



HAL
open science

Mécanisme de l'enzyme d'oxydation de l'eau

Naoko Ishida-Blanc

► **To cite this version:**

Naoko Ishida-Blanc. Mécanisme de l'enzyme d'oxydation de l'eau. Autre. Université Paris Sud - Paris XI, 2009. Français. NNT: . tel-00448309

HAL Id: tel-00448309

<https://theses.hal.science/tel-00448309>

Submitted on 18 Jan 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS SUD - 11

Ecole Doctorale de Chimie Paris Sud

Présentée par

Naoko ISHIDA-BLANC

Pour obtenir le grade de DOCTEUR de L'UNIVERSITE PARIS SUD 11

MECANISME DE L'ENZYME D'OXYDATION DE L'EAU

Soutenue le 16 décembre 2009, devant le jury composé de :

M. Ally AUKAULOO
Mme Elodie ANXOLABEHERE-MALLART
Mme Catherine BERTHOMIEU
M. Philippe CHAMPEIL
M. Alain BOUSSAC

Président
Rapporteur
Rapporteur
Rapporteur
Directeur de thèse



Laboratoire de Bioénergétique Moléculaire et Photosynthèse
CEA Saclay, iBitec-S, SB2SM

REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à remercier Alain pour m'avoir encadrée durant tout ce travail de thèse. Sa disponibilité et son enthousiasme m'ont aidé à rentrer dans le monde compliqué du photosystème II. Merci pour tous les conseils judicieux qu'il m'a donnés pour mon manuscrit et ma soutenance.

Je remercie également les membres du jury : Ally Aukauloo, Elodie Anxolabéhère-Mallart, Catherine Berthomieu et Philippe Champeil. La lecture de mon manuscrit n'a certainement pas été une chose facile. Je les remercie pour le temps qu'ils ont pu y passer, ainsi que pour leurs commentaires.

Je tiens également à remercier Fabrice Rappaport pour sa disponibilité et sa gentillesse à chaque fois qu'il m'a accueillie dans son laboratoire à l'IBPC. Merci à Jean-Marc Ducruet pour m'avoir initiée à la pratique de la thermoluminescence.

Je remercie également Katrin Beckmann et Johannes Messinger pour m'avoir invitée à deux reprises dans leur laboratoire en Allemagne. Cette expérience a été très enrichissante.

Je voudrais maintenant remercier Thanh, à la fois pour son aide dans les manips et dans la logistique, mais aussi et surtout pour sa bonne humeur perpétuelle et son soutien au cours de ces presque quatre années au laboratoire. Je remercie aussi particulièrement Arezki ainsi que Christine et Lisa. Toutes ces personnes ont fait de notre bureau un endroit accueillant et sympathique pour souffler entre deux manips.

Je remercie toutes les personnes du SB²SM, passées et présentes, et plus particulièrement Julie, Nando, Claire, Martin, Adjélé, Tiona, Anja, Clémence, Cédric.. et tous les autres. Ils ont tous participé à rendre mon séjour au laboratoire très agréable.

Je tiens en dernier lieu à remercier ma famille, en particulier mes parents, ma sœur, mes beaux-parents... qui m'ont été d'un grand soutien depuis le début.

Enfin, j'adresse un immense merci à Christophe. L'année 2009 aura été pour nous une année riche en émotions (et en stress). Je le remercie pour sa patience, son dévouement et son soutien sans lesquels je ne serais peut-être pas arrivée au bout de ce travail. Mari, coach, supporter, tu remplis à merveille tous ces rôles. Merci d'être à mes côtés jour après jour.

RESUME

L'oxydation de l'eau et la production du dioxygène atmosphérique sont réalisées par le Photosystème II. Le centre catalytique du PSII est constitué d'un cluster de 4 ions manganèse et de 1 ion calcium. Sous l'action de la lumière, le complexe Mn_4Ca passe par 5 états d'oxydation successifs (S_0 à S_4) avant l'émission d'oxygène au cours de la transition S_4 à S_0 . Bien que l'ion Ca^{2+} soit détecté dans les structures cristallographiques actuelles, son rôle reste à préciser. Un deuxième cofacteur est mis en jeu : le chlorure, dont la position et le rôle dans le dégagement d'oxygène ne sont pas clairement définis. Pour étudier ces deux cofacteurs, nous avons réalisé le remplacement biosynthétique du Ca^{2+} et du Cl^- par du Sr^{2+} et/ou du Br^- dans la cyanobactérie thermophile *Thermosynechococcus elongatus*.

Le dégagement d'oxygène sous éclairage continu diminue après substitution des cofacteurs. Il varie dans l'ordre suivant : $Ca/Cl > Ca/Br > Sr/Cl > Sr/Br$. Dans le chapitre III, nous mettons en évidence que cette baisse d'activité est due à un ralentissement de certaines étapes du transfert d'électron, et plus particulièrement de la transition S_3 à S_0 durant laquelle une phase de délai a été mise en évidence. Nous montrons que cette phase de délai correspond à une modification de l'environnement électrostatique de la chlorophylle P_{680} , impliquant très probablement des mouvements de protons. Nous arrivons ainsi à détecter un intermédiaire réactionnel au cours de la transition, grâce au ralentissement dû à l'échange des cofacteurs Ca^{2+} et Cl^- . Ces cinétiques ralenties accompagnent une baisse du niveau d'énergie libre de l'état S_3 et donc du potentiel d'oxydo-réduction du couple S_3/S_2 .

Dans le chapitre IV, le chlorure est remplacé biochimiquement par de l'iodure après une étude des conditions d'échangeabilité de l'halogénure. A nouveau, une baisse d'activité sous éclairage continu est expliquée par un ralentissement des cinétiques d'oxydation du cluster de Mn_4Ca . Les propriétés thermodynamiques du PSII sont modifiées en présence d'I mais il reste à savoir si cela est dû à la réduction du cluster de Mn_4Ca par l'iodure, ou à une augmentation du potentiel redox du couple S_3/S_2 .

Dans le chapitre V, nous nous intéressons à différents aspects structuraux des échantillons substitués biosynthétiquement. D'une part, nous mettons en évidence l'implication directe du Ca^{2+} dans la fixation des molécules d'eau substrat, ainsi que des phénomènes de protonation/déprotonation ayant lieu au cours du cycle des états S_i . D'autre part, nous montrons que nos résultats sont en faveur de l'existence de deux sites de fixation aux halogénures.

Mots-clés : photosystème II, cofacteurs, calcium, chlorure, transfert d'électrons, échange, cyanobactérie.

ABSTRACT

Photosystem II uses solar energy to drive water oxidation and atmospheric O₂ production. Its catalytic center comprises a cluster of four manganese and one calcium ions. The Mn₄Ca cluster goes through five sequential oxidation states (S₀ to S₄) before O₂ is evolved during the S₄ to S₀ transition. Although the Ca²⁺ ion is detected in the actual crystallographic structures, its role still needs to be clarified. A second cofactor is involved: the chloride, whose localization and role in the O₂ evolution are unclear. To study both cofactors, we replaced biosynthetically the Ca²⁺ and the Cl⁻ by Sr²⁺ and Br⁻ in the thermophilic cyanobacteria *Thermosynechococcus elongatus*.

In the substituted PSII, the O₂ evolution under continuous illumination is decreased. It varies in the following order: Ca/Cl > Ca/Br > Sr/Cl > Sr/Br. In chapter III, we explain this activity decrease by a kinetic limitation of some of the electron transfer steps, in particular the S₃ to S₀ transition during which a lag phase is put in evidence. We demonstrate that this lag phase corresponds to a modification of the electrostatic environment of the chlorophyll P₆₈₀, implying very likely proton movements. The significant slow down of the kinetics goes with a decrease of the free energy level of the S₃ state and consequently with a decrease of the redox potential of the S₃/S₂ couple.

In chapter IV, we study the exchangeability of the halide, and chloride is biochemically substituted with iodide. We observe a decrease of the catalytic activity due to the slowing down of the Mn₄Ca cluster oxidation kinetics. The thermodynamic properties of PSII are also modified by the iodide, but the question still arises whether this is due to the reduction of the Mn₄Ca cluster by I⁻, or to the increase of the redox potential of the S₃/S₂ couple.

In chapter V, we focus on the structural aspects of the biosynthetically modified PSII samples. On one hand, we highlight the direct implication of Ca²⁺ in the binding of the substrate water molecules, and protonation/deprotonation phenomena during the S-states cycle. On the other hand, we show that our results support the existence of two halide binding sites.

Key-words: photosystem II, cofactors, calcium, chloride, electron transfer, exchange, cyanobacteria.

LISTE DES ABREVIATIONS

Ala : alanine

Arg : arginine

ARN_m : acide ribonucléique messenger

Asp : acide aspartique

Asn : asparagine

ATP : adénosine triphosphate

βDM : dodecyl-beta-D-maltoside

BSA : bovine serum albumine

Car : caroténoïde

Chl : chlorophylle

Cyt : cytochrome

DCBQ : dichlorobenzoquinone

DMSO : diméthylsulfoxyde

Dnase : désoxyribonucléase

DO : densité optique

EDTA : acide éthylène diamine tetraacétique

EGTA : acide éthylène glycol tetraacétique

ENDOR : Electron Nuclear Double Resonance

EXAFS : Extended X-ray Absorption Fine Structure

FT : transformée de Fourier

Gln : glutamine

Glu : glutamate

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

His : histidine

HYSCORE : hyperfine sublevel correlation

IRTF : Infrarouge à Transformée de Fourier

LHC : light-harvesting complex

Lys : lysine

MES : acide 2-N morpholino-éthane sulfonique

NADP : nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate
Nd-YAG : neodymium-doped yttrium aluminium garnet
PC : phycocyanine
P_{D1} : chlorophylle D1
PE : phycoérythrine
Phéo : phéophytine
PPBQ : phényl-*p*-benzoquinone
PQ : plastoquinone
PSII : photosystème II
RPE : Résonance Paramagnétique Electronique
T. elongatus : *Thermosynechococcus elongatus*
Tyr : tyrosine
UV : ultraviolet
XANES : X-ray Absorption Near Edge Structure
XAS : X-ray absorption spectroscopy

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE I. INTRODUCTION	1
I) LA PHOTOSYNTHESE	1
1) Photosynthèse et vie terrestre.....	1
2) Organismes photosynthétiques.....	1
3) Pigments photosynthétiques.....	2
4) La chaîne photosynthétique.....	5
5) La photosynthèse artificielle	5
II) LE PHOTOSYSTEME II	8
1) Rôle	8
2) Première étape : l'absorption de la lumière.....	8
3) Structure du photosystème II.....	9
4) Mécanisme :	11
a) Chaîne de transfert d'électrons	11
b) Le cycle de Kok	14
c) Voie secondaire de transfert d'électrons.....	15
d) La tyrosine D.....	15
III) LE SITE CATALYTIQUE : LE CLUSTER DE Mn_4Ca	16
1) Structure du cluster de Mn_4Ca	16
a) La spectroscopie RPE.....	16
b) L'EXAFS	17
c) La cristallographie aux rayons X.....	17
d) Conclusion	19
2) Ligands du cluster de Mn_4Ca	20
3) Etats redox des Manganèse	21
4) Accès du substrat.....	23
5) Mécanisme d'oxydation de l'eau	24
a) Localisation du substrat.....	24
b) Formation de la liaison O-O.....	25
6) Transfert de protons	27
IV) LES COFACTEURS DU PHOTOSYSTEME II	28
1) Questions.....	28
2) Les principaux signaux RPE connus en fonction des états S	31
a) Etat S_2	31
b) Etat S_0	32
c) Etat S_1	33
d) Etat S_3	33
3) Le calcium	34
a) Méthodes d'extraction du Ca^{2+}	34
b) Stœchiométrie du calcium dans le PSII.....	34
c) Affinité de liaison.....	35
d) Calcium et avancement des états S.....	36
e) Cofacteurs alternatifs.....	36
4) Le chlorure	37
a) Méthodes d'extraction du chlorure.....	37
b) Chlorure et avancement des états S	38
c) Stœchiométrie du chlorure	39
d) Affinité de liaison.....	40
e) Cofacteurs alternatifs.....	40
i. Généralités	40
ii. Cas particulier de l'iodure.....	40
iii. Cas particulier du fluorure	42

CHAPITRE II. MATERIEL ET METHODES 43

I) UN ORGANISME DE CHOIX : <i>THERMOSYNECHOCOCCUS ELONGATUS</i>	43
II) METHODES	45
1) Culture des cellules et purification des thylakoides et du PSII	45
a) Conditions de culture.....	45
b) Purification des thylakoides	46
c) Purification du PSII.....	47
d) Déplétion en manganèse.....	47
2) Dégagement d'oxygène sous éclairage continu	47
3) Oxymétrie résolue en temps	48
a) Méthode.....	48
b) Analyse des données : émission d'oxygène sur une séquence de flashes.....	48
c) Analyse des données : vitesse d'émission d'oxygène	49
4) Thermoluminescence	50
a) Principe	50
b) Matériel.....	51
c) Analyse des données	53
5) Spectroscopie de changements d'absorption UV-visible	54
a) Méthode : matériel et intérêt.....	54
b) Simulation des oscillations.....	56
6) Résonance Paramagnétique Electronique.....	57
a) Principe	57
b) Protocole	58

CHAPITRE III. ECHANGE BIOSYNTHEIQUE DES COFACTEURS 61

I) INTRODUCTION	61
II) RESULTATS	61
1) Croissance des cellules.....	61
2) Purification enzymatique.....	62
3) Dégagement d'oxygène sous éclairage continu	62
a) Sur cellules entières.....	62
b) Sur PSII.....	63
4) Changements d'absorption	65
a) Introduction	65
b) Changements d'absorption à 292 nm	65
c) Cinétiques à 433 nm	71
d) Cinétiques à 292 nm.....	73
e) Cinétiques à 440 – 424 nm	77
5) Oxymétrie résolue en temps	81
a) Séquences de dégagement d'oxygène.....	82
b) Cinétiques de dégagement d'oxygène	83
6) Etudes des propriétés thermodynamiques par thermoluminescence	86
7) Mesure des énergies d'activation	90
8) Caractérisation par Résonance Paramagnétique Electronique	92
a) Introduction : Cas de l'échantillon contrôle Ca/Cl dans l'état S ₂	92
i. Spectre à 4 K.....	93
ii. Spectre à 8,5 K.....	94
iii. Spectre à 15 K.....	95
b) Spectres à 4 K	97
c) Spectres à 8,5 K.....	98
d) Spectres à 15 K	100
III) DISCUSSION	101

CHAPITRE IV. ECHANGE BIOCHIMIQUE DU CHLORURE..... 107

I) MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE D'ECHANGE BIOCHIMIQUE	107
1) Introduction	107
2) Dans des thylakoides.....	107
a) Comparaison des résultats obtenus sur les deux types d'électrode (45 minutes).....	107
b) Résultats de thermoluminescence : 5 heures	108
c) Electrode résolue en temps : purification de cellules Sr/Br dans milieu Cl ⁻	109
3) Dans le PSII	110
4) Conclusion	111

II) ETUDE DES PROPRIETES DE L'IODURE.....	111
1) Dégagement d'oxygène sous éclairage continu	112
2) Cinétiques de déclin du radical Tyr _Z '.....	114
3) Séquences de dégagement d'oxygène	118
4) Cinétiques de dégagement d'oxygène	119
5) Courbes d'émission de thermoluminescence	122
6) Caractérisation par Résonance Paramagnétique Electronique	123
a) Résultats des échantillons biochimiquement modifiés	123
i. Eclairage à 200 K.....	123
i.i Echantillon Ca/Cl.....	123
i.ii Echantillon Ca/F.....	125
i.iii Sans halogénure.....	127
i.iv Echantillon Ca/I.....	128
ii. Eclairage par flashes.....	131
ii.i Après un flash.....	131
ii.ii Après deux flashes	133
ii.iii Après 3 flashes.....	134
7) Discussion	136
CHAPITRE V. STRUCTURE	141
I) ETUDE DU BLOCAGE DES ETATS S _N EN FONCTION DE LA TEMPERATURE	141
1) Introduction.....	141
2) Méthodes de mesure.....	142
a) Transitions S ₁ →S ₂ et S ₀ →S ₁ : Résonance Paramagnétique Electronique	142
i. Protocole blocage S ₁ à S ₂	142
ii. Protocole blocage S ₀ à S ₁	143
b) Transitions S ₂ →S ₃ et S ₃ →S ₀ : Thermoluminescence.....	143
3) Résultats	145
a) Blocage S ₂ →S ₃	145
i. Dépendance en température de la transition S ₂ →S ₃ dans les thylakoides	145
ii. Dépendance en température de la transition S ₂ →S ₃ dans le PSII.....	149
iii. Effet du pH sur la dépendance en température de la transition S ₂ →S ₃	150
b) Blocage S ₃ →S ₀	152
c) Blocage S ₁ →S ₂	156
d) Blocage S ₀ →S ₁	158
e) Mise en évidence d'un « split » signal par RPE dans le PSII Sr/Br.....	160
4) Discussion	161
II) ETUDE DE LA FIXATION DES MOLECULES D'EAU SUBSTRAT.....	164
1) Introduction.....	164
2) Matériel et méthode.....	166
a) Principe	166
b) Matériel.....	167
c) Analyse des résultats	169
3) Résultats	170
4) Discussion	173
III) STRUCTURE PAR CRISTALLOGRAPHIE AUX RAYONS X	175
1) Introduction.....	175
2) Publication	175
IV) DISCUSSION	182
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	187

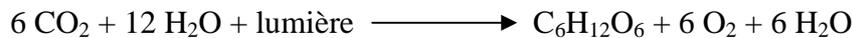
Chapitre I. INTRODUCTION

I) La Photosynthèse

1) Photosynthèse et vie terrestre

Il y a environ 3,5 milliards d'années, la photosynthèse est apparue sur Terre et a permis l'expansion de la vie en utilisant l'énergie solaire pour produire de l'oxygène à partir de l'eau^{1,2}.

