, Shyam R, Sane PV (1996) Reactivation of photosynthesis in the photoinhibited green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: role of dark respiration and of light. Photosynthesis Research 49 (1):11-20
- Smirnoff N, Wheeler GL (2000) Ascorbic Acid in Plants: Biosynthesis and Function. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 35 (4):291-314.
- Strasser BJ, Dau H, Heinze I, Senger H (1999) Comparison of light induced and cell cycledependent changes in the photosynthetic apparatus: a fluorescence induction study on the green alga *Scenedesmus obliquus*. Photosynthesis Research 60 (2):217-227
- Telfer A (2002) What is β-carotene doing in the photosystem II reaction centre? Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences 357 (1426):1431-1440
- Thayer SS, Björkman O (1990) Leaf Xanthophyll content and composition in sun and shade determined by HPLC. Photosynthesis Research 23 (3):331-343.
- Thiele A, Krause G (1994) Xanthophyll cycle and thermal energy dissipation in photosystem II: Relationship between zeaxanthin formation, energy-dependent fluorescence *quenching* and photoinhibition (*Spinacia oleracea*). Journal of plant physiology 144
- Thiele A, Schirwitz K, Winter K, Krause GH (1996) Increased xanthophyll cycle activity and reduced D1 protein inactivation related to photoinhibition in two plant systems acclimated to excess light. Plant Science 115 (2):237-250
- Trebst A, Depka B (1997) Role of carotene in the rapid turnover and assembly of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. FEBS Letters 400 (3):359-362

- Trebst A, Depka B, Holländer-Czytko H (2002) A specific role for tocopherol and of chemical singlet oxygen quenchers in the maintenance of photosystem II structure and function in *Chlamydomonas reinhardtii*. FEBS Letters 516 (1-3):156-160
- Trebst A, Depka B, Jäger J, Oettmeier W (2004) Reversal of the inhibition of photosynthesis by herbicides affecting hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by plastoquinone and tocopheryl derivatives in *Chlamydomonas reinhardtii*. Pest management science 60 (7):669-674
- Xu K, Jiang H, Juneau P, Qiu B (2012) Comparative studies on the photosynthetic responses of three freshwater phytoplankton species to temperature and light regimes. J Appl Phycol 24 (5):1113-1122.
- Yamamoto H (1979) Biochemistry of the violaxanthin in higher plants. Pure Appl Chem 51:639-648
- Zer, H. and I. Ohad (2003). Light, redox state, thylakoid-protein phosphorylation and signaling gene expression. Trends in biochemical sciences 28(9): 467-470.
- Zito F, Finazzi G, Delosme R, Nitschke W, Picot D, Wollman FA (1999) The Q_o site of cytochrome b₆f complexes controls the activation of the LHCII kinase. The EMBO journal 18 (11):2961-2969

Table 2.1 Effect of mesotrione, HL treatment and combined effect (HL + mesotrione) on fluorescence quenching repartition of energy (qP, qN, UQFrel) and photosynthetic activity parameters (Φ M and Φ 'M), in percentage from control. Measurements were done before and after a 75 minutes high light treatment (1100μ E/m2/s) of low light acclimated C. reinhardtii cultures. Data are means \pm SD (n=5-6). Within the same treatment, values followed by one asterisk are significantly different from the control and by two asterisks, values are significantly different from thL (student test).

	Φ _M	±	Ф' _М	±	qP	±	qN	±	UQF _{rel}	±
Effect of mesotrione	98	1	98	2	100	1	59*	15	113	12
Effect of HL	78*	5	24*	3	37*	2	157*	13	988*	110
Mesotrione + HL	60*,**	3	12*,**	1	41*	4	367*,**	57	758*,**	232

Table 2.2 Effect of mesotrione, HL treatment and combined effect (HL + mesotrione) on qPQ, qEmax, ABS/RC and DI₀/RC, before and after a 75 minutes high light treatment $(1100\mu E/m^2/s)$ of *C. reinhardtii*, in percentage from control. Measurements were done before and after a 75 minutes high light treatment $(1100\mu E/m^2/s)$ of low light acclimated *C. reinhardtii* cultures. Data are means \pm SD of two independent experiments in triplicate (n=6). Within the same treatment, values followed by one asterisk are significantly different from the control and by two asterisks, values are significantly different from control in HL (student-test).