L'équation générale de la photosynthèse oxygénique est :



En photosynthèse anoxygénique, une autre source d'électrons que l'eau est utilisée, par exemple le sulfure d'hydrogène H_2S .

D'une part, la photosynthèse a permis à l'atmosphère de s'enrichir progressivement en dioxygène. Ceci a représenté au départ une grande menace pour les organismes de l'époque peu adaptés pour survivre dans un environnement oxydant. Mais par la suite, la grande disponibilité en O_2 a permis l'apparition de la vie multicellulaire, grâce au processus de phosphorylation oxydative. Parallèlement, l'augmentation de la concentration en O_2 a conduit à la production de la couche d'ozone créant un écran protecteur contre les ultraviolets pour les organismes présents à la surface de la terre.

D'autre part, la photosynthèse a fourni une source quasi-illimitée de protons et d'électrons nécessaires pour convertir le dioxyde de carbone en molécules organiques. Auparavant, la vie était dépendante de donneurs d'hydrogène comme H_2S , NH_3 , et des acides organiques qui étaient présents sur Terre en quantité limitée, par comparaison avec l'eau des océans, une source illimitée d'électrons et de protons.

2) Organismes photosynthétiques

En plus des organismes eucaryotes photosynthétiques (plantes supérieures et algues), il existe cinq lignées de bactéries photosynthétiques : les bactéries pourpres, les bactéries sulfureuses vertes, les bactéries non sulfureuses vertes, les héliobactéries et les cyanobactéries.

Les organismes capables de réaliser la photosynthèse oxygénique sont les plantes supérieures, les algues et les cyanobactéries.

Les cyanobactéries sont une sous-classe de bactéries, autrefois appelées « algues bleues ». Elles vivent presque partout, y compris dans des conditions extrêmes : dans les lacs très chauds et/ou acides, dans les cratères volcaniques, dans les geysers... Elles croissent tant en eau douce que salée, sous forme planctonique (vivant dans la masse d'eau), ou sous forme benthique (organismes fixés à un substrat immergé). Elles se développent particulièrement bien dans certains milieux pollués par les activités humaines. En plus de réaliser la photosynthèse oxygénique, certaines sont capables de fixer le diazote.

Apparues il y a 3,8 milliards d'années, elles ont contribué à l'expansion de la vie sur Terre en apportant de l'oxygène, en contribuant au premier puits biologique de carbone et à une désacidification des océans, lorsqu'elles se sont organisées en colonies capables de produire du calcaire. Les cyanobactéries sont à l'origine des chloroplastes chez les eucaryotes photosynthétiques, par endosymbiose.

3) Pigments photosynthétiques

L'énergie des réactions mises en jeu lors de la photosynthèse est fournie par la lumière qui est absorbée par des pigments. Trois types de pigments interviennent : la chlorophylle (de type a ou b) et les caroténoïdes qui sont toujours présents, et également les phycobilines qui sont des pigments additionnels chez certaines algues ou cyanobactéries.

- La chlorophylle : Les deux types de chlorophylle absorbent la lumière à différentes longueurs d'ondes : la forme a absorbe à 680 nm, alors que la forme b absorbe à 700 nm. L'absorption est due à l'existence de doubles liaisons conjuguées.

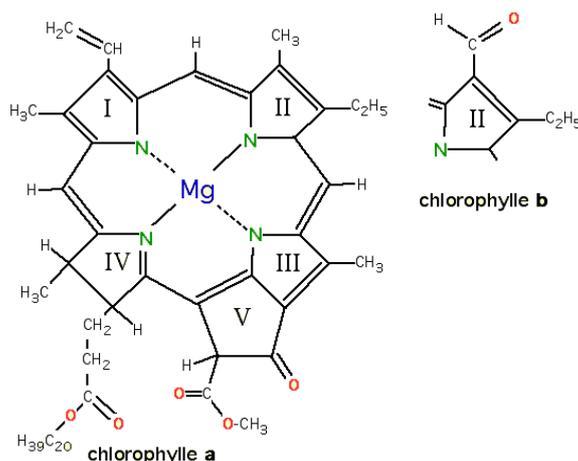


Figure 1 : Formules des chlorophylles a et b. Les chlorophylles a et b diffèrent par les substituants des groupements pyrroles. I, II, III, IV : groupements pyrroles. V : cycle supplémentaire.

- Les caroténoïdes: Les caroténoïdes sont des molécules constituées basiquement de 8 unités isoprène. Le β carotène qui est un exemple de caroténoïde a ses deux extrémités cyclisées.

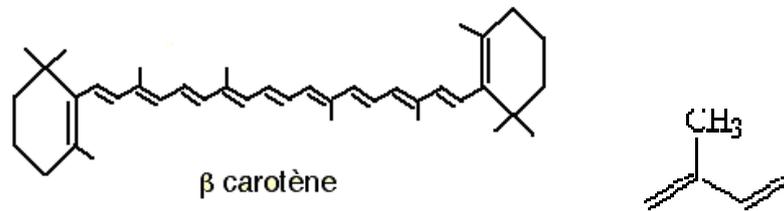


Figure 2 : Formule d'un caroténoïde. Le β carotène est un exemple de carotène. A droite est représentée une unité isoprène.

- Les phycobilines : Les phycobilines sont composées d'un noyau tétrapyrrolique linéaire, associé à une protéine (Figure 3). On les trouve à la surface des membranes des thylakoides de certaines algues, et de bactéries photosynthétiques telles que les cyanobactéries. Il existe deux types majeurs de phycobilines : les phycoérythrobilines que l'on retrouve chez les algues rouges et qui absorbent les radiations vert-jaune, et les phycocyanobilines, possédés par les algues bleues et qui absorbent les radiations vert-orange. Les phycobilines sont regroupées dans des structures appelées phycobilisomes qui sont des complexes protéines-pigments, au nombre de un pour 2 PSII. Leur structure est présentée dans la Figure 4. Les phycobilines peuvent être liées à quatre types d'apoprotéines : phycocyanine, allophycocyanine, phycoérythrine et phycoérythrocyanine.

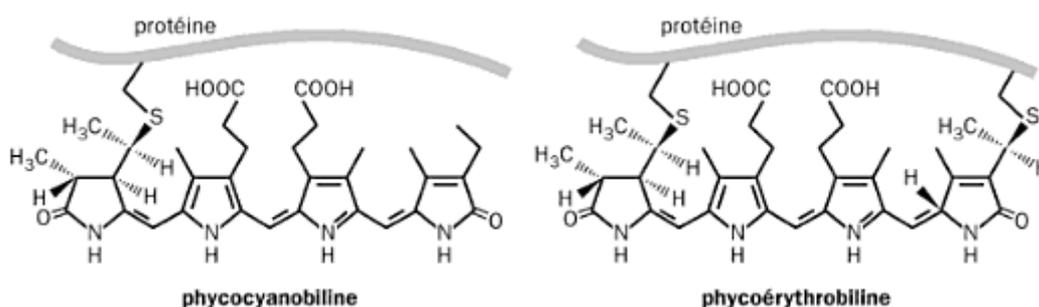


Figure 3 : Formule de deux phycobilines : phycocyanobiline et phycoérythrobiline.

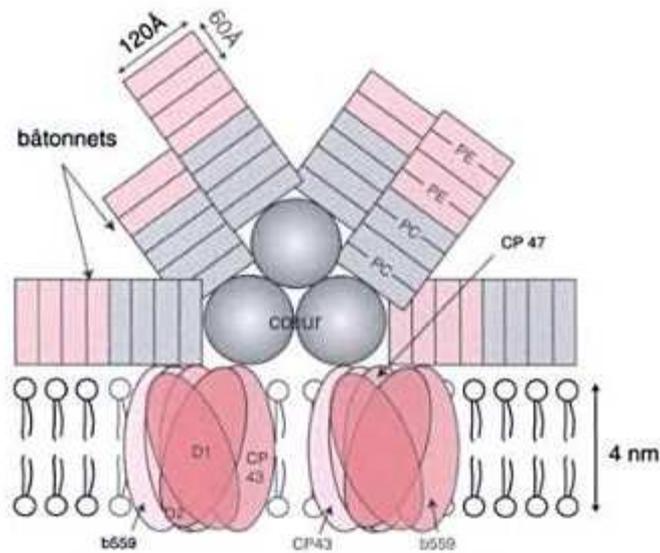


Figure 4 : Structure d'un phycobilisome chez une cyanobactérie, *Synechocystis 6701* (tiré de La photosynthèse: Processus physiques, moléculaires et physiologiques, J. Farineau, J.F. Morot-Gaudry, J.F. Soussana, Editions Qua, 2006). Les bâtonnets sont constitués de la juxtaposition d'éléments discoïdaux cylindriques contenant soit de la phycocyanine (PC), soit de la phycoérythrine (PE) associées à des polypeptides d'environ 30 kDa. Un cœur en position centrale, constitué ici de trois éléments cylindriques, est relié à deux centres réactionnels de PSII. Le cœur est constitué d'allophycocyanine.

Ainsi l'ensemble des pigments absorbe une zone d'énergie qui couvre tout le spectre visible (Figure 5).

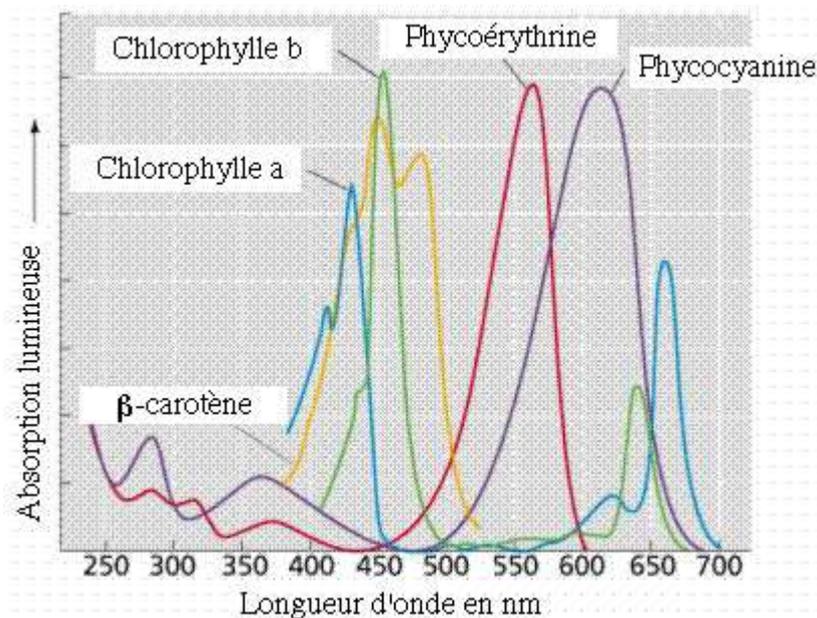


Figure 5 : Spectres d'absorption des pigments de la photosynthèse (d'après <http://www.whfreeman.com/life/update/>, modifié)

4) La chaîne photosynthétique

La photosynthèse oxygénique met en jeu deux centres réactionnels : le photosystème II et le photosystème I qui travaillent en série et sont liés par le cytochrome *b6f*. Les trois complexes protéiques sont insérés dans la membrane des thylakoides et transfèrent les électrons extraits de l'eau jusqu'à l'accepteur NADP^+ (nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate). Chez les plantes et les algues supérieures, les membranes des thylakoides sont localisées à l'intérieur des chloroplastes alors que chez les bactéries oxygéniques, les thylakoides sont à l'intérieur de la membrane plasmique. La chaîne photosynthétique est schématisée Figure 6.

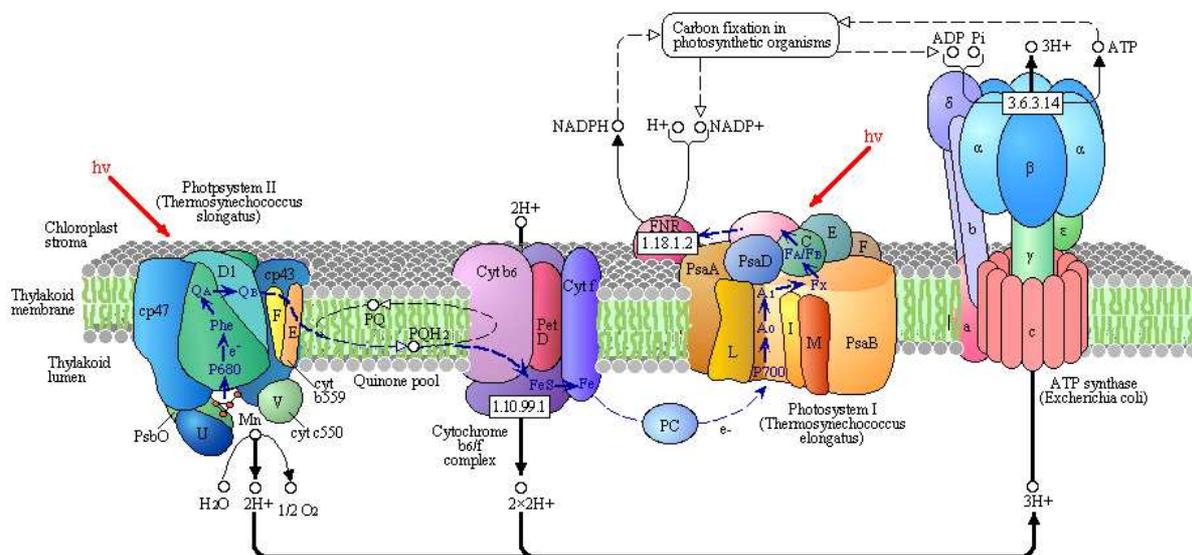


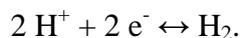
Figure 6 : Schéma des processus photosynthétiques dans la cyanobactérie *Thermosynechococcus elongatus*. (http://www.genome.jp/dbget-bin/show_pathway?map00195)

Le transfert d'électrons du photosystème II au photosystème I crée un gradient de protons à travers la membrane du thylakoïde. L'énergie de ce gradient est ensuite utilisée par l'ATP-synthase qui produit l'ATP (adénosine triphosphate). En résumé, les réactions de transport d'électrons fournissent à la fois NADPH et ATP pour la fixation du CO_2 et la production de composés carbonés, le produit final de la photosynthèse oxygénique³.

5) La photosynthèse artificielle

Les hydrogénases, enzymes qui catalysent la production et la consommation d'hydrogène, occupent une place centrale dans le métabolisme énergétique des bactéries

anaérobies qui vivent dans des milieux exempts d'oxygène, comme les sédiments lacustres, les sources hydrothermales sous-marines, ou encore les intestins de certains animaux et de l'homme (*Escherichia coli*). Elles permettent la réaction chimique la plus simple qui soit :



L'hydrogénase est également présente chez certaines algues et cyanobactéries qui réalisent conjointement oxydation de l'eau et production d'hydrogène. Comme l'hydrogénase est détruite ou inhibée par l'oxygène, les deux processus ont lieu soit dans des compartiments différents ou soit à des moments différents du cycle vital.

Il existe trois types d'hydrogénases, les hydrogénases à Fe (fer), les hydrogénases à Fe/Fe et les hydrogénases à Ni/Fe (nickel et fer), qui sont douées de la même activité catalytique : elles sont capables de faciliter, dans les deux sens, la réaction indiquée plus haut. Pourtant, ces deux groupes de protéines ne présentent ni homologie de séquence ni homologie structurale. Les hydrogénases à Ni/Fe se retrouvent plus fréquemment dans des microorganismes qui consomment de l'hydrogène, alors que ceux qui en produisent contiennent le plus souvent des hydrogénases à Fe/Fe.

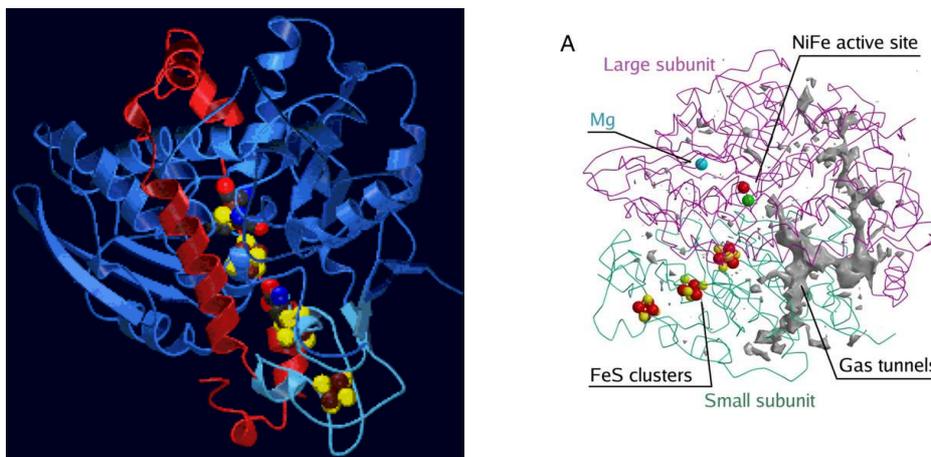


Figure 7 : A gauche, représentation de la structure de l'hydrogénase à Fe de *Desulfovibrio desulfuricans*⁴. A droite, structure de l'hydrogénase NiFe de la bactérie *Desulfovibrio fructosovorans*⁵. Le clivage du dihydrogène se produit au niveau d'un site actif comportant un atome de fer (en rouge) et un atome de nickel (en vert) enfoui à l'intérieur de la protéine. Le site actif est connecté à l'extérieur par un chapelet de centres fer-soufre (en rouge et jaune) pour le transfert d'électrons, par une série d'acides aminés protonables (non représentés) permettant le transfert de protons, et par un canal hydrophobe (en gris) qui permet l'accès du dihydrogène mais aussi des inhibiteurs comme l'oxygène et le CO.

En couplant artificiellement la production d'hydrogène à un processus photosynthétique pour utiliser l'énergie solaire, alors l'hydrogène pourrait être produit à grande échelle et à très faible coût (Figure 8).

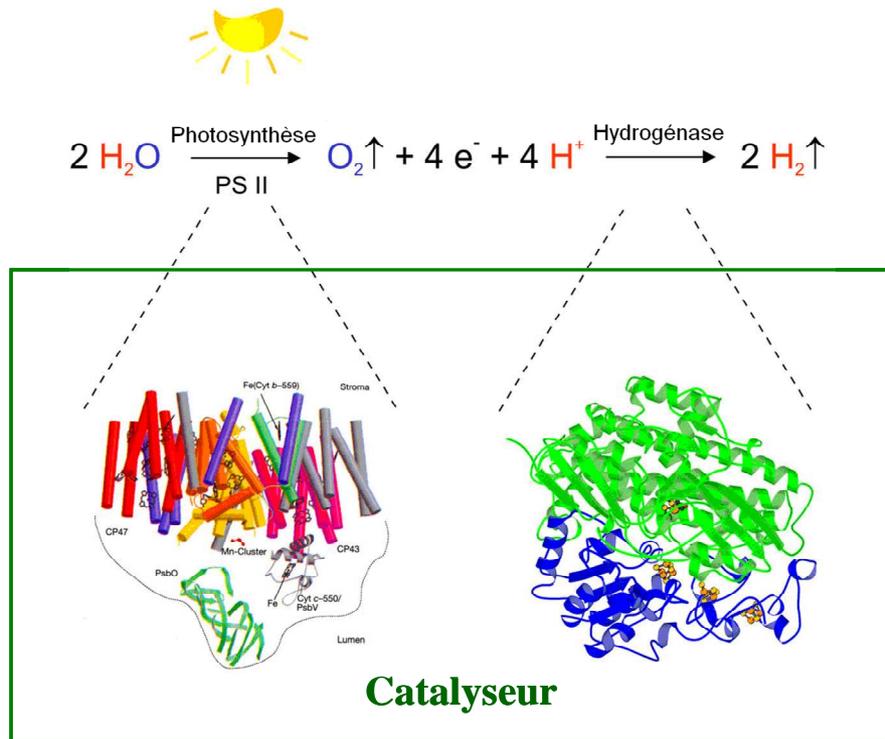


Figure 8 : La combinaison de l'oxydation de l'eau avec l'activité de l'hydrogénase permet en principe de transformer l'eau en oxygène et hydrogène (Inspiré de <http://www.kbc.umu.se/news/group-messaging.html>).

Pour la production de biohydrogène à partir de microorganismes, l'objectif principal des recherches actuelles est de comprendre les processus cellulaires mis en jeu dans la production d' H_2 . La sensibilité de l'hydrogénase à l'oxygène est tout particulièrement étudiée car elle est le principal facteur limitant la production d' H_2 . Deux stratégies sont explorées en vue d'une optimisation biotechnologique : l'une consiste à exprimer au sein d'organismes photosynthétiques des hydrogénases plus résistantes à l' O_2 ; l'autre consiste à séparer dans le temps les phases de production d' H_2 et celles de production d' O_2 en jouant sur la flexibilité métabolique des organismes.

La production d'hydrogène à partir d'éléments biologiques purifiés ou artificiels reconstitués est également envisageable. Plusieurs objectifs sont à remplir par ces catalyseurs biomimétiques : capter la lumière et la convertir en énergie chimique en générant une séparation de charges, transporter les électrons et catalyser la réaction d'oxydation de l'eau. Puis de l'autre côté, il faut réduire les protons en hydrogène. Les recherches actuelles ont pour objectif de développer des complexes de coordination efficaces, à base de métaux non nobles comme le cobalt.

II) Le photosystème II

1) Rôle

Le Photosystème II est l'enzyme directement responsable de la production d'oxygène lors de la photosynthèse ^{1,6}. Il utilise l'énergie de la lumière pour conduire deux réactions chimiques : l'oxydation de l'eau et la réduction de la plastoquinone.

La réaction photochimique résulte en une séparation de charge au sein du centre réactionnel : un photon absorbé conduit au transfert d'un électron. Il faut donc quatre réactions photochimiques pour enlever les quatre électrons de l'eau, pour aboutir à la libération d'une molécule de dioxygène et de quatre protons, et à la réduction de deux molécules de plastoquinone : $2 \text{H}_2\text{O} + 2 \text{PQ} + 4 \text{H}^+_{\text{ext}} + 4 (h\nu) \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{PQH}_2 + 4 \text{H}^+_{\text{int}}$

Deux buts essentiels ont dû être atteints pour permettre aux organismes photosynthétiques de réaliser l'oxydation de l'eau sous l'action de la lumière solaire : (i) la formation d'espèces très oxydantes pour mener à bien la dissociation de l'eau et (ii) la formation d'un site catalytique capable de stocker quatre équivalents positifs tout en évitant la formation d'intermédiaires réactifs qui pourraient endommager le système.

2) Première étape : l'absorption de la lumière

Chez les plantes et les algues vertes, le système antennaire est membranaire et composé de protéines LHC (light-harvesting complex) qui lient Chla, Chlb et caroténoïdes, tandis que chez les cyanobactéries et les algues rouges, le LHC est remplacé par les phycobilisomes. Chez les plantes, il y a généralement 200-250 molécules de chlorophylle pour un centre réactionnel de PSII, et 40-60 caroténoïdes.

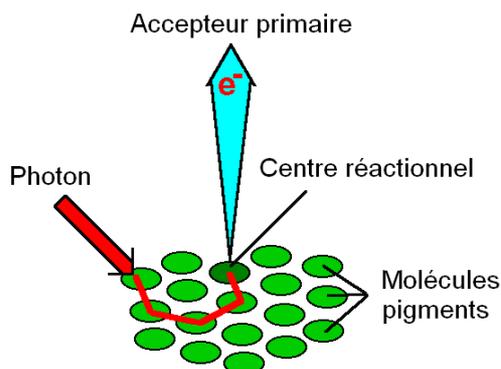


Figure 9 : Dans les plantes, l'exciton est transmis « au hasard » d'une molécule pigment à une autre jusqu'à être piégé par le centre réactionnel qui transmet un de ses électrons à l'accepteur primaire, la phéophytine.

Les caroténoïdes sont des pigments accessoires des systèmes antennaires, qui en plus d'absorber la lumière participent à la protection de l'appareil photosynthétique en cas de trop grande exposition à la lumière.

Les photons capturés par les pigments sont transférés sous forme d'énergie d'excitation au complexe constitué de quatre molécules de chlorophylle a (appelées P_{D1} , P_{D2} , Chl_{D1} , Chl_{D2}). L'excitation est délocalisée sur les quatre chlorophylles qui ont une longueur d'onde d'absorption semblable dans la région de 675-680 nm, formant un état excité P_{680}^* . L'état P_{680}^* est fortement réducteur, et un électron est transféré en quelques ps à une phéophytine de la protéine D1 ($Pheo_{D1}$) qui est l'accepteur primaire. Parce que la molécule de chlorophylle la plus proche de $Pheo_{D1}$ est Chl_{D1} , le transfert d'électron initial a lieu probablement depuis Chl_{D1} ⁷. C'est le début du processus de photosynthèse.

3) Structure du photosystème II

Dans les cristaux, le photosystème II est un dimère, mais cette dimérisation a été récemment remise en cause⁸.

Trois structures cristallographiques de PSII de cyanobactérie de haute résolution ont été publiées ces dernières années : une structure à 3,5 Å en 2004⁹ (structure de Londres, Figure 10), une structure à 3,0 Å en 2005¹⁰ (structure de Berlin) et récemment une structure à 2,9 Å qui correspond en réalité à une amélioration de l'analyse des données de la structure de Berlin précédente¹¹.

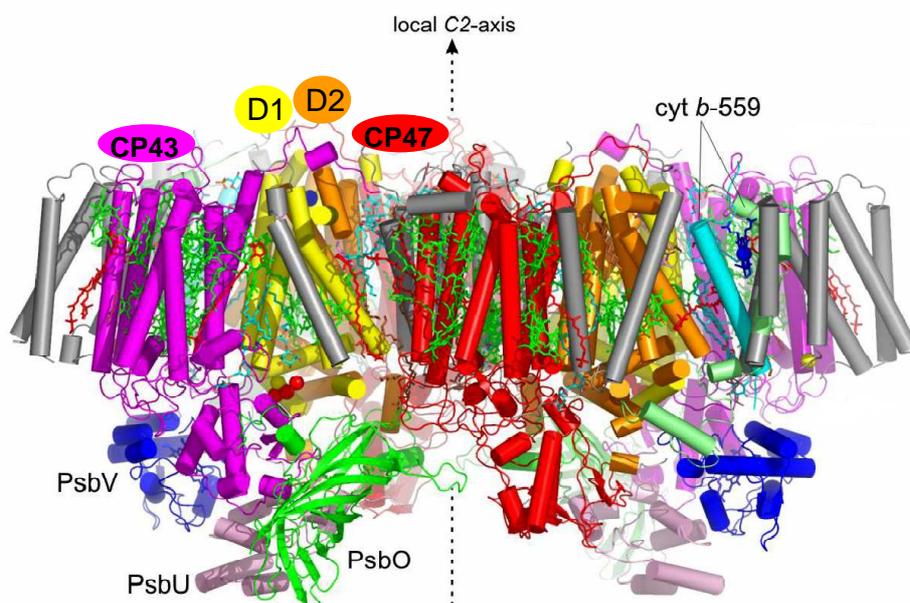


Figure 10 : Dimère de PSII, structure de Ferreira et al⁹. Le nom des principales sous-unités est indiqué.

Les deux principales sous-unités du Photosystème II sont les protéines D1 (codée par le gène *psbA*) et D2 (codée par le gène *psbB*) qui sont liées aux principaux cofacteurs. Elles forment un complexe hétérodimérique qui coordonne les composants redox clés du photosystème II, à savoir : le complexe Mn_4Ca , la tyrosine Tyr_Z , la chlorophylle P_{680} , la phéophytine et deux plastoquinones Q_A et Q_B . D1 et D2 sont liées aux sous-unités CP43 et CP47.

Dans les structures résolues, un monomère de PSII de cyanobactérie est constitué de 20 sous-unités protéiques avec une masse globale de 350 kDa (Figure 10). Les sous-unités sont appelées PsbH, PsbI, PsbJ, PsbK, PsbL, PsbM, PsbN, PsbO, PsbT, PsbU, PsbV, PsbX, PsbZ. Elles sont constituées à la fois de composants hydrophobiques intrinsèques à la membrane et de composants hydrophiliques extrinsèques. La partie extrinsèque (PsbO, PsbU, PsbV chez les procaryotes) est en-dehors de la membrane et s'avance dans le lumen des thylakoides. Les études récentes de cristallographie aux rayons X¹⁰ ont montré que chaque monomère lie 35 chlorophylles a, 2 phéophytines, 25 lipides, un bicarbonate, le cluster métallique Mn_4Ca du complexe d'oxydation de l'eau et 12 bêta-carotènes. Les cyanobactéries ont un composant redox supplémentaire : le cytochrome *c550*, situé du côté luménal. Tous les photosystèmes contiennent le cytochrome *b559*.

Le site catalytique de l'oxydation de l'eau est un cluster métallique constitué par 4 ions manganèse et un ion calcium. La Figure 11 montre le modèle structural obtenu par cristallographie aux rayons X.

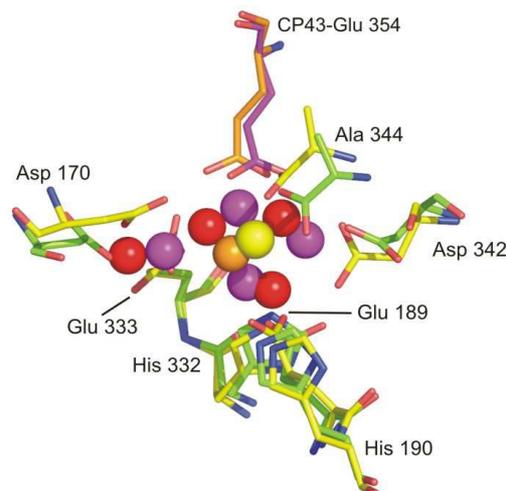


Figure 11 : Superposition des structures du cluster de Mn_4Ca des deux structures de Londres⁹ et Berlin¹⁰. Pour la structure de Berlin, les acides aminés environnants apparaissent en jaune, CP43 en violet, les Mn sont en rouge et le Ca^{2+} en orange. Pour la structure de Londres, D1 est en vert, CP43 en orange, les atomes de Mn en violet et Ca^{2+} en jaune.

Après excitation, le donneur primaire, probablement Chl_{D1} , transfère un électron à la phéophytine Pheo_{D1} . (1) Une séparation de charge (2 à 20 ps) a lieu principalement entre Chl_{D1} et Pheo_{D1} . (2) Pheo_{D1}^- transfère un électron (~ 400 ps) à la quinone Q_A , avec une grande perte d'énergie qui stabilise la paire de charges. (3) La chlorophylle ayant perdu un électron P_{680}^{*+} oxyde (~ 20 ns) la tyrosine 161 de D1, Tyr_Z , qui donne un proton à l'histidine voisine. (4) Le radical Tyr_Z^\bullet oxyde (~ 30 μs) le cluster de Mn_4Ca (S_1 à S_2). (5) Q_A^- transfère un électron (~ 100 μs) à une deuxième quinone Q_B . Les cycles suivants donnent des réactions similaires, mais avec des différences cinétiques aux étapes affectées par l'accumulation de charge sur le cluster de Mn et sur Q_B . L'arrivée du second électron sur Q_B déclenche la prise de deux protons, la libération de son site, et son remplacement par une plastoquinone PQ, depuis le pool de la membrane.

La formation de PQH_2 a lieu via deux étapes mettant chacune en jeu un électron provenant du réducteur Q_A^\bullet . Elle est schématisée Figure 13.

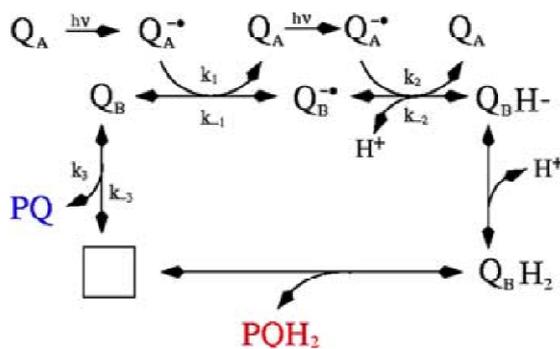


Figure 14 : Schéma de réaction simplifié de la réduction de PQ en PQH_2 au site Q_B par le réducteur Q_A^\bullet qui est formé suite à la séparation de charges. Le carré représente un site Q_B vide. (Tiré de référence 14)

Le départ de Q_B fait donc intervenir l'arrivée de deux protons. Chez les bactéries pourpres, le transfert d'électrons de Q_A^\bullet à la forme semiquinone nécessite la protonation de Q_B^\bullet . Cette réaction protolytique fait intervenir des résidus amino-acides carboxyliques (Glu, Asp)^{15,16}. Des études IRTF ont montré que la formation de Q_B^\bullet dans du PSII de *T. elongatus* n'est pas couplée à des étapes de protonation/déprotonation de résidus carboxyliques¹⁷. Ainsi, le processus conduisant à la protonation de Q_B^\bullet et Q_BH^\bullet serait différent dans les centres réactionnels de bactéries pourpres et dans le PSII.