	q _{Emax}	±	q _{PQ}	±	ABS/RC	±	DI ₀ /RC	±
Effect of Mesotrione	67*	13	96	7	92	7	93	9
Effect of HL	140*	9	108	4	162*	30	317*	74
Mesotrione + HL	43**	6	51*	9	368*,**	44	1002*,**	146

Table 2.3 Effect of mesotrione, HL treatment and combined effect (HL + mesotrione) on pigment composition and α -tocopherol content per cell after a 75 minutes high light treatment (1100 μ E/m²/s) of *C. reinhardtii*, in percentage from control (% pg/cell). Measurements were done before and after a 75 minutes high light treatment (1100 μ E/m²/s) of low light acclimated *C. reinhardtii* cultures. Data are means \pm SD (n=4). Within the same treatment, values followed by one asterisk are significantly different from the control and by two asterisk, values are significantly different from control in HL (student-test).

	Effect of mesotrione		Effect o	of HL	Mesotrione + HL	
Pigment (% pg/cell)		±		±		±
Chl-a	57*	6	65*	12	87	17
Chl-b	65*	4	65*	11	93 ^{*,**}	18
Total Carotenoids	38*	10	92	10	98	16
β-carotene	23*	13	57*	25	30**,**	5
Lutein	37*	9	121	7	135*	23
Neoxanthin	50*	9	65*	6	80**	15
Violaxanthin	48*	5	22*	2	28*	4
Antheraxanthin	89	33	139	18	123	33
Zeaxanthin	50*	3	135*	18	172*	33
a-tocopherol	65*	8	61*	15	71	12
α-tocopherol/Chl-a	114	16	94	7	83	6
%Z/(Z+A+V)	97	7	372*	35	419*	18
Car./Chl-a	65*	9	144*	16	113**	6

Table 2.4 Effect of mesotrione, HL and interaction between HL and mesotrione on ratio of antennas between PSII and PSI of *C. reinhardtii* whole-cells. Peaks wavelengths of PSII and PSI were determined graphically as 690.5nm and 720nm: ratio of PSII/PSI was then calculated by $F_{690.5nm}$ / F_{719nm} . Results are means \pm (SD), calculated from one or two independent experiments in triplicates, in which each replicate was measured twice to assure reproducibility of the method (n=3-6). Within the same treatment, values followed by one asterisk are significantly different from the control and by two asterisks, values are significantly different from control in HL (Tukey test).

	F _{PSII} /F _{PSI}
Control	2.89 (0.42)
Effect of mesotrione	3.81* (0.10)
Effect of HL	2.73 (0.28)
Mesotrione + HL	2.47 (0.13)



Figure 2.1 Fluorescence parameter values (Φ m, ABS/RC, DIo/RC), in percentage from control of low light-adapted (100 μ E/m2/s) C. reinhardtii cells exposed to high light for 75 minutes (1100 μ E/m2/s; clear box), then transferred 120 minutes under recovery low light conditions (35 μ E/m2/s; cross hatch box). This has allowed the recovery of both mesotrione inhibited (-•-) and control algae (-o-) samples. Results are means ± SD (bars) with a n=6

CONCLUSION

L'objectif de notre projet de recherche portait sur les effets d'un inhibiteur d'HPPD sur les processus de dissipation de l'énergie au niveau du photosystème II, sur la composition pigmentaire et sur la teneur en α -tocophérol chez l'algue verte *C. reinhardtii*. Notre recherche a contribué à mieux caractériser le rôle de l'enzyme HPPD et des molécules dont elle gère la synthèse (PQ, tocophérols et caroténoïdes) dans la dissipation de l'énergie. Notre projet de recherche présente une problématique principale : Investigation des effets d'un inhibiteur d'HPPD sur les processus photochimiques et non-photochimiques de dissipation de l'énergie au niveau du PSII.

Dans le chapitre II de cette recherche, nous avons étudié les processus photochimiques et non-photochimiques de dissipation de l'énergie chez C. reinhardtii, en présence d'un inhibiteur d'HPPD. Dans cette section de la recherche, notre démarche méthodologique consistait à mesurer les changements dans l'activité photosynthétique et des processus de dissipation de l'énergie par 3 méthodes associées à la fluorescence chlorophyllienne (PAM, PEA, 77K), dans la composition pigmentaire (chlorophylles, carotènes et xanthophylles) et dans la teneur en α -tocophérol par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Nous avons utilisé comme traitement complémentaire un stress lumineux afin d'étudier plus particulièrement les processus de dissipation de l'énergie sous forme non-photochimique, au niveau du PSII. Nos résultats montrent qu'une exposition pendant 24h à un inhibiteur d'HPPD n'a pas induit de photoinhibition au niveau du PSII, tandis que la capacité maximale du quenching ApH-dépendant s'est réduite (q_{Emax}: -33%). Par conséquent, un changement dans les états de transition d'une certaine portion des LHC a été observé, indiqué par une hausse de 36% du FPSII/FPSI, en présence de l'inhibiteur d'HPPD. Malgré le fait que les cultures algales exposées possédaient un ratio Car:Chl-a diminué, nos résultats ne présentent aucun changement dans l'absorbance et la dissipation par centre réactionnel.