Dans la dernière structure cristallographique de PSII de *T. elongatus*¹¹, une troisième quinone appelée Q_C a été mise en évidence au niveau du pool de quinones. Trois mécanismes d'échange de la plastoquinone avec le pool de quinones ont été envisagés (Figure 15).

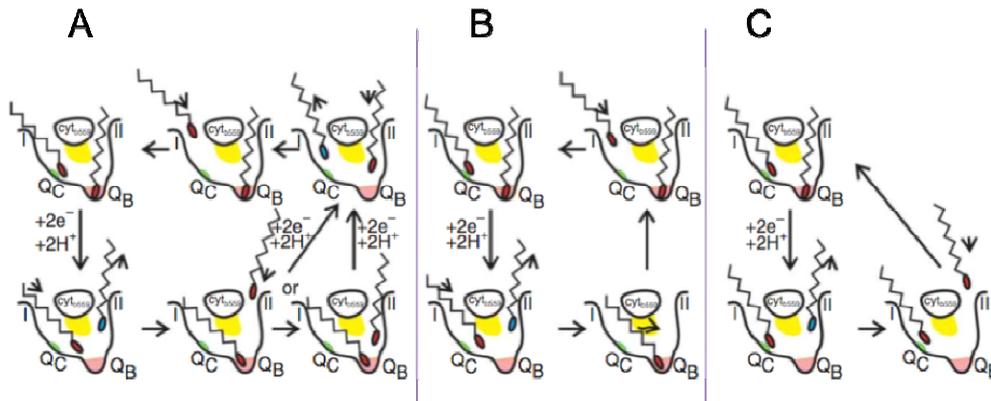


Figure 15 : Mécanismes possibles d'échange de PQ-PQH₂ entre le pool de quinones et le site Q_B dans la membrane des thylakoides. Les canaux I et II s'ouvrent dans le pool de quinones. PQ est montré avec une tête rouge et PQH₂ avec une tête bleue. Le site Q_B apparaît en rose, et le site Q_C en vert. La zone en jaune indique une région hydrophobe formée par des acides gras. Les petites flèches indiquent le mouvement des molécules PQ. Se référer au texte pour l'explication des trois mécanismes. (Tiré de référence 11).

Dans le premier mécanisme (A), l'entrée et la sortie de PQ et PQH₂ se font par les canaux I et II de manière alternative. Après réduction et protonation de Q_B, PQH₂ quitte le PSII par le canal II, et Q_C dans le canal I bouge et se lie au site Q_B avec sa queue isoprénoïde toujours localisée dans le canal I. En même temps, une autre PQ du pool de quinones entre dans le canal II. Après réduction et protonation, PQH₂ quitte le site Q_B par le canal I, et PQ du pool de quinones entre à nouveau dans le canal II pour un nouveau cycle.

Dans le deuxième mécanisme (B), l'entrée de PQ se fait exclusivement par le canal I, et PQH₂ sort par le canal II. Après réduction et protonation, PQH₂ quitte le site Q_B par le canal II, et Q_C entre dans le site Q_B par le canal I. Après ou simultanément avec la liaison au site Q_B, la queue isoprénoïde « oscille » autour de la zone hydrophobe puis se lie finalement dans le canal II, et une autre PQ du pool de quinones entre dans le site Q_C par le canal I.

Dans le troisième mécanisme (C), l'entrée et la sortie se font uniquement par le canal II. Le canal I n'est pas impliqué dans l'échange PQ/PQH₂. Après réduction et protonation, PQH₂ quitte le site Q_B par le canal II, et PQ du pool de quinones entre par le canal II et se fixe au site Q_B pour un nouveau cycle. PQ dans le site Q_C reste à cette position et ne participe pas à l'échange.

Dans les deux premiers mécanismes, Q_C intervient directement dans le transfert d'électrons jouant le même rôle que Q_B pour accélérer le transfert. Dans le dernier mécanisme, Q_C pourrait avoir une autre fonction encore inconnue. Il a été suggéré qu'elle régulerait la fonction du cyt *b559*. Le cytochrome *b559* existe sous trois formes caractérisées par un potentiel E_m différent. A pH 6,5, la forme de haut potentiel est prédominante (70 %).

Les fractions restantes sont présentes en quantités variables dans les formes de potentiel intermédiaire et bas. Le rôle fonctionnel du cytochrome *b559* n'est pas totalement clarifié (voir paragraphe sur la voie secondaire de transfert d'électrons). Le site Q_C permettrait de faire varier le rapport PQ/PQH_2 dans le pool de quinones, pour réguler la valeur du E_m du cytochrome *b559*.

b) Le cycle de Kok

En 1969, Joliot et ses collaborateurs ont observé que des algues adaptées à l'obscurité dégageaient un maximum d'oxygène après 3 flashes actiniques courts, puis que le dégagement d'oxygène était à nouveau maximal tous les 4 flashes. Cette expérience a mené au développement du modèle de Kok qui décrit le fonctionnement du cluster de Mn_4Ca^{18} . Dans ce modèle, le cluster de Mn_4Ca passe par 5 états appelés états S, individuellement désignés par S_n , où $n = 0$ à 4. Chaque état S_n représente un état d'oxydation différent du complexe d'oxydation de l'eau. L'enzyme est ainsi capable de stocker quatre équivalents de charges positives, avant d'oxyder 2 molécules d' H_2O et de dégager de l' O_2 . L'état S_1 est celui qui est stable à l'obscurité.

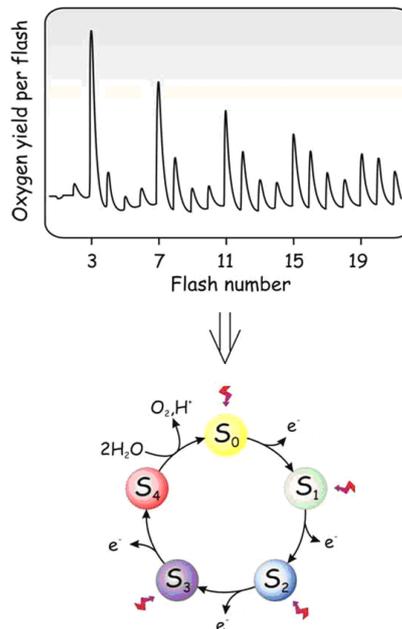


Figure 16 : En haut : Dégagement d'oxygène induit par une séquence de flashes donnée à des thylakoides adaptés à l'obscurité. Cette expérience a été réalisée pour la première fois par Joliot et al. (A new model of photochemical centers in System-2, *Photochem. Photobiol.*, 1969, 10, 309-329). En bas : Cycle des états S tel qu'il a été proposé par Kok et al. (Cooperation of charges in photosynthetic O_2 evolution – I. A linear four step mechanism, *Photochem. Photobiol.*, 1970, 11, 457-476)

c) Voie secondaire de transfert d'électrons

Des cofacteurs du PSII autres que ceux déjà décrits sont capables de donner des électrons à P_{680}^{*+} . Ils sont impliqués dans la voie secondaire de transfert d'électrons^{19,20,21,22,23}. Cette voie fait intervenir un caroténoïde (Car), le cytochrome *b559* (cyt *b559*) et une chlorophylle a nommée chlorophylle Z (Chl_Z). A des températures physiologiques, la réduction de la tyrosine Tyr_Z est largement prédominante sur l'apport d'électrons par la voie secondaire.

Lorsque la température est baissée (<100 K), la réduction de P_{680}^{*+} par la tyrosine Tyr_Z est en partie inhibée. Dans ce cas, deux phénomènes sont mis en jeu : 1) P_{680}^{*+} recombine avec Q_A^- , 2) La voie secondaire de transfert d'électrons intervient en partie. Car est oxydé par P_{680}^{*+} , et réduit par le cyt *b559*, qui est à son tour réduit par le pool de plastoquinol. Lorsque le Cyt *b559* est pré-oxydé, Car⁺ est réduit par Chl_Z. Il y a deux candidats possibles pour Chl_Z, une chlorophylle située du côté D2 et une chlorophylle située du côté D1.

La voie secondaire de transfert d'électrons est généralement envisagée comme un cycle photoprotecteur visant à limiter la durée de vie de P_{680}^{*+} , pour éviter des dégâts oxydatifs. Une autre hypothèse serait que cette voie constitue un cycle photoprotecteur dont le but est de réduire le cation Car⁺, plutôt que P_{680}^{*+} , renvoyant Car⁺ dans un état non oxydé, lui permettant de jouer son rôle de désactivateur de l' O_2 singulet dans le centre du PSII²¹. L' O_2 singulet est généré par réaction de l' O_2 avec un triplet de Chl (3Chl) qui est formé par recombinaison de charges entre l'accepteur primaire et le donneur primaire.

d) La tyrosine D

Le PSII contient une deuxième tyrosine, la Tyr_D qui appartient à la sous-unité D2, ce qui confère une organisation symétrique au PSII. La Tyr_D n'est pas impliquée directement dans le processus d'oxydation de l'eau. Dans l'enzyme fonctionnelle, le radical Tyr_D[•] est formé par illumination. Il est beaucoup plus stable que celui de la tyrosine Tyr_Z[•]. Son rôle n'est pas complètement clarifié²⁴. Premièrement, le radical Tyr_D[•] est un oxydant du cluster de Mn₄Ca dans l'état S_0 ²⁵. Deuxièmement, le radical Tyr_D[•] aurait un rôle électrostatique. Babcock et al.²⁶ ont suggéré que l'oxydation et la réduction de la tyrosine D font intervenir un mouvement de protons entre la tyrosine D et une base B qui serait His189 (Figure 17).

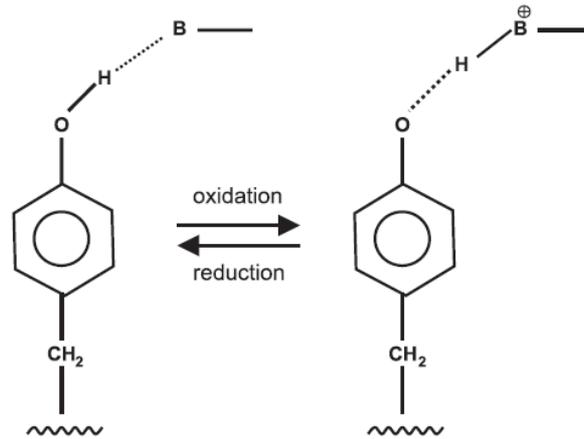


Figure 17 : Modèle de protonation/déprotonation des tyrosines D et Z, proposé par Babcock et al. (Tiré de référence 24)

La base capte le proton relâché suite à l'oxydation de la tyrosine D, et le retourne lorsque la tyrosine est oxydée. Ainsi, la charge reste à proximité du radical.

Le radical Tyr_D^\bullet permettrait par son influence électrostatique de localiser le cation du cation P_{680}^+ majoritairement sur la chlorophylle P_{D1} qui est la plus proche de la tyrosine Z^{27} . Il accélérerait ainsi la réduction de P_{680}^+ par Tyr_Z .

III) Le site catalytique : le cluster de Mn_4Ca

1) Structure du cluster de Mn_4Ca

Diverses techniques peuvent être utilisées pour déterminer la structure 3D du cluster de Mn_4Ca , notamment l'EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure), la cristallographie aux rayons X et plus indirectement la spectroscopie RPE (Résonance Paramagnétique Electronique).

a) La spectroscopie RPE

La spectroscopie RPE (voir chapitre II) concerne l'absorption ou l'émission d'une énergie électromagnétique par des moments magnétiques qui proviennent d'électrons non appariés dans le cas de la RPE classique ou de l'ENDOR (Electron nuclear double resonance). La simulation de spectres ENDOR obtenus sur du PSII dans l'état S_2 ²⁸ a montré

la présence de 4 Mn en interaction. Le modèle retenu est celui d'un arrangement trimère/monomère de trois Mn^{IV} et d'un Mn^{III} .

b) L'EXAFS

La technique d'EXAFS permet de calculer les distances Mn-Mn et d'en déduire des modèles de conformation possibles du cluster²⁹. L'échantillon est éclairé par un faisceau de rayons X dont on fait varier l'énergie. Lorsque le rayonnement X correspond à l'énergie de transition d'un électron depuis un niveau du cœur de l'atome vers un niveau supérieur, on observe un seuil d'absorption correspondant à 1 électron. L'énergie exacte à laquelle a lieu une transition spécifique d'un élément dépend d'une part, de son état d'oxydation, et d'autre part, de son environnement. La région proche du maximum d'absorption est celle du XANES (X-ray Absorption Near-Edge Spectroscopy) et est caractéristique de l'état électronique de l'élément. S'étendant sur plusieurs centaines d'électronvolts après le seuil, des oscillations sont observées, correspondant à la région de l'EXAFS. Ces oscillations contiennent des informations sur la distance entre l'atome excité et ses premiers voisins dans l'échantillon, ainsi que sur la nature de ces premiers voisins.

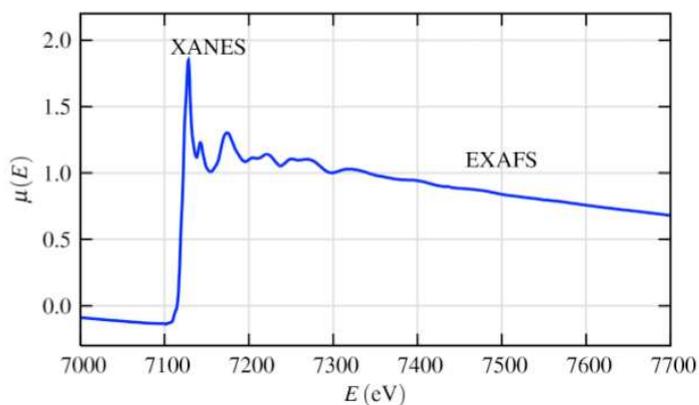


Figure 18 : Exemple de variations du coefficient d'absorption d'un matériau en fonction de l'énergie des rayons X incidents (poudre de FeO) (<http://www.xafs.org>). La région proche du seuil d'absorption est celle du XANES (X-ray Absorption Near-Edge Spectroscopy). Les oscillations observées après le seuil d'absorption correspondent à la région de l'EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine-Structure).

c) La cristallographie aux rayons X

Les structures obtenues par cristallographie aux rayons X ont pour but de visualiser directement le site catalytique. La meilleure résolution à ce jour est de $2,9 \text{ \AA}^{11}$ pour le PSII.

Mais les résultats obtenus par cristallographie sont à examiner avec précaution. En effet, l'utilisation des rayons X présente un grand désavantage, celui de réduire les Mn du complexe. Une étude a montré que dans les conditions de cristallographie aux rayons X, la majorité des Mn sont réduits de $\text{Mn}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{IV}}_2$ dans l'état S_1 en Mn^{II}_4 ³⁰. Les résultats de cette étude sont résumés et expliqués dans la Figure 19. Ainsi, les conditions utilisées pour déterminer la structure par cristallographie induisent de sévères modifications dans la structure du site catalytique, et probablement dans l'organisation des ligands du cluster de Mn_4Ca .

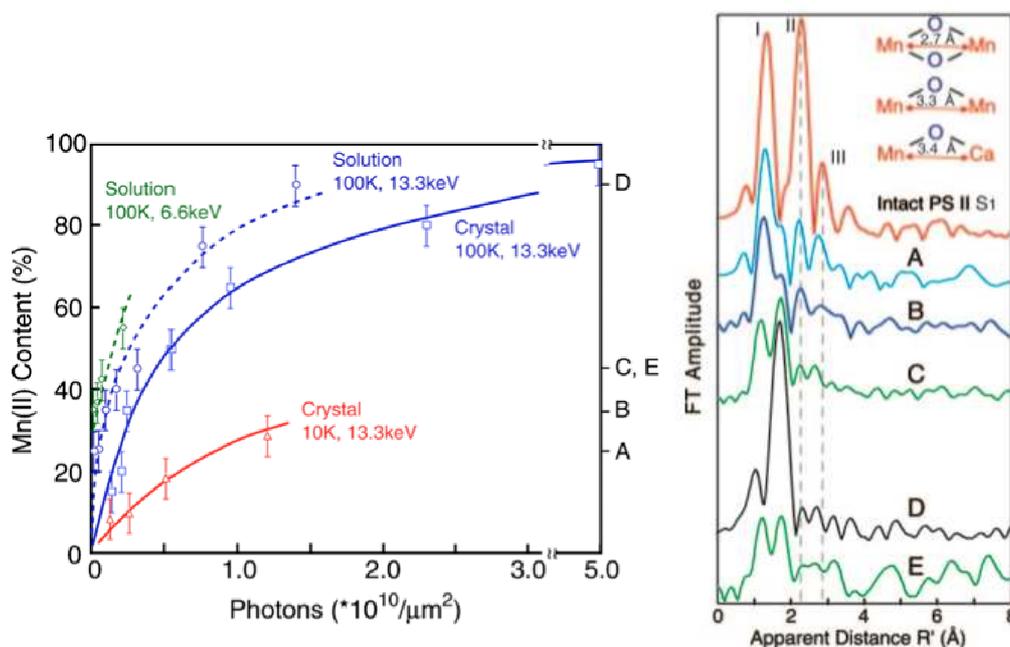


Figure 19 : A gauche, composition croissante en Mn^{II} dans le PSII causée par les rayons X³⁰. Trait continu bleu : composition en Mn^{II} de cristaux de PSII en fonction de la dose de Rayons X à 13,3 keV (0,933 Å). L'irradiation a été faite à 100 K. Les conditions sont les mêmes que celles utilisées pour la collection de données en diffraction par rayons X. Considérant que la dose moyenne utilisée en cristallographie est de 3.5×10^{10} photons par μm^2 , à 66% de la dose, les cristaux de PSII contiennent environ 80% de Mn^{II} . Les dommages causés au PSII en solution (trait bleu en pointillés) sont similaires. A 6,6 keV, qui est l'énergie utilisée pour les mesures de diffraction anormale, la génération de Mn^{II} est encore plus importante. Le Mn^{II} produit dans les cristaux suite à l'irradiation est diminuée fortement à la température de 10 K. **A droite, Changements spectraux de l'EXAFS du Mn dans le PSII causés par les rayons X. En rouge, la transformée de Fourier (FT) du spectre EXAFS de PSII intact en solution.** Les trois pics sont caractéristiques d'un complexe Mn_4Ca . Les FTs d'échantillons de PSII exposés à 0,05, 0,1, 0,3 et 1,4 $\times 10^{10}$ photons par μm^2 à 13,3 keV et 100 K et contenant 25% (bleu), 35% (bleu foncé), 45% (vert) et 90% (noir) de Mn^{II} réduit sont indiqués par A, B, C et D respectivement. Les pics FT subissent des changements très importants alors que le pourcentage de Mn^{II} augmente : baisse d'amplitude et changement de la fréquence des composants du spectre.

d) Conclusion

De ce point de vue, les expériences d'EXAFS réalisées sur des cristaux de PSII fournissent des résultats plus intéressants car les rayons X utilisés ont une énergie située en dessous du seuil de réduction du Mn^{3+} . Elles ont révélé trois distances Mn-Mn courtes : deux de 2,7 Å et une distance Mn-Mn de 3,3 Å, et deux interactions Mn-Ca à 3,4 Å. Parallèlement aux mesures sur des cristaux de PSII, des simulations de spectres EXAFS ont été réalisées sur des structures hypothétiques. Les trois structures en accord avec les spectres EXAFS de cristaux de Mn sont montrées Figure 20.

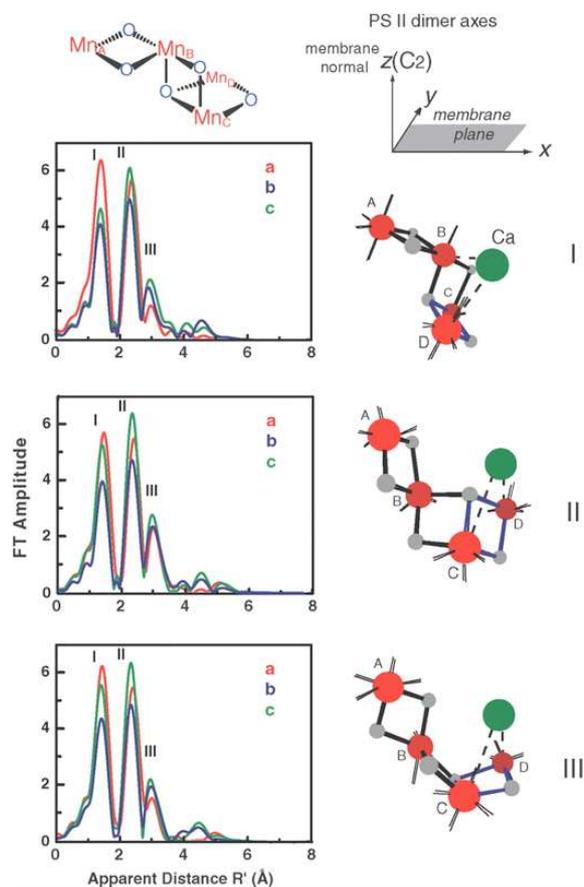


Figure 20 : Modèles structuraux haute résolution du cluster de Mn_4Ca de PSII déduits de mesures EXAFS. Les modèles I, II et III sont montrés à droite. Chaque modèle est compatible avec les spectres EXAFS du Mn de cristaux de PSII. Le motif Mn_4 commun aux trois structures est montré en haut à gauche. Les modèles sont montrés dans l'orientation selon laquelle ils devraient être placés dans la membrane du PSII selon le système d'axes montré en haut à droite. L'axe z est placé selon la normale à la membrane. Les axes x et y définissent le plan de la membrane. Les atomes de Mn sont en rouge. La distance entre les atomes Mn_C et Mn_D est de 2,8 Å (indiquée par les liaisons bleues oxo), et la distance entre les atomes Mn_A et Mn_B et les atomes Mn_B and Mn_C est de 2,7 Å. La distance entre Mn_B et Mn_D est de 3,3 Å. L'atome de Ca (rond vert) est à 3,4 Å des deux atomes Mn. Chaque spectre a été enregistré dans des conditions où le vecteur des rayons X est parallèle à chacun des axes du cristal (a, b et c).

La conformation 3+1 des Mn du cluster (un des atomes de Mn est légèrement en dehors du « cube » formé par les autres atomes) est commune aux trois modèles proposés, comme montré dans la figure en haut à droite. Elle est conforme aux données obtenues en cristallographie aux rayons X qui ont montré que la densité électronique du cluster de Mn_4Ca avait une forme de poire, et aux simulations des spectres ENDOR³².

2) Ligands du cluster de Mn_4Ca

Le cluster est lié aux protéines intrinsèques transmembranaires D1 et CP43. Aucune protéine extrinsèque n'est directement liée au cluster de Mn_4Ca , mais les protéines extrinsèques liées au PSII du côté luménal se trouvent dans l'environnement proche du cluster. Il est même supposé qu'elles jouent un rôle de barrière vis à vis du cluster de Mn_4Ca , en particulier la protéine PsbO qui est connue pour stabiliser les ions Mn.

Les ligands réels du cluster ne sont toujours pas connus avec précision aujourd'hui. Dans les structures de cristallographie aux rayons X, la réduction des Mn par les rayons X utilisés peut perturber la structure du cluster de Mn_4Ca . Les ligands identifiés dans ces structures ne sont peut être pas ceux du PSII natif. La Figure 21 montre les ligands identifiés dans la structure de Berlin¹⁰.

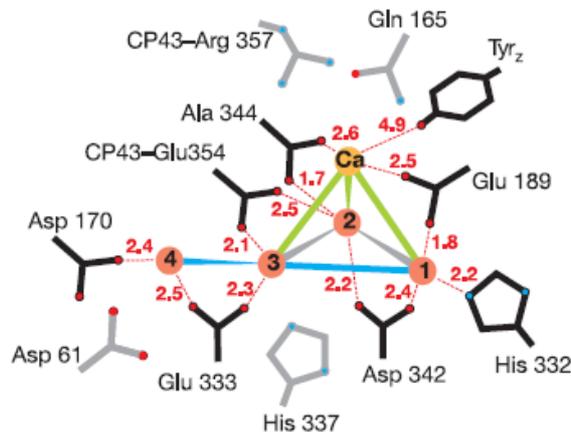


Figure 21 : Schéma du cluster de Mn_4Ca et de ses ligands identifiés dans la structure de Berlin¹⁰. Les distances entre les atomes de Mn (rose) et de Ca (orange) sont indiquées par les lignes pontantes (gris : 2,7 Å, bleu : 3,3 Å, vert : 3,4 Å). Les amino-acides de la première sphère de coordination sont en noir et ceux de la seconde en gris. Les distances sont données en Å.

Le rôle des acides aminés a été étudié par plusieurs groupes avant que les structures cristallographiques ne soient publiées, par mutagenèse dirigée dans la cyanobactérie *Synechocystis* 6803. Assez étonnamment, plusieurs mutations n'ont aucune influence sur le

cycle des états S_n , comme D1-Glu189 (Lys, Arg, Gln)^{33,34}, D1-Asp342Asn³⁵, D1-Asp170His³⁶. Pour D1-Ala344, D1-Glu189, D1-Asp342, D1-Glu333 et D1-Aps170, la baisse d'activité des mutants suit une baisse de la fraction de PSII contenant du Mn, suggérant que ces acides aminés sont plus essentiels pour la fixation du Mn au sein du PSII que pour le dégagement d'oxygène proprement dit.

Une autre moyen d'étude des ligands du cluster de Mn_4Ca est d'utiliser la mutagénèse dirigée associée à la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF). L'IRTF est une spectroscopie très utile pour caractériser des changements structuraux qui ont lieu durant le cycle catalytique d'une enzyme, comme des modifications des interactions moléculaires, des états de protonation, des liaisons, des longueurs de liaison, etc. Dans le PSII, les modes vibrationnels correspondent à des résidus amino-acides qui soit lient le cluster de Mn_4Ca , soit sont couplés au cluster par des liaisons hydrogène, ou par des interactions électrostatiques, soit ont des chaînes latérales dont l'état de protonation est modifié alors que le cluster de Mn_4Ca est oxydé³⁷. Réaliser des mutations sur les ligands possibles du cluster de Mn_4Ca pour tenter de modifier les modes vibrationnels est un moyen de confirmer la ligation de l'acide aminé considéré au cluster de Mn_4Ca ³⁸.

Le ligand de la sous-unité D1, D1-Ala344 a été le sujet de plusieurs études. Les premières l'ont identifié comme un ligand d'un ion Mn du cluster^{39,40}, sans pouvoir autant exclure la ligation à l'atome de Ca du cluster. Les structures cristallographiques^{9,10} positionnent le groupement $\alpha-COO^-$ de D1-Ala344 à proximité de l'ion Ca^{2+} . Ainsi, pour établir si D1-Ala344 lie un Mn ou Ca, le mode vibrationnel carboxylate du groupement $\alpha-COO^-$ de D1-Ala344 a été identifié dans un spectre IRTF de différence S_2-S_1 de particules de PSII ayant du Sr^{2+} substitué à la place du Ca^{2+} ⁴¹. L'étude a montré que le spectre de différence n'est pas affecté par la substitution au niveau du mode vibrationnel carboxylate du groupement $\alpha-COO^-$ de D1-Ala344. Cela tend à prouver que D1-Ala344 est lié au Mn du cluster et non au Ca. D'autres groupements carboxylates non identifiés sont par contre modifiés par la substitution du Ca^{2+} par le Sr^{2+} ⁴².

3) Etats redox des Manganèse

L'état d'oxydation des Mn est important à connaître car il a des implications fortes sur la position des Mn dans le cluster et sur leur réactivité. La question est de savoir si les quatre

équivalents positifs générés au cours du cycle sont accumulés sur les quatre ions Mn du complexe d'oxydation de l'eau, ou si un ligand est oxydé.

Différentes méthodes spectroscopiques ont été utilisées pour déterminer les états d'oxydation des Mn en fonction des états S_n . La RPE a montré que les états S_0 et S_2 sont paramagnétiques, montrant des signaux multilignes^{43,44,45,46,47}, et que l'état S_1 a aussi un signal RPE en polarisation parallèle^{48,49,50}. Les états S_0 et S_2 sont caractérisés par un état de spin $S = 1/2$. Récemment, l'état S_3 a été caractérisé par un état de spin $S = 3$ ⁴⁷. D'autres études RPE⁵¹ ont permis de résoudre en partie les états d'oxydation des Mn dans chacun des états S_n (Figure 22).

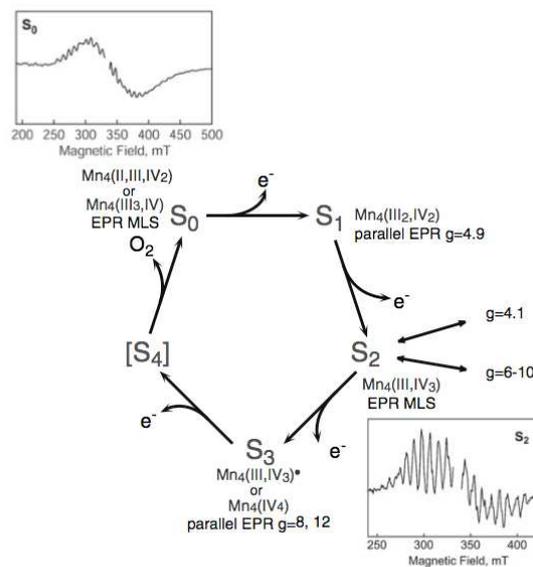


Figure 22 : Le cycle des états S et les états d'oxydation du Mn proposés. Les signaux RPE des états S_0 et S_2 et les états de spin identifiés (dans les épinnards) sont aussi montrés. (Tiré de référence 52).

Les techniques de spectroscopie par rayons X sont appropriées pour répondre à des questions d'état d'oxydation, parce que l'élément en question, le Manganèse, peut être sondé sélectivement avec très peu d'interférences venant des autres cofacteurs.

Trois groupes ont étudié les états d'oxydation des Mn pour les états S_0 , S_1 , S_2 et S_3 en utilisant le XANES sur des échantillons de PSII illuminés par des flashes saturants. Sur la base des décalages dans les seuils d'absorption du Mn, Roelofs et al. ont proposé qu'un Mn est oxydé durant la transition S_0 à S_1 et S_1 à S_2 , mais pas durant la transition S_2 à S_3 ⁵³. L'utilisation d'une autre technique de spectroscopie aux rayons X, la spectroscopie d'émission rayons X $K\beta$ ($K\beta$ XES), combinée au XANES et à la RPE a abouti au même résultat⁵⁴. Au contraire, Ono et al.⁵⁵ et Izzulino et al.⁵⁶ ont interprété leurs résultats XANES comme indiquant qu'un Mn est oxydé durant chacune des transitions $S_n \rightarrow S_{n+1}$.

4) Accès du substrat

L'accès des molécules d'eau substrat jusqu'au site d'oxydation est contrôlé et limité par l'existence de canaux spécifiques à l'eau dans la matrice protéique pour optimiser l'oxydation de l'eau par le PSII⁵⁷. Bien que cela puisse sembler paradoxal pour une enzyme qui oxyde environ 100 molécules d'eau par seconde, il a été avancé que la quantité d'eau accessible au site catalytique doit être optimisée pour éviter des « courts circuits » du cycle des états S_n ⁵⁸. Sinon, des intermédiaires potentiellement dangereux comme le peroxyde d'hydrogène peuvent être formés.

Plusieurs canaux du PSII ont été identifiés par Murray et al.⁵⁹ dans la structure de Londres⁹, en utilisant un logiciel de recherche de cavité dans la protéine pour trouver tout canal de diamètre supérieur à 1,4 Å. Cette approche a mis en évidence trois canaux potentiels qui relient le solvant au cluster de Mn (Figure 23): un premier canal pour permettre à l'O₂ de s'échapper (canal (i)) qui est de caractère hydrophile près du cluster de Mn et devient plus hydrophobe vers la sortie, et deux autres canaux supposés transporter eau/protons (canaux (ii) et (iii)).

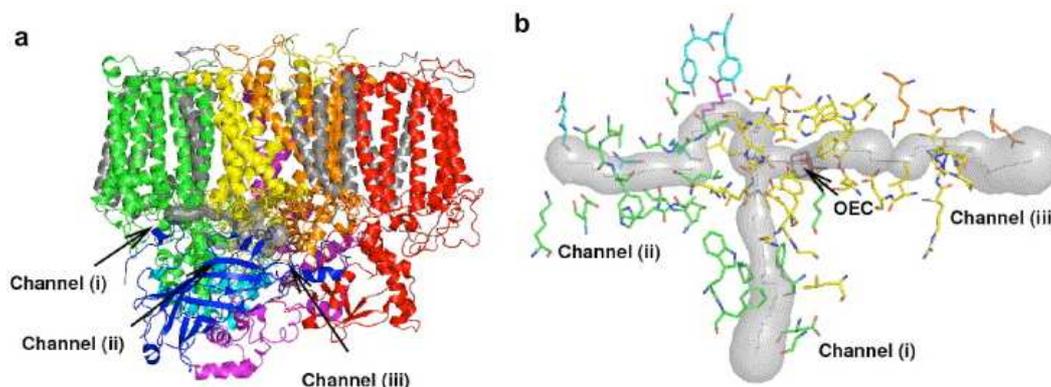


Figure 23 : Identification de trois canaux menant au complexe d'oxydation de l'eau dans la structure PSII de Ferreira et al⁹. (a) vue générale du complexe monomérique de PSII (b) vue rapprochée du site d'oxydation et de la surface luménale du monomère de PSII. Dans (b), les résidus amino-acides situés à une distance de moins de 4 Å du centre de la voie sont montrés par des bâtons et mis en couleurs selon leurs protéines respectives : D1 jaune, CP43 vert, D2 orange, psbV cyan, PsbU magenta. (Tiré de référence 59).