Nos résultats montrent qu'après un stress lumineux, le rendement photosynthétique maximal et opérationnel du PSII a grandement diminué en présence de l'inhibiteur.

Ceci est accompagné par un *quenching* non-photochimique deux fois plus élevé, tandis que l'activation du cycle des xanthophylles (%Z/(Z+A+V)) a été similaire dans les deux traitements. Aucun changement dans le ratio α -toc./Chl-*a* n'a été observé et nous suggérons que les Chl-*a* sont détruites au même taux que les toc., même en situation de stress oxydatif.

Nos résultats montrent que la capacité maximale du quenching associé à l'établissement d'un ΔpH transthylakoïdien s'est élevée dans ces conditions pour les algues non-traitées (+40%), mais réduite pour les algues traitées avec l'inhibiteur (-57%). Étant donné que le qN s'est grandement activé malgré la baisse de qE_{max} et que les états de transition n'ont pas d'influence pendant un stress lumineux (indiqué par un ratio FPSII/FPSI inchangé), nos résultats révèlent indirectement une hausse compensatoire du qI (photoinhibition), puisque ces processus non-photochimiques sont interdépendants. Cette hausse du qI observée a aussi été indiquée par des hausses appréciables de l'absorbance et de la dissipation par centre réactionnel actif, deux paramètres qui reflètent bien la fermeture des centres réactionnels ou la photoinhibition. Nos résultats démontrent que les transporteurs d'électrons en aval du PSII sont moins efficaces afin de drainer les électrons et que les centres réactionnels du PSII sont hautement réduits (ou fermés) après 75 minutes de stress lumineux. La baisse observée de la teneur en β -carotène par cellule, combinée à la baisse de la capacité du *quenching* associé au ΔpH transthylakoïdien, a eu un impact négatif sur la récupération de l'activité photosynthétique des PSII après un stress lumineux, puisque cette récupération n'était pas complétée après 120 minutes sous illumination d'intensité faible.

Nos résultats suggèrent que la baisse importante dans la teneur en β -carotène peut être expliquée en partie par une destruction ou par le mauvais assemblage des protéines D1, puisqu'il est connu que la β -carotène joue un rôle prépondérant dans le remplacement et l'assemblage des protéines D1 dans les PSII fonctionnels. En bref, nos résultats révèlent un effet de potentialisation de l'inhibiteur d'HPPD en présence d'un stress lumineux sur les processus de dissipation de l'énergie chez *C. reinhardtii.* Notre recherche nous permet de conclure que l'inhibition de l'enzyme HPPD (avec la mésotrione) induit une altération des mécanismes de dissipation de l'énergie en excès et cela indique que l'HPPD possède un rôle majeur dans la photosynthèse chez *C. reinhardtii* et ce, particulièrement en situation de stress lumineux et en situation de récupération après ce même stress. Nos études ont démontré que le principal rôle de l'enzyme et des molécules dont elle gère la synthèse (PQ, tocophérols et caroténoïdes) est révélé durant l'exposition à un stress lumineux et durant la récupération de l'activité photosynthétique. Cependant, le rôle de l'HPPD est très complexe, alors qu'elle gère la synthèse de trois types de molécules étant responsables à la fois de processus photochimiques et non-photochimiques de dissipation de l'énergie et d'autres études devront être réalisées afin de mieux discerner chacun de ces rôles



AUTRE CONTRIBUTION

Article nécessitant d'autres recherches avant publication

Racine, F., Xu K. and Juneau, P. A study on *C. reinhardtii* mechanism of state transition: effects of light intensities pre-incubation prior room-temperature and 77k fluorescence measurements

Contexte : Au cours de ma maîtrise, je me suis rendu compte que l'espèce *C. reinhardtii* présentait des états de transition particulier lorsque cette espèce se développait dans certaines conditions. Cette situation est donc devenue un projet complémentaire que je n'ai pas eu le temps de compléter au cours de la maîtrise, puisque les résultats obtenus ont soulevé beaucoup de questions plus imposantes que mon projet principal. Nous avons décidé de ne pas présenter ces résultats dans le mémoire, qui seront complétés par des analyses concernant la chlororespiration.