Une deuxième analyse⁶⁰ a utilisé une autre méthode basée sur l'accessibilité du méthanol (demandant un espace de 1,7 Å). Cette recherche a été cette fois-ci réalisée dans la structure de Berlin¹⁰. Trois canaux ont été identifiés : étroit (N pour narrow), large (B pour broad) et le « back channel ». Une partie du canal B est en contact avec le Ca du cluster et la tyrosine Tyr_Z. Il est considéré comme une voie possible pour l'eau substrat, étant donné la

capacité à former des liaisons hydrogène à l'intérieur de ce canal. Quand Ho et Styring ont calculé l'accessibilité de l'eau (qui demande un espace de 1,4 Å), plusieurs similitudes et différences sont apparues avec l'analyse précédente de Murray et al. Le « back channel » est très similaire au canal (i), le canal supposé permettre la sortie de l'oxygène formé. Le canal N s'étend jusqu'au lumen pour des molécules de la taille de l'eau, ce canal n'a pas été identifié par Murray, mais était présent dans les structures de Londres et de Berlin. Curieusement, Ho et Styring n'ont pas identifié le canal (iii), reportant un blocage de ce canal dans les deux structures, l'interprétant comme une extension « cul de sac » du canal B. Les canaux N et B agiraient ensemble comme canal de sortie de l'eau et des protons.

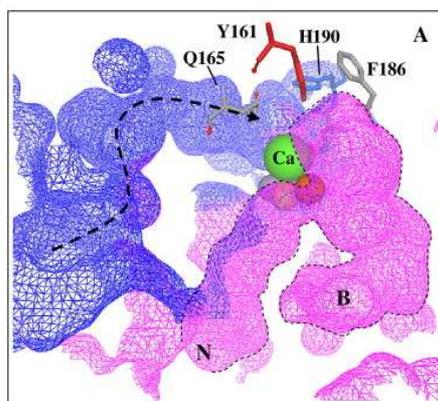


Figure 24 : Canaux mis en évidence dans la structure de Loll et al. Tiré de référence 60. Le « back channel » est coloré en bleu et les canaux N et B en rose. Les flèches indiquent le trajet possible des molécules depuis (ou vers) le lumen. Les atomes de Mn apparaissent en jaune et orange.

5) Mécanisme d'oxydation de l'eau

a) Localisation du substrat

Des techniques de RPE avancées comme HYSCORE (hyperfine sublevel correlation)⁶¹ ont montré un couplage magnétique entre une molécule d'eau et un Mn du cluster, suggérant qu'au moins une des deux molécules d'eau substrat est liée à un atome de Mn du cluster.

Lorsque le Ca^{2+} est substitué par du Sr^{2+} , les propriétés de fixation des deux molécules d'eau substrat sont fortement affectées⁶². Le calcium du cluster est probablement impliqué dans au moins un des deux sites de fixation de l'eau. Si les molécules d'eau sont fixées au Ca^{2+} et au Mn isolé (Mn_A) comme l'ont suggéré certaines modélisations, cela permettrait aux molécules d'eau d'être à une distance de 4,6¹⁰ à 3,9⁹ Å l'une de l'autre. Ces distances peuvent paraître trop grandes pour permettre aux molécules d'eau de réagir dans l'état S_4 ⁶³, mais il ne

faut pas oublier que les données cristallographiques ont été obtenues dans un état où les Mn du cluster sont réduits. Il est fort probable que les distances dans l'état S_4 soient différentes. Nous aborderons plus précisément ce point dans la discussion générale.

b) Formation de la liaison O-O

Le mécanisme de formation de la liaison O-O ayant lieu durant la transition S_3 à S_0 est toujours méconnu. Les mécanismes décrits^{64,65} sont basés sur des informations structurales obtenues par différentes méthodes comme la cristallographie aux rayons X, l'EXAFS, la spectrométrie de masse, la RPE et l'IRTF. Trois mécanismes sont régulièrement décrits :

➤ Premier mécanisme :

Il a été proposé par Dismukes et al. et est basé sur la réactivité de leur modèle de complexe tétranucléaire Mn_4O_4 . Le cluster se convertirait par oxydation en un arrangement « papillon » Mn_4O_2 , perdant deux atomes d'oxygène sous forme de dioxygène.

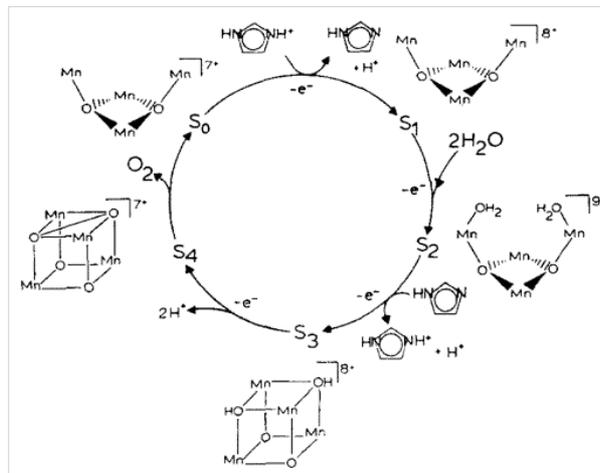


Figure 25 : Premier mécanisme proposé par Dismukes et al. favorisant aussi un cycle faisant intervenir un cluster « papillon ».

➤ Deuxième mécanisme :

Comme déjà mentionné, la transition S_2 à S_3 impliquerait l'oxydation d'une espèce autre que l'ion Mn. Cette observation a inspiré un grand nombre d'hypothèses dans lesquelles l'état S_3 comporte un radical oxyl, qui va réagir avec un autre atome d'oxygène dans l'état S_4 pour produire le dioxygène (équipes de V.K. Yachandra, J. Messinger, H.Dau).

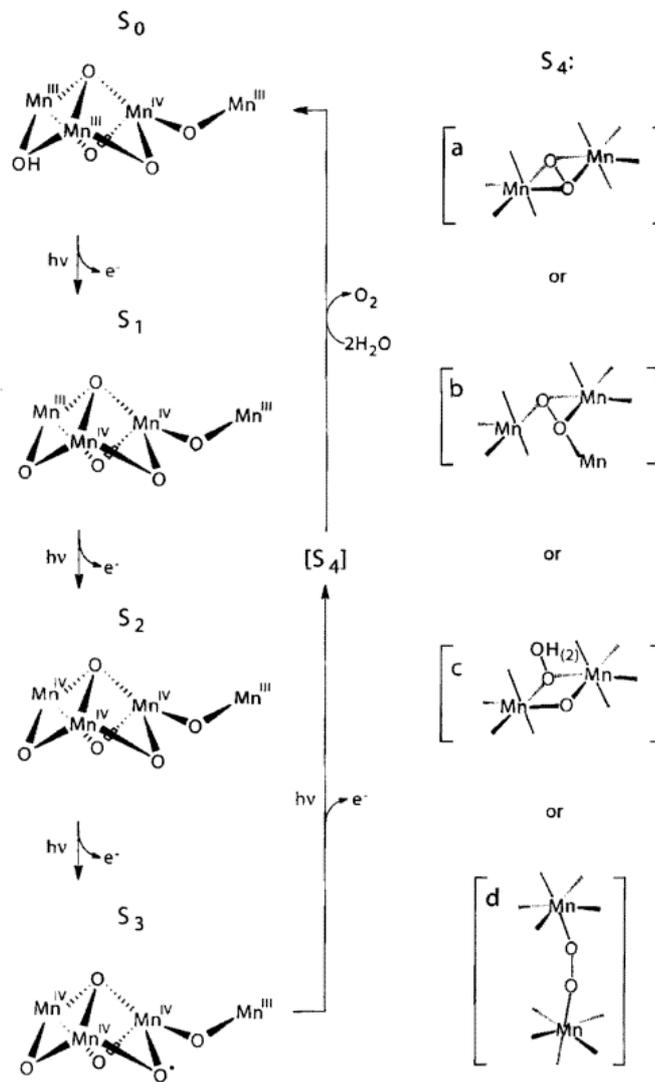


Figure 26 : Deuxième mécanisme (Tiré de : Yachandra, V. K. In Photosystem II: The Light-Driven Water:Plastoquinone Oxidoreductase; Wydrzynski, T. J., Satoh, K., Eds.; Advances in Photosynthesis and Respiration 22; Springer-Verlag: Dordrecht, The Netherlands, 2005; p 235.)

➤ Troisième mécanisme :

Il repose sur une attaque nucléophile d'un groupement $\text{Mn}^{\text{V}}=\text{O}$. L'attaque serait réalisée soit par un groupe $\text{Mn}-\text{OH}^{66}$ soit par un groupe $\text{Ca}-\text{OH}$ ou $\text{Ca}-\text{OH}_2^{67,68}$.

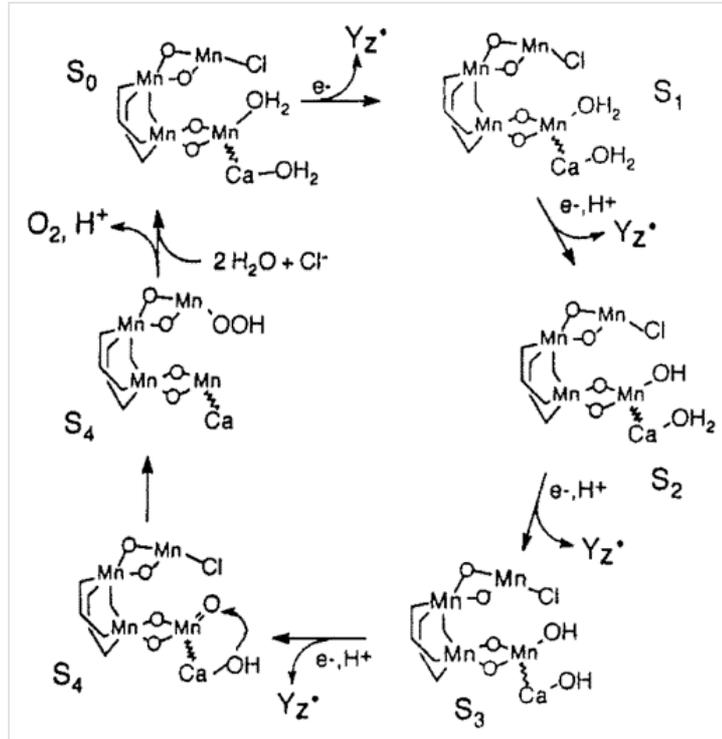


Figure 27 : Troisième mécanisme proposé par Pecoraro et al. Tiré de référence 68.

6) Transfert de protons

La réaction globale d'oxydation de deux molécules d'eau en oxygène implique la libération de quatre protons. La stœchiométrie de libération des protons de 1:0:1:2 pour les transitions $S_0 \rightarrow S_1 \rightarrow S_2 \rightarrow S_3 \rightarrow S_0$ a d'abord été largement acceptée et confirmée par des expériences réalisées sur thylakoides^{69,70}. Cependant, il a par la suite été démontré que ce schéma de libération n'est pas composé de nombres entiers et qu'il dépend très fortement du pH⁷¹ (Figure 28), du matériel et même de la présence de glycérol^{72,73,74,75}.

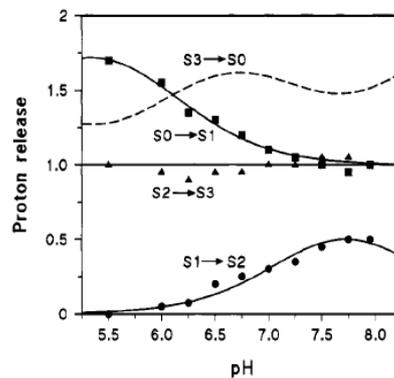


Figure 28 : Stœchiométries de libération de protons pour chaque transition $S_i \rightarrow S_{i+1}$, en fonction du pH. (Tiré de référence 71). Ce schéma fait intervenir des groupements dont le pK varie au cours de la transition $S_i \rightarrow S_{i+1}$ considérée.

L'existence de cette controverse concernant le schéma de libération des protons a été attribuée à des phénomènes de protonation/déprotonation de groupes amino-acides périphériques qui sont eux-mêmes soumis à des contraintes électrostatiques⁷⁶. Ces acides aminés ne sont pas à ce jour clairement identifiés. Une récente publication⁷⁷ basée sur des expériences de IRTF réalisées sur *T. elongatus* a proposé un schéma de 0.8–1.0:0.2–0.3:0.9–1.2:1.5–1.6 pour les transitions $S_0 \rightarrow S_1 \rightarrow S_2 \rightarrow S_3 \rightarrow S_0$. Il a été conclu que l'eau substrat libère ses protons selon le schéma 1:0:1:2, schéma qui est perturbé par des phénomènes de protonation/déprotonation partiels de groupes, probablement Arg, Lys, Tyr localisées à proximité du cluster de Mn_4Ca , en réponse à la variation de charge globale du complexe d'oxydation de l'eau durant la transition S_1 à S_2 .

IV) Les cofacteurs du photosystème II

1) Questions

Lorsque les premières structures cristallographiques de PSII dans les cyanobactéries ont été obtenues, la résolution n'était pas suffisante pour détecter l'ion Ca^{2+} ^{78,79}. Pourtant, sa présence et son utilité ont été démontrées dans le PSII de plante. La question s'est posée de savoir si le Ca^{2+} était présent dans le PSII de cyanobactérie. Il a donc été donné l'idée au laboratoire de développer une méthode pour remplacer biosynthétiquement le Ca^{2+} par du Sr^{2+} dans *T. elongatus*¹¹⁰. Plusieurs raisons ont expliqué le choix du strontium :

- Le strontium est le seul cation capable de maintenir l'activité du PSII en remplacement du calcium⁸⁰. La reconstitution de PSII déplété en Ca^{2+} avec du Sr^{2+} restaure 40% de l'activité sous éclairage continu, aussi bien chez *T. elongatus* que chez les plantes.
- Dans les plantes, cette baisse d'activité est due au ralentissement des transitions des états S_n ^{117,87,81}, ce qui peut être particulièrement intéressant dans le cas d'études enzymologiques et spectroscopiques pour piéger des états intermédiaires.
- Les techniques de titrage du calcium sont difficiles à mettre en œuvre, le strontium est plus facile à doser et à détecter spectroscopiquement.

Toutes les études étaient réalisées auparavant sur du PSII dans lequel le Ca^{2+} a été échangé par du Sr^{2+} selon une méthode biochimique. En général, ces traitements consistent à

laver le PSII purifié dans des solutions tampons à forte concentration en sels et à la lumière, ou par des traitements à bas pH. A cause de ces traitements sévères, il a été suggéré que les effets observés sur ces échantillons échangés biochimiquement étaient dus à des effets secondaires du traitement biochimique. De plus, ces procédures pour enlever le Ca^{2+} induisent une inhibition c'est à dire une perte du cluster de Mn_4Ca dans une petite fraction de centres PSII⁸². Enfin, la substitution par le Sr^{2+} n'est pas forcément 100% efficace et le matériel obtenu est souvent instable. Tous ces effets contribuaient à l'hétérogénéité des échantillons de PSII substitués par le Sr^{2+} .

L'échange biosynthétique paraissait donc la meilleure solution pour avoir à disposition un échantillon de PSII homogène et actif contenant du Sr^{2+} à la place du Ca^{2+} , en faisant pousser des cyanobactéries *T. elongatus* dans un milieu contenant du Sr^{2+} . La présence d'un Sr^{2+} par PSII dans ce type de PSII a été mise en évidence. Au même moment, une structure de PSII avec une résolution de 3.5Å a montré la présence d'un Ca^{2+} en interaction avec le cluster de Mn_4Ca ⁹. Des mesures de cristallographie aux rayons X plus récentes et de spectroscopie EXAFS ont confirmé que le Sr^{2+} est bien associé étroitement au cluster de Mn_4Ca , et dans une position similaire à celle du Ca^{2+} ^{83,84} (Figure 29).