RÉFÉRENCES

- Adir N, Zer H, Shochat S, Ohad I (2003) Photoinhibition-a historical perspective. Photosynthesis Research 76 (1):343-370
- Albertsson P-Å (2001) A quantitative model of the domain structure of the photosynthetic membrane. Trends in Plant Science 6 (8):349-354
- Allen JF (1992) Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. Biochimica et Biophysica Acta 1098 (3):275-335
- Allen JF (1993) Redox control of transcription: sensors, response regulators, activators and repressers. FEBS Letters 332 (3):203-207.
- Allmer J, Naumann B, Markert C, Zhang M, Hippler M (2006) Mass spectrometric genomic data mining: Novel insights into bioenergetic pathways in *Chlamydomonas* reinhardtii. Proteomics 6 (23):6207-6220.
- Aro E-M, Kettunen R, Tyystjärvi E (1992) ATP and light regulate D1 protein modification and degradation Role of D1* in photoinhibition. FEBS Letters 297 (1-2):29-33
- Aro EM, McCaffery S, Anderson JM (1993) Photoinhibition and D1 Protein Degradation in Peas Acclimated to Different Growth Irradiances. Plant Physiology 103 (3):835-843.
- Baker NR, Harbinson J, Kramer DM (2007) Determining the limitations and regulation of photosynthetic energy transduction in leaves. Plant, Cell & Environment 30 (9):1107-1125
- Barber J, Kühlbrandt W (1999) Photosystem II. Current Opinion in Structural Biology 9 (4):469-475.
- Bassi R, Sandonà D, Croce R (1997) Novel aspects of chlorophyll a/b-binding proteins. Physiologia Plantarum 100 (4):769-779
- Bendall DS (1982) Photosynthetic cytochromes of oxygenic organisms. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Bioenergetics 683 (2):119-151
- Bennoun P (2002) The present model for chlororespiration. Photosynthesis Research 73 (1):273-277
- Bulté L, Gans P, Rebéillé F, Wollman F-A (1990) ATP control on state transitions in vivo in Chlamydomonas reinhardtii. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics 1020 (1):72-80
- Böger P, Sandmann G (1993) Pigment biosynthesis and herbicide interaction. Photosynthetica 28

- Bonaventura C, Myers J (1969) Fluorescence and oxygen evolution from Chlorella pyrenoidosa. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Bioenergetics 189 (3):366-383
- Bonente G, Howes BD, Caffarri S, Smulevich G, Bassi R (2008) Interactions between the photosystem II subunit PsbS and xanthophylls studied in vivo and in vitro. Journal of Biological Chemistry 283 (13):8434
- Bonente G, Ballottari M, Truong TB, Morosinotto T, Ahn TK, Fleming GR, Niyogi KK, Bassi R (2011) Analysis of LhcSR3, a Protein Essential for Feedback De-Excitation in the Green Algae *Chlamydomonas reinhardtii*. Plos Biol 9 (1)
- Buschmann C (1995) Variation of the *Quenching* of Chlorophyll Fluorescence under Different Intensities of the Actinic Light in Wildtype Plants of Tobacco and in an Aurea Mutant Deficient of LightHarvesting-Complex. Journal of plant physiology 145 (3):245-252
- Crouch NP, Adlington RM, Baldwin JE, Lee MH, MacKinnon CH (1997) A mechanistic rationalisation for the substrate specificity of recombinant mammalian 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (4-HPPD). Tetrahedron 53 (20):6993-7010
- Dekker JP, Van Grondelle R (2000) Primary charge separation in photosystem II. Photosynthesis Research 63 (3):195-208
- Delosme R, Olive J, Wollman F-A (1996) Changes in light energy distribution upon state transitions: an in vivo-photoacoustic study of the wild type and photosynthesis mutants from *Chlamydomonas reinhardtii*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Bioenergetics 1273 (2):150-158
- Demmig-Adams B (1990) Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin. Biochimica et Biophysica Acta 1020 (1):1-24
- Demmig-Adams B, Adams III W (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. Annual Review of Plant Biology 43 (1):599-626
- Demmig-Adams B, Adams III WW (2006) Photoprotection in an ecological context: the remarkable complexity of thermal energy dissipation. New Phytologist 172 (1):11-21
- Di Mascio P, Devasagayam TPA, Kaiser S, Sies H (1990) Carotenoids, tocopherols and thiols as biological singlet molecular oxygen quenchers. Biochemical Society Transactions 18 (6):1054-1056
- Escoubas JM, Lomas M, LaRoche J, Falkowski PG (1995) Light intensity regulation of cab gene transcription is signaled by the redox state of the plastoquinone pool. Proceedings of the National Academy of Sciences 92 (22):10237
- Fiedler E, Soll J, Schulz G (1982) The formation of homogentisate in the biosynthesis of tocopherol and plastoquinone in spinach chloroplasts. Planta 155 (6):511-515