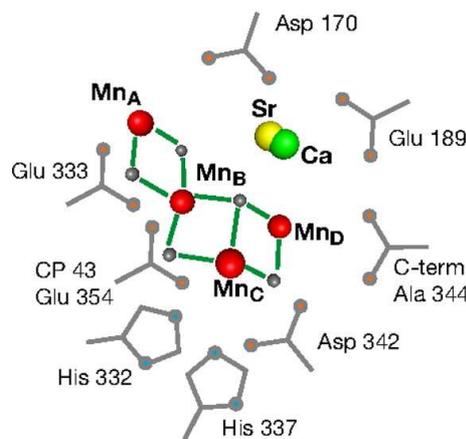


Figure 29 : Localisation du strontium par rapport au calcium dans l'état S_1 , déduite de mesures EXAFS. (Tiré de référence 83). L'atome de Ca est en vert et l'atome de Sr est en jaune. Les distances sont les suivantes : $\text{Sr-Mn}_{\text{B,C,D}} \approx 3,5 \text{ \AA}$ et $\text{Sr-Mn}_A \approx 4,0 \text{ \AA}$.

Lorsque ce travail a débuté, l'incertitude était totale concernant la localisation du deuxième cofacteur du photosystème II : le chlorure. Les questions suivantes étaient en suspens : Le chlorure est-il nécessaire ? Si oui, combien d'atomes sont impliqués dans le mécanisme ? Quel est le rôle du chlorure dans le mécanisme de dégagement d'oxygène ?

Pour répondre à ces questions, nous avons décidé d'utiliser la même approche que pour le calcium, à savoir un échange biosynthétique du chlorure par le bromure.

En parallèle avec cet échange biosynthétique du Cl^- par Br^- , nous avons décidé d'étudier le remplacement du Cl^- par un autre anion : I^- . L'iodure étant photoréactif et électrochimiquement actif, nous ne pouvons pas réaliser d'échange biosynthétique, mais seulement biochimique. Pour avoir matière à comparaison, nous avons en parallèle réalisé un échange biochimique du Cl^- par Br^- et par F^- (qui est un inhibiteur connu du dégagement d'oxygène). On trouve dans la littérature un grand nombre d'études où le Cl^- a été substitué biochimiquement par un autre anion, et dont les résultats sont parfois en contradiction. Cette hétérogénéité pourrait être due au fait que l'échange biochimique n'a pas été efficace. Comparer les résultats obtenus après échange biosynthétique et après échange biochimique peut nous permettre de répondre à cette question.

Nous avons pu ainsi en même temps étudier la question de l'échangeabilité du Cl^- . La question s'est posée de savoir si un échantillon de PSII purifié où le Cl^- a été remplacé biosynthétiquement par du Br^- peut être replacé dans un milieu contenant du Cl^- , sans ré-échanger le Br^- par du Cl^- au sein du complexe d'oxydation de l'eau. Cette donnée peut nous être particulièrement utile dans le cas des mesures Br-EXAFS. L'EXAFS est une technique qui peut être difficile à mettre en œuvre car tous les ions sont détectés, aussi bien ceux du milieu environnant que ceux fixés à la protéine. Pour ne pas avoir de Br^- dans le milieu à l'exception de celui ou ceux fixé(s) au PSII, deux situations sont envisageables : 1) On peut enlever tous les halogénures du milieu. La difficulté dans ce cas est de conserver l'activité de l'échantillon ; 2) On peut replacer l'échantillon dans un milieu contenant du Cl^- sans pour autant échanger le Br^- du site catalytique. Cette situation correspond à celle de l'échange $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$: on peut réaliser l'EXAFS du Sr^{2+} dans un milieu contenant du Ca^{2+} .

Par notre étude cinétique sur le PSII contenant du Br^- , nous avons pu montrer l'implication du Cl^- dans le dégagement d'oxygène (chapitre III). Au cours de ma thèse, en 2008, une structure cristallographique de PSII contenant du Br^- a été publiée (chapitre IV). Deux sites de fixation au Br^- ont été identifiés dans l'environnement du cluster de Mn_4Ca . Puis en 2009, est sortie une publication présentant la structure cristallographique de PSII avec I^- ⁸⁵. Les informations concernant le chlorure et le photosystème II se sont donc considérablement enrichies au cours de ces dernières années. Nous les aborderons dans la suite du document.

2) Les principaux signaux RPE connus en fonction des états S

Pour faciliter la compréhension des paragraphes suivants, nous allons maintenant aborder l'introduction des principaux signaux RPE connus en fonction des états S. La technique proprement dite est expliquée dans le chapitre suivant.

a) *Etat S₂*

Le cluster de Mn₄Ca donne lieu à plusieurs signaux RPE dans l'état S₂ : un signal multilignes et des signaux provenant d'au moins deux différents états haut-spin.

Le signal multilignes (Figure 30) est centré autour de $g = 2$ environ et s'étend sur environ 1800 G. Il est composé d'environ 18 lignes séparées d'environ 87 G. Il a été proposé qu'il provient d'un spin 1/2, très certainement d'un tétramère de Mn, probablement Mn^{IV}₃Mn^{III} (cf. Chapitre I. III) 3), pour plusieurs raisons : 1) Le signal disparaît lorsque le Mn est extrait ; 2) Le signal multilignes est très proche d'un spectre RPE de composés binucléaires ⁸⁶Mn^{III}Mn^{IV} de spin 1/2 dans lequel les ions Mn^{IV} de spin $S = 3/2$ et Mn^{III} de spin $S = 2$ sont couplés antiferromagnétiquement ; 3) Les raies hyperfines sont dues au couplage avec les noyaux de spin $I = 5/2$. Le nombre de raies implique l'existence d'un tétramère. Lorsque le Sr²⁺ est substitué au Ca²⁺, on observe un signal multilignes modifié⁸⁷.

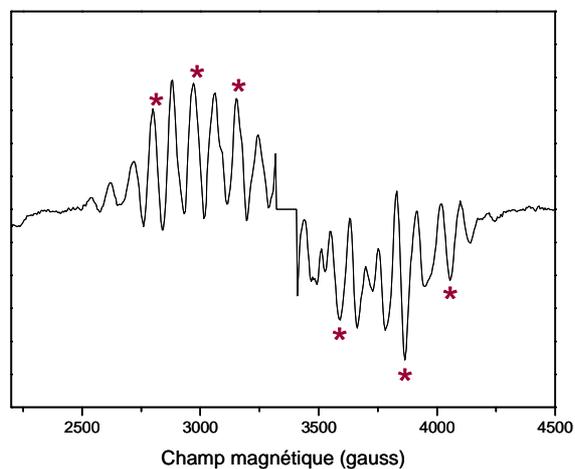


Figure 30 : Exemple de signal multilignes observé dans l'état S₂ (Spectre de différence « après moins avant éclairage »). Le spectre d'un échantillon adapté à l'obscurité a été enregistré, puis l'échantillon a été éclairé pour induire l'état S₂ (par un éclairage à 200 K) et un nouveau spectre a été enregistré. La partie centrale du spectre correspondant au signal de la Tyr_D a été éliminée. Ce spectre est enregistré dans les conditions suivantes : température 8,5 K, amplitude de modulation 25 G, puissance micro-ondes 20 mW, fréquence des micro-ondes 9,4 GHz, fréquence de modulation 100 kHz. Les étoiles rouges se rapportent à une expérience décrite ultérieurement.

Le signal de haut spin le plus souvent observé en S_2 est celui qui donne lieu à un signal autour de $g \approx 4$. De tels signaux sont observés dans deux types de conditions expérimentales : Premièrement, le signal $g \approx 4$ peut être généré par illumination à température ambiante ou à 200 K. La fraction des centres donnant naissance au signal $g \approx 4$ dépend du prétraitement de l'enzyme, particulièrement augmentée par a) la présence de sucrose dans le milieu^{88,141}, b) certains traitements pour enlever le chlorure du milieu^{127,124}, ou pour le remplacer par F^{-134} , I^{134} , des amines⁸⁹, ou NO_3^{-134} , et c) le remplacement du Ca^{2+} par Sr^{2+87} . Deuxièmement, le signal $g \approx 4$ peut être aussi généré par une illumination infrarouge du multilignes S_2 , entre 77 K et 170 K. Ceci correspond à une transition de l'état de spin du cluster de Mn_4Ca , du spin 1/2 au spin 5/2^{90,91}. Au dessus de 170 K, l'état S_2 de spin 5/2 induit par l'infrarouge est reconverti en multilignes S_2 de spin 1/2. Les signaux $g \approx 4$ observés dans les différentes conditions déjà décrites proviennent d'états de spin 5/2, mais qui ont des stabilités différentes en termes de température⁹¹.

Un troisième type de signal dans l'état S_2 a également été décrit. Des signaux pour des valeurs de $g > 5$ ont été observés quand l'état de spin 1/2 est illuminé par une lumière infrarouge à une température inférieure à 77 K. Entre 77 et 170 K, un processus de relaxation donne lieu à la formation du signal $g \approx 4$. Le nouveau signal $g > 5$ a été attribué à un état de haut spin (probablement 5/2) représentant un état du cluster de Mn_4Ca similaire à celui qui donne le signal $g \approx 4$ mais dans un environnement légèrement différent (non relaxé)^{92,93}.

b) Etat S_0

L'état S_0 donne également un signal multilignes centré autour de $g = 2$ ^{94,95}. Il est réparti sur environ 2380 G et est constitué d'environ 25 lignes résolues espacées de 65-95 G. Il provient du cluster de Mn_4Ca en spin 1/2. Le signal multilignes S_0 a été observé chez les plantes en présence de méthanol^{94,95} et chez *T. elongatus*⁹⁶. Bien que la présence d'alcool ne soit pas requise pour observer le signal S_0 chez *T. elongatus*, l'addition de méthanol améliore sa résolution. Les signaux obtenus chez les plantes et chez *T. elongatus* sont similaires mais non identiques.

c) *Etat S₁*

L'utilisation de techniques de RPE plus avancées permet la détection de signaux dans l'état S₁. Deux signaux ont été reportés : 1) un large signal à $g = 4,8^{97,98}$ et 2) un signal multilignes centré autour de $g = 12$ avec au moins 18 lignes séparées de 32 G⁵⁰. Le signal multilignes S₁ a été observé sur du PSII purifié de *Synechocystis* et de plante dans lequel les protéines extrinsèques de 17 et 23 kDa ont été enlevées.

d) *Etat S₃*

Une publication récente a décrit dans le détail le spectre RPE complet de l'état S₃ chez *T. elongatus*⁴⁷. Des signaux à $g \approx 8$ et $g \approx 4$ et un certain nombre d'autres signaux qui ont été reportés (Figure 31). Ces signaux ont été expliqués par un état de spin $S = 3$.

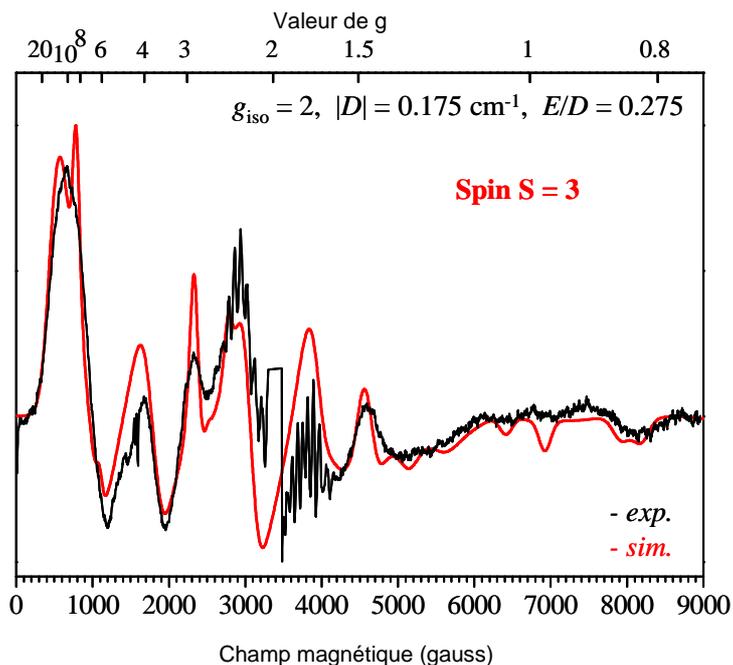


Figure 31 : Spectre RPE enregistré après 2 flashes en présence de PPBQ dissous dans du DMSO. Paramètres : amplitude de modulation 25 G ; puissance micro-ondes 20 mW ; fréquence micro-ondes 9,4 GHz ; fréquence de modulation 100 kHz ; température 8,5 K. La région spectrale Tyr_D^\bullet à $g \approx 2$ a été supprimée. En noir, le spectre expérimental et en rouge, le spectre simulé⁴⁷.

3) Le calcium

De tous les métaux, le calcium est celui qui remplit les fonctions les plus diverses dans les systèmes biologiques. On peut citer entre autres des fonctions liées à la structure, à la signalisation intercellulaire et intracellulaire, à la régulation de l'activité enzymatique, à la contraction des muscles et à la conduction des influx nerveux.

a) Méthodes d'extraction du Ca^{2+}

Il y a deux méthodes pour extraire le Ca^{2+} du PSII, avec des conséquences structurales différentes. La première méthode implique l'exposition de l'enzyme intacte à une force ionique élevée (1-2 M NaCl), qui génère un échantillon de PSII auquel il manque les sous-unités PsbP et PsbQ, et qui montre une activité faible sous éclairage continu^{99,100}. L'addition de Ca^{2+} permet de reconstituer l'activité de la manière la plus efficace. Seul le Sr^{2+} est également capable de restaurer l'activité, mais à des valeurs inférieures. La procédure originale d'extraction du Ca^{2+} inclut une illumination de l'échantillon, ce qui accélère la perte d'activité¹⁰¹, et l'inclusion d'un chélateur (1 mM EDTA ou EGTA) qui est recommandée pour supprimer les concentrations élevées de Ca^{2+} des préparations de PSII. L'effet de l'illumination sur le relargage du Ca^{2+} a été étudié par Boussac et Rutherford¹⁰² qui ont éclairé des préparations de PSII intact par une série de flashes, puis les ont exposées à une force ionique élevée avant de mesurer l'activité. Les résultats ont montré que, parmi les états S_n , l'état S_3 était l'état dans lequel il est le plus facile d'éliminer le Ca^{2+} . Des variations de cette méthode incluent la procédure développée par Kalosaka et al.¹⁰³ dans laquelle du PSII intact est exposé à un pH bas (5) durant le traitement aux sels à l'obscurité.

La deuxième méthode d'extraction du Ca^{2+} a été développée par Ono et Inoue¹⁰⁴, qui ont montré qu'une exposition rapide de PSII intact à des solutions de citrate à pH 3 résultait en une perte partielle d'activité, mais que les échantillons retenaient PsbP et PsbQ. Pour ces échantillons, la reconstitution de l'activité nécessite une longue incubation en présence de Ca^{2+} avant les mesures d'activité.

b) Stœchiométrie du calcium dans le PSII

Chez les plantes, un Ca^{2+} est associé à CP29¹⁰⁵, une protéine liée aux chlorophylles qui n'existe pas chez les cyanobactéries. Le rôle de CP29 est de collecter la lumière. Elle est

supposée jouer un rôle également dans les mécanismes de photoprotection¹⁰⁶. Un deuxième Ca^{2+} est lui nécessaire pour que l'oxydation de l'eau ait lieu^{106,107}. Un site de liaison spécifique au Ca^{2+} apparaît lors de l'assemblage du cluster de Mn_4Ca ¹⁰⁷, lors du processus de photoactivation. En effet, durant l'illumination, des intermédiaires très réactifs sont générés. Les dommages faits à la sous-unité D1 impliquent sa re-synthèse et son remplacement au sein des sous-unités du PSII, tout comme le réassemblage du cluster de Mn_4Ca . C'est ce réassemblage qui est appelé photoactivation¹⁰⁸. Le calcium intervient durant les premières étapes de la photoactivation à l'obscurité, et est indispensable pour l'assemblage correct des Mn du cluster.

De nombreuses études ont eu pour but de déterminer le nombre d'ions calcium présents au sein du Photosystème II. Les premières expériences étaient basées sur la réactivation de l'activité par addition de Ca^{2+} à des préparations de PSII préalablement déplétées en Ca^{2+} . Leurs résultats étaient sujets à controverse car certains groupes ont avancé que les procédures biochimiques utilisées pour enlever le Ca^{2+} ne résultaient pas en une déplétion du Ca^{2+} mais en un changement conformationnel qui est réversé par l'addition de Ca^{2+} ¹⁰⁹.

Pour éviter tous les problèmes liés aux traitements biochimiques dans les plantes, il a été proposé de réaliser le remplacement biosynthétique du Ca^{2+} par le Sr^{2+} en faisant pousser des cellules de cyanobactéries dans un milieu contenant du Sr^{2+} . Il a ainsi été montré la présence d'1 $\text{Sr}^{2+}/\text{PSII}$ et donc 1 $\text{Ca}^{2+}/\text{PSII}$ ¹¹⁰.