- Finazzi G (2004) The central role of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in revealing the mechanism of state transitions. Journal of Experimental Botany 56 (411):383-388.
- Force L, Critchley C, van Rensen J (2003) New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants. Photosynthesis Research 78 (1):17-33.
- Frank HA, Cogdell RJ (1996) Carotenoids in photosynthesis. Photochemistry and Photobiology 63 (3):257-264
- Fryer M (1992) The antioxidant effects of thylakoid Vitamin E (α-tocopherol). Plant, Cell & Environment 15 (4):381-392
- Fryer MJ, Oxborough K, Mullineaux PM, Baker NR (2002) Imaging of photo-oxidative stress responses in leaves. Journal of Experimental Botany 53 (372):1249
- Fulgosi H, Vener AV, Altschmied L, Herrmann RG, Andersson B (1998) A novel multifunctional chloroplast protein: identification of a 40 kDa immunophilin-like protein located in the thylakoid lumen. EMBO J 17 (6):1577-1587
- Gal A, Zer H, Ohad I (1997) Redox-controlled thylakoid protein phosphorylation. News and views. Physiologia Plantarum 100 (4):869-885
- Garcia I, Rodgers M, Pepin R, Hsieh TF, Matringe M (1999) Characterization and subcellular compartmentation of recombinant 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Arabidopsis* in *transgenic tobacco*. Plant Physiology 119 (4):1507-1516
- García-Mendoza E, Colombo-Pallotta MF (2007) The giant kelp *Macrocystis pyrifera* presents a different nonphotochemical *quenching* control than higher plants. New Phytologist 173 (3):526-536.
- Genty B, Briantais JM, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and *quenching* of chlorophyll fluorescence. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects 990 (1):87-92
- Georgakopoulos JH, Argyroudi-Akoyunoglou JH (1994) On the question of lateral migration of LHC II upon thylakoid protein phosphorylation in isolated pea chloroplasts: the stroma lamellar fraction separated from phosphorylated chloroplasts is not homogeneous. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 1188 (3):380-390.
- Grusak MA, DellaPenna D (1999) Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health 1. Annual Review of Plant Biology 50 (1):133-161

- Haldimann P, Tsimilli-Michael M (2002) Mercury inhibits the non-photochemical reduction of plastoquinone by exogenous NADPH and NADH: evidence from measurements of the polyphasic chlorophyll *a* fluorescence rise in *spinach* chloroplasts. Photosynthesis Research 74 (1):37-50
- Havaux M, Bonfils JP, Lütz C, Niyogi KK (2000) Photodamage of the photosynthetic apparatus and its dependence on the leaf developmental stage in the *npq1* Arabidopsis mutant deficient in the xanthophyll cycle enzyme violaxanthin deepoxidase. Plant Physiology 124 (1):273-284
- Havaux M, Eymery F, Porfirova S, Rey P, Dörmann P (2005) Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Cell Online 17 (12):3451-3469
- Heber U, Walker D (1992) Concerning a dual function of coupled cyclic electron transport in leaves. Plant Physiology 100 (4):1621
- Helier, R., R. Esnault et C. Lance. 1998. Physiologie végétale. J. Nutrition. Paris: Dunod, pp. 323.
- Hopkins WG (2003) Physiologie végétale. De Boeck Université, Paris, pp.171-184
- Horton P, Ruban A, Walters R (1996) Regulation of light harvesting in green plants. Annual Review of Plant Biology 47 (1):655-684
- Hundal T, Forsmark-Andrée P, Ernster L, Andersson B (1995) Antioxidant Activity of Reduced Plastoquinone in Chloroplast Thylakoid Membranes. Archives of Biochemistry and Biophysics 324 (1):117-122
- Jahns P, Latowski D, Strzalka K (2009) Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: The role of antenna proteins and membrane lipids. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics 1787 (1):3-14
- Jahns P, Holzwarth AR (2012) The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Bioenergetics 1817 (1):182-193.
- Juneau P, El Berdey A, Popovic R (2002) PAM Fluorometry in the Determination of the Sensitivity of *Chlorella vulgaris, Selenastrum capricornutum*, and *Chlamydomonas reinhardtii* to Copper. Archives of environmental contamination and toxicology 42 (2):155-164.
- Juneau P, Green B, Harrison P (2005) Simulation of Pulse-Amplitude-Modulated (PAM) fluorescence: Limitations of some PAM-parameters in studying environmental stress effects. Photosynthetica 43 (1):75-83

- Juneau P, Qiu B, Deblois CP (2007) Use of chlorophyll fluorescence as a tool for determination of herbicide toxic effect: Review. Toxicological and Environ Chemistry 89 (4):609-625
- Kamal-Eldin A, Appelqvist LÅ (1996) The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. Lipids 31 (7):671-701
- Kautsky H, Hirsch A (1931) Neue versuche zur kohlensäureassimilation. Naturwissenschaften 19 (48):964-964
- Karp G (2009) Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments.6th edition. In. John Wiley & Sons, pp.206-229
- Kim JS, Jung S, Hwang IT, Cho KY (1999) Characteristics of chlorophyll a fluorescence induction in cucumber cotyledons treated with diuron, norflurazon, and sulcotrionem. Pesticide Biochemistry and Physiology 65 (2):73-81
- Kim JS, Kim TJ, Kwon O, Cho K (2002) Mechanism of action of sulcotrione, a 4hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitor, in developed plant tissues. Photosynthetica 40 (4):541-545
- Kitajima M, Butler W (1975) Fluorescence quenching in photosystem II of chloroplasts. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics 376 (1):116-125
- Kramer D, Crofts AR (1993) The concerted reduction of the high-and low-potential chains of the bf complex by plastoquinol. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics 1183 (1):72-84
- Krause G, Weis E (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. Annual Review of Plant Biology 42 (1):313-349
- Krause GH, Jahns P (2003) Pulse amplitude modulated chlorophyll fluorometry and its application in plant science. Advances in Photosynthesis and Respiration. 13:373-399
- Kruk J, Holländer-Czytko H, Oettmeier W, Trebst A (2005) Tocopherol as singlet oxygen scavenger in photosystem II. Journal of plant physiology 162 (7):749-757
- Kruk J, Trebst A (2008) Plastoquinol as a singlet oxygen scavenger in photosystem II. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics 1777 (2):154-162
- Laisk A, Oja V (2000) Electron transport through photosystem II in leaves during light pulses: acceptor resistance increases with nonphotochemical excitation *quenching*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics 1460 (2-3):255-267
- Lee DL, Prisbylla MP, Cromartie TH, Dagarin DP, Howard SW, Provan WML, Ellis MK, Fraser T, Mutter LC (1997) The discovery and structural requirements of inhibitors of p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. Weed science:601-609
- Lee DL, Knudsen CG, Michaely WJ, Chin HL, Nguyen NH, Carter CG, Cromartie TH, Lake BH, Shribbs JM, Fraser T (1998) The structure–activity relationships of the triketone class of HPPD herbicides[†]. Pesticide science 54 (4):377-384
- Leitsch J, Schnettger B, Critchley C, Krause GH (1994) Two mechanisms of recovery from photoinhibition in vivo: reactivation of photosystem II related and unrelated to D1-protein turnover. Planta 194 (1):15-21
- Marwood CA, Smith RE, Furgal JA, Charlton MN, Solomon KR, Greenberg BM (2000) Photoinhibition of natural phytoplankton assemblages in Lake Erie exposed to solar ultraviolet radiation. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 57 (2):371-379
- Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence—a practical guide. Journal of Experimental Botany 51 (345):659
- Mitchell G, Bartlett DW, Fraser TEM, Hawkes TR, Holt DC, Townson JK, Wichert RA (2001) Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize. Pest management science 57 (2):120-128
- Miyake C, Horiguchi S, Makino A, Shinzaki Y, Yamamoto H, Tomizawa K (2005) Effects of light intensity on cyclic electron flow around PSI and its relationship to nonphotochemical *quenching* of Chl fluorescence in *tobacco* leaves. Plant and cell physiology 46 (11):1819
- Morgan RM, Ivanov AG, Priscu JC, Maxwell DP, Huner NPA (1998) Structure and composition of the photochemical apparatus of the Antarctic green alga, *Chlamydomonas subcaudata*. Photosynthesis Research 56 (3):303-314
- Müller P, Li XP, Niyogi KK (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. Plant Physiology 125 (4):1558-1566
- Munekage Y, Takeda S, Endo T, Jahns P, Hashimoto T, Shikanai T (2001) Cytochrome b6f mutation specifically affects thermal dissipation of absorbed light energy in *Arabidopsis*. The Plant Journal 28 (3):351-359
- Norris SR, Barrette TR, DellaPenna D (1995) Genetic dissection of carotenoid synthesis in *Arabidopsis* defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. The Plant Cell Online 7 (12):2139-2149
- Niyogi KK, Bjorkman O, Grossman AR (1997a) *Chlamydomonas* xanthophyll cycle mutants identified by video imaging of chlorophyll fluorescence *quenching*. The Plant Cell Online 9 (8):1369-1380
- Niyogi KK, Björkman O, Grossman AR (1997b) The roles of specific xanthophylls in photoprotection. Proceedings of the National Academy of Sciences 94 (25):14162

- Niyogi KK, Grossman AR, Björkman O (1998) Arabidopsis mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. The Plant Cell Online 10 (7):1121-1134
- Ort DR, Yocum CF, Heichel IF (1996) Oxygenic photosynthesis : the light reactions. Kluwer, Dordrecht; Boston. 682 pages
- Pallett K, Little J, Sheekey M, Veerasekaran P (1998) The Mode of Action of Isoxaflutole I. Physiological Effects, Metabolism, and Selectivity. Pesticide Biochemistry and Physiology 62 (2):113-124
- Prisbylla M, Onisko B, Shribbs J (1993) The novel mechanism of action of the herbicidal triketones. Brit Crop Protection Council, pp 731
- Ralph P, Smith R, Macinnis-Ng C, Seery C (2007) Use of fluorescence-based ecotoxicological bioassays in monitoring toxicants and pollution in aquatic systems: Review. Toxicological and Environ Chemistry 89 (4):589-607
- Raven P, Johnson GB. (2002) Biology. McGraw-Hill Higher Education, Boston, Mass.
- Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE (2003) Biologie végétale. De Boeck Supérieur, Paris, pp.115-130
- Rintamäki E, Martinsuo P, Pursiheimo S, Aro EM (2000) Cooperative regulation of lightharvesting complex II phosphorylation via the plastoquinol and ferredoxinthioredoxin system in chloroplasts. Proceedings of the National Academy of Sciences 97 (21):11644
- Samson G, Prášil O, Yaakoubd B (1999) Photochemical and thermal phases of chlorophyll a fluorescence. Photosynthetica 37 (2):163-182
- Sandmann G, Kuhn M, Böger P (1993) Carotenoids in photosynthesis: Protection of D1 degradation in the light. Photosynthesis Research 35 (2):185-190
- Schnettger B, Leitsch J, Krause G (1992) Photoinhibition of photosystem 2 in vivo occurring without net D1 protein degradation. Photosynthetica 27 (1-2):261-265
- Schnettger B, Critchley C, Santore U, Graf M, Krause G (1994) Relationship between photoinhibition of photosynthesis, D1 protein turnover and chloroplast structure: effects of protein synthesis inhibitors. Plant, Cell & Environment 17 (1):55-64
- Schreiber U, Schliwa U, Bilger W (1986) Continuous recording of photochemical and nonphotochemical chlorophyll fluorescence *quenching* with a new type of modulation fluorometer. Photosynthesis Research 10 (1):51-62

- Schreiber U, Bilger W, Neubauer C (1994) Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: Ecophysiology of photosynthesis. Springer, pp 49-70
- Schreiber U, Müller JF, Haugg A, Gademann R (2002) New type of dual-channel PAM chlorophyll fluorometer for highly sensitive water toxicity biotests. Photosynthesis Research 74 (3):317-330
- Schulz A, Ort O, Beyer P, Kleinig H (1993) SC-0051, a 2-benzoyl-cyclohexane-1, 3-dione bleaching herbicide, is a potent inhibitor of the enzyme p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. FEBS Letters 318 (2):162-166
- Staehelin L, Arntzen C (1986) Chloroplast structure and supramolecular organization of photosynthetic membranes. Photosynthesis III Photosynthetic membranes and light harvesting systems:1-84
- Strasser R (1978) The grouping model of plant photosynthesis. In 'Chloroplast development'.(Eds G Akoyunoglou and J Argyroudi-Akoyunoglou) Elsevier: North Holland Biomedical Press: Amsterdam, The Netherlands, pp. 513–524.
- Strasser R (1981) The grouping model of plant photosynthesis: heterogeneity of photosynthetic units in thylakoids. Photosynthesis III Structure and molecular organisation of the photosynthetic apparatus:727-737
- Strasser B, Strasser R (1995) Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP test. Photosynthesis: from light to biosphere 5:977-980
- Strasser RJ, Srivastava A (1995) Polyphasic Chlorophyll a fluorescence transient in plants and cynaobacteria. Photochemistry and Photobiology 61 (1):32-42
- Strasser BJ, Dau H, Heinze I, Senger H (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 60 (2):217-227
- Strasser R, Srivastava A, Tsimilli-Michael M (2000) The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation:445-483
- Štroch M, Špunda V, Kurasova I (2004) Non-radiative dissipation of absorbed excitation energy within photosynthetic apparatus of higher plants. Photosynthetica 42 (3):323-337
- Thiele A, Schirwitz K, Winter K, Krause GH (1996) Increased xanthophyll cycle activity and reduced D1 protein inactivation related to photoinhibition in two plant systems acclimated to excess light. Plant Science 115 (2):237-250

- Thiele A, Krause G, Winter K (1998) In situ study of photoinhibition of photosynthesis and xanthophyll cycle activity in plants growing in natural gaps of the tropical forest. Functional Plant Biology 25 (2):189-195
- Tomlin C, British Crop Protection C (2000) The pesticide manual : a world compendium. British Crop Protection Council, Farnham, 1254 pages.
- Trebitsh T, Danon A (2001) Translation of chloroplast *psbA mRNA* is regulated by signals initiated by both photosystems II and I. Proceedings of the National Academy of Sciences 98 (21):12289
- Trebst A, Depka B, Holländer-Czytko H (2002) A specific role for tocopherol and of chemical singlet oxygen quenchers in the maintenance of photosystem II structure and function in *Chlamydomonas reinhardtii*. FEBS Letters 516 (1-3):156-160
- Trebst A, Depka B, Jäger J, Oettmeier W (2004) Reversal of the inhibition of photosynthesis by herbicides affecting hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by plastoquinone and tocopheryl derivatives in *Chlamydomonas reinhardtii*. Pest management science 60 (7):669-674
- Tsimilli-Michael M, Eggenberg P, Biro B, Koves-Pechy K, Voros I, Strasser RJ (2000) Synergistic and antagonistic effects of arbuscular mycorrhizal fungi and Azospirillum and Rhizobium nitrogen-fixers on the photosynthetic activity of alfalfa, probed by the polyphasic chlorophyll a fluorescence transient O-J-I-P. Applied Soil Ecology 15 (2):169-182.
- Vallon O, Bulte L, Dainese P, Olive J, Bassi R, Wollman FA (1991) Lateral redistribution of cytochrome b₆/f complexes along thylakoid membranes upon state transitions. Proceedings of the National Academy of Sciences 88 (18):8262
- Viviani F, Little J, Pallett K (1998) The mode of action of isoxaflutole II. Characterization of the inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by the diketonitrile derivative of isoxaflutole. Pesticide Biochemistry and Physiology 62 (2):125-134
- Walters RG, Horton P (1993) Theoretical assessment of alternative mechanisms for nonphotochemical *quenching* of PS II fluorescence in *barley* leaves. Photosynthesis Research 36 (2):119-139
- White AJ, Critchley C (1999) Rapid light curves: a new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus. Photosynthesis Research 59 (1):63-72
- Whitmarsh J, Govindjee R (1999) The Photosynthetic Process. In: Concepts in Photobiology: Photosynthesis and Photomorphogenesis. Chapter 2, Kluwer Academic Publishers, Boston and Narosa Publishing House, Delhi,
- Whitmarsh J (2000) Electron transport and energy transduction. Cambridge: Cambridge Univ. Press, pp.87-105

- Wollman FA (2001) State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus. The EMBO journal 20 (14):3623-3630
- Yamamoto H (1979) Biochemistry of the violaxanthin in higher plants. Pure Appl Chem 51:639-648
- Zer H, Ohad I (2003) Light, redox state, thylakoid-protein phosphorylation and signaling gene expression. Trends in Biochemical Sciences 28 (9):467-470