La stoechiométrie 4 Mn : 1 Ca a été confirmée au même moment par les premiers résultats d'études cristallographiques ayant détecté l'ion Ca^{2+} ^{9,10}.

c) Affinité de liaison

De nombreuses études ont été menées pour déterminer l'affinité de liaison du Ca^{2+} au complexe d'oxydation de l'eau. La constante de dissociation du métal a été estimée à partir de mesures d'activité sous éclairage continu d'un échantillon déplété en Ca^{2+} en fonction de la concentration en Ca^{2+} rajouté ensuite. Deux sites d'affinités différentes ont ainsi été mis en évidence : un site de faible affinité apparente avec un K_M de 1-5 mM, un site de forte affinité apparente avec un K_M de 50-100 μM ^{111,112,113}. Sur la base de la présence d'un seul site de fixation au Ca^{2+} dans le complexe d'oxydation de l'eau, l'existence de deux valeurs de

constantes de dissociation a été interprétée comme un seul site de fixation dont la constante de demi-activation K_M varie en fonction de l'état redox du complexe de manganèse⁸⁷.

d) *Calcium et avancement des états S*

Chez les plantes, quand le Ca^{2+} est enlevé de son site, l'oxydation du manganèse a toujours lieu permettant la formation de S_2 , mais à l'étape suivante, un état S_3 anormal est formé^{114,115}. Cet état S_3 est caractérisé par un signal RPE particulier appelé le « split signal » centré à $g = 2$, d'une largeur de 130-164 G selon l'absence ou la présence des polypeptides 17 ou 23 kDa¹¹⁴, dans le PSII de plantes. Ce signal a été attribué à un radical libre en interaction magnétique avec le cluster de Mn_4Ca . Il est également observé dans du PSII déplété en Cl^- . De son spectre UV¹¹⁵ et de mesures IRTF¹¹⁶, il a d'abord été conclu que ce radical était un résidu Histidine. Ce signal a ensuite été attribué à une forme anormale de Tyr_Z^\bullet ^{117,118}, notamment suite à une étude RPE réalisée sur du PSII de cellules *Synechocystis* poussées en présence de tyrosine deutérée, qui a montré que le split signal est modifié en présence de tyrosine deutérée¹¹⁹. Cependant, l'implication de la tyrosine Tyr_Z^\bullet dans le split signal n'est pas une chose acquise. Les auteurs ont attribué la modification du signal à l'incorporation de la tyrosine deutérée. Mais d'après une étude réalisée au laboratoire (non publiée), la modification du split signal observée serait en fait due à la durée du traitement acétate utilisé pour dépléter le PSII en Cl^- et non à l'incorporation de deutérium. La déplétion en Ca^{2+} entraîne donc très probablement un blocage du cycle des états S_n dans l'état $S_2Tyr_Z^\bullet$.

Styring et al.¹²⁰ ont suggéré que le blocage de la réaction $S_2Y_Z^\bullet \rightarrow S_3Y_Z$ n'a pas lieu à bas pH, bien que la réaction soit trois fois plus lente qu'en présence de Ca^{2+} . Sur la base de cette observation, la principale conséquence de la déplétion en Ca^{2+} est attribuée à l'incapacité du complexe d'oxydation de l'eau à réaliser les réactions : 1) $Tyr_Z^\bullet + e^- \rightarrow Tyr_ZO^-$ 2) $Tyr_ZO^- + H^+ \rightarrow Tyr_ZOH$.

D'autres rôles du Ca^{2+} ont été suggérés : 1) contrôler l'accès du substrat et du Cl^- au site actif⁵⁸ et 2) être le site de fixation d'au moins une des molécules d'eau substrat^{68,67}.

e) *Cofacteurs alternatifs*

L'étude de la capacité de différents métaux à remplacer le Ca^{2+} et à activer le dégagement d'oxygène a montré que seul le Sr^{2+} est capable de restaurer l'activité d'un échantillon de PSII de plante déplété en Ca^{2+} ⁹⁹. La vitesse de dégagement d'oxygène d'un

échantillon de PSII déplété en Ca^{2+} et réactivé par du Sr^{2+} est plus faible¹²¹. Des changements spectraux du signal multilignes en S_2 sont également observés (Figure 32).

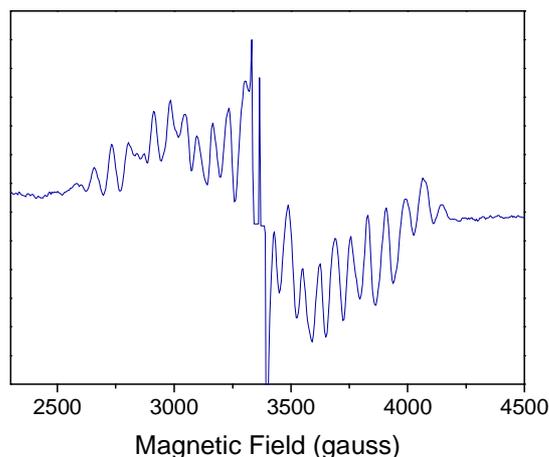


Figure 32 : Exemple de signal multilignes observé dans l'état S_2 lorsque le Ca^{2+} est substitué par du Sr^{2+} . (Spectre de différence « après moins avant éclairage »). Ce spectre est enregistré dans les conditions suivantes : température 8,5 K, amplitude de modulation 25 G, puissance micro-ondes 20 mW, fréquence des micro-ondes 9,4 GHz, fréquence de modulation 100 kHz.

Par comparaison avec la Figure 30, on observe que certaines lignes apparaissent, d'autres disparaissent ou sont décalées. L'espace moyen entre les lignes passe de 87,9 G en présence de Ca^{2+} à 71,0 G avec du Sr^{2+} .

Suite à des mesures IRTF, il a été proposé qu'un mode vibrationnel Mn-O-Mn est modifié par le remplacement du Ca^{2+} par Sr^{2+} ¹²² et que le Ca^{2+} pouvait être nécessaire pour la formation du réseau de liaisons hydrogène impliqué dans l'étape d'oxydation de l'eau¹²³.

4) Le chlorure

a) Méthodes d'extraction du chlorure

Différentes méthodes ont été employées pour enlever le chlorure du PSII : dialyse¹²⁴, traitement à pH élevé¹²⁷, traitement au sulfate¹²⁵, déplétion des protéines extrinsèques¹²⁶. Dans tous les cas, dans le PSII de plante, enlever le Cl^- inhibe le dégagement d'oxygène et induit des perturbations au niveau du cluster de Mn_4Ca qui varient en fonction de la méthode employée.

b) Chlorure et avancement des états S

Lorsqu'on enlève le Cl^- en lavant et incubant l'échantillon dans un tampon sans Cl^- à pH 6,3, la proportion de centres qui se trouvent dans l'état S_2 dans un état de haut spin $S = 5/2$ (signal $g \approx 4$ en RPE) augmente par rapport à la proportion de centres qui donnent un signal multilignes qui est légèrement modifié, mais l'enzyme continue de tourner à une vitesse réduite¹²⁷. Quand le Cl^- est enlevé par un traitement à haut pH (pH 10), l'activité n'est plus que d'environ 15%¹²⁷. Le signal multilignes disparaît totalement et l'état de haut spin est formé dans au moins 40 % des centres.

Ces résultats ont été expliqués par la présence de deux sites de fixation au Cl^- . L'un de ces sites n'est pas essentiel pour le dégagement d'oxygène, il est déplété en Cl^- par lavage à pH 6,3 résultant dans une structure modifiée du cluster de Mn_4Ca . Un second site Cl^- est nécessaire pour le dégagement d'oxygène. Lorsqu'on enlève le chlorure de ce site par un traitement à pH 10, deux types de centres sont formés : ceux exhibant un signal $g \approx 4$ et ceux n'exhibant pas de signal dans l'état S_2 . La fraction des centres qui montrent le signal $g \approx 4$ est bloquée pour la transition S_3 à S_0 .

Maintenant, examinons les résultats obtenus après un traitement avec SO_4^{2-} pour enlever le Cl^- ¹²⁵. (1) Après éclaircissement à 200K (qui fait avancer tous les centres dans l'état S_2 dans un échantillon contrôle), aucun signal multilignes associé à l'état S_2 n'est observé, mais seulement un large signal à $g \approx 4$. Le signal multilignes est complètement récupéré après addition de Cl^- . (2) En absence de Cl^- dans l'état S_2 , le signal multilignes n'est pas induit par un simple flash à 0°C. Cependant, après addition de Cl^- après le flash, le signal multilignes se développe à l'obscurité. (3) Si on donne au même échantillon une série de flashes, le signal multilignes obtenu n'oscille pas en fonction du nombre de flashes. Ces résultats indiquent que le complexe d'oxydation de l'eau de membranes déplétées en Cl^- est capable de stocker au moins un équivalent positif, un état S_2 modifié, qui ne donne pas de signal multilignes. L'addition de Cl^- convertit cet équivalent positif en un état S_2 normal qui donne le signal multilignes. La formation des états S_n suivants est bloquée.

Par ces deux exemples, on se rend compte de l'hétérogénéité des résultats obtenus sur du PSII déplété en Cl^- . En fonction de la méthode utilisée pour enlever le Cl^- , les observations faites sont différentes.

Différentes propositions ont été avancées pour expliquer le besoin en Cl^- pour l'activité redox du complexe d'oxydation de l'eau. Une première idée était que l'anion fonctionnait comme un pont entre les atomes de Mn. Il a été aussi proposé que le rôle du Cl^-

est de réguler les propriétés redox du cluster de Mn_4Ca^{58} . D'autres modèles ont supposé que le Cl^- liait le Ca^{2+} à un des atomes de Mn impliqué dans l'oxydation de l'eau, ou que le Cl^- était lié seulement à Ca^{2+} ⁶³.

c) *Stœchiométrie du chlorure*

La stœchiométrie du Cl^- associé au PSII n'est pas claire du fait de la difficulté à le détecter directement. Lindberg et al.^{124,128,129} ont cherché à la déterminer en utilisant du $^{36}Cl^-$.

Dans une première publication¹²⁹, il a été montré que des fragments de membrane de PSII isolés d'épinards cultivées sur du milieu contenant du $^{36}Cl^-$ retenaient environ 0,3 Cl^- /PSII après 12 heures de lavages intensifs en présence de détergent. Les auteurs en ont conclu qu'il existe un pool de Cl^- qui s'échange très lentement dans le PSII, contenant au moins 1 Cl^- /PSII.

Dans une deuxième publication¹²⁸, des membranes de PSII ont été purifiées puis lavées intensivement dans un milieu sans Cl^- . Du $^{36}Cl^-$ a été incorporé aux membranes en les incubant 10-12 heures dans un milieu contenant du $Na^{36}Cl$. Un nouveau lavage a été réalisé dans un milieu sans Cl^- pour enlever le $^{36}Cl^-$ non fixé. Les membranes marquées au $^{36}Cl^-$ ont été dialysées contre un milieu sans Cl^- durant 24 heures, durant lesquelles la quantité de $^{36}Cl^-$ /PSII et l'activité sous éclairage continu ont été mesurées à intervalles réguliers. Les auteurs ont ainsi montré que lorsqu'il n'y a plus de $^{36}Cl^-$ lié au PSII, l'activité reste à un niveau significatif par rapport à un échantillon contrôle incubé dans du Cl^- (30-40 %).

Enfin, dans une troisième publication¹²⁴, les auteurs ont montré que la baisse d'activité provenait non pas de l'inactivation de 60-70% des centres, mais du ralentissement de 100% des centres.

Des résultats obtenus dans ces trois publications, il a été conclu que le Cl^- n'est pas nécessaire pour l'activité de l'enzyme. Cette conclusion, cependant, repose sur l'hypothèse que tous les Cl^- ont été relâchés dans les conditions de l'expérience. Or dans la deuxième publication, les auteurs n'ont pas montré que le lavage intensif des membranes avant l'incubation dans du $^{36}Cl^-$ permettait de libérer tous les sites de fixation au Cl^- . Si 30-40% des sites sont occupés par du $^{35}Cl^-$ après lavage, alors seuls 60-70% des sites seraient occupés par du $^{36}Cl^-$. Comme les sites occupés par du $^{35}Cl^-$ ne sont pas détectés, on peut penser qu'ils sont responsables de l'activité résiduelle de 30-40%. Pour résoudre cette question, il faudrait isoler du PSII de cellules poussées sur du milieu $^{36}Cl^-$, et le dialyser contre du milieu sans Cl^- , en suivant l'activité et la quantité de Cl^- /PSII.

Au laboratoire, suite à des lavages intensifs dans un milieu sans Cl^- , il a été montré que le PSII contient approximativement un Cl^-/PSII (travail en préparation), ce qui soulève à nouveau des questions sur les expériences relatées dans la littérature. Il serait très difficile d'enlever tout le Cl^- du PSII.

Les différences observées après déplétion en Cl^- peuvent être expliquées par la présence d'un ou plusieurs sites de fixation au chlorure dans le PSII. Leur activité dépendrait de la fixation d'un chlorure sur un site de forte affinité, et cette liaison pourrait moduler la fixation d'un deuxième atome Cl^- ^{127,130}.

d) Affinité de liaison

Lindberg et al. ont déterminé une constante de dissociation (K_d) de 20 μM et un temps de dissociation de 1 heure sur du PSII de plante intact et adapté à l'obscurité. Ce résultat est très dépendant de l'intégrité du photosystème II. Des membranes de PSII déplétées en protéines extrinsèques demandent des concentrations en Cl^- plus élevées pour atteindre une activité maximale¹³¹.

e) Cofacteurs alternatifs

i. Généralités

D'autres anions sont capables de remplacer fonctionnellement le Cl^- , mais seul le Br^- est capable de maintenir le dégagement d'oxygène à un niveau qui approche celui observé avec du Cl^- . L'ordre d'efficacité de ces anions est le suivant : $\text{Cl}^- \approx \text{Br}^- \gg \text{NO}_3^- > \text{NO}_2^- > \text{I}^-$ ¹³². Les anions qui peuvent se substituer au chlorure déstabilisent les états S_n les plus hauts, car ils interagissent avec les atomes de Mn dans un état d'oxydation élevé¹³³.

ii. Cas particulier de l'iodure

Jusqu'à présent, deux types d'expériences ont été menés pour étudier l'effet de la substitution du Cl^- par I^- . Le premier^{134,135} a consisté à dépler le PSII purifié de plantes en Cl^- par des traitements sévères qui enlèvent également certaines protéines extrinsèques (18, 24 et 33 kDa). Ces échantillons présentent néanmoins un dégagement d' O_2 normal lorsqu'on ajoute Cl^- , Ca^{2+} et/ou les protéines extrinsèques¹³⁵. Pour réaliser ensuite l'insertion de I^- dans

le site catalytique, une forte concentration de NaI est ajoutée dans le milieu. L'effet de la substitution biochimique par l'iodure a plusieurs effets¹³⁴: l'activité du PSII est égale à environ 20% de celle mesurée après ajout de Cl⁻, perte du signal multilignes, conservation du signal RPE à $g \approx 4$ caractéristique de l'état S₂ et présent également dans l'échantillon contrôle qui conserve le Cl⁻, position normale du pic de thermoluminescence (cf. Chapitre II) provenant de la recombinaison S₂Q_B⁻. Bien que la position normale du pic de thermoluminescence suggère que les propriétés redox de l'état S₂ sont inchangées, l'absence de signal multilignes et l'inhibition presque totale de l'activité montre clairement que l'état S₂ est modifié.

Le second^{136,137,138} consiste à utiliser un lavage à haut pH pour enlever le Cl⁻, sans enlever les protéines extrinsèques, puis l'iodure est inséré dans le PSII, et un lavage est fait pour ôter une grande partie de l'I⁻ restant dans le milieu pour éviter une iodination inhibitrice¹³⁹. Dans ce cas, l'activité avec I⁻ est environ égale à 60-80% de celle de l'échantillon contrôle. I⁻ est donc capable de remplacer fonctionnellement le Cl⁻ pour le dégagement d'oxygène. Par contre, les expériences de thermoluminescence¹³⁸ ont montré que dans le cas des échantillons reconstitués avec I⁻, la température de thermoluminescence provenant de la recombinaison de S₂Q_A⁻ et S₂Q_B⁻ était décalée vers les hautes températures en comparaison avec les PSII natif et le PSII reconstitué avec Cl⁻. Ceci a été interprété comme une baisse de potentiel redox de l'état S₂, qui est donc plus stable que le PSII non traité.

La question de l'iodure activateur ou inhibiteur du dégagement d'oxygène a été ensuite éclairée par des résultats de Rashid et Homann¹³⁷ qui ont conclu qu'I⁻ pouvait remplacer Cl⁻ et maintenir un dégagement d'oxygène important, lorsque l'anion est lié seulement au site du cofacteur dans le PSII et n'est pas présent dans le milieu, ainsi l'ion I⁻ lié au site Cl⁻ ne serait pas réducteur.

L'action inhibitrice proviendrait en effet de sa capacité à donner des électrons au PSII^{140,135,139}. L'iodure peut réduire la Tyr_Z⁺ du polypeptide D1 lorsque le manganèse est absent, ou réduire le cluster de Mn₄Ca dans du PSII dépourvu de PsbP et PsbO¹³⁵. Les durées de vie des états S₂ et S₃ ont été étudiées par spectroscopie d'absorption UV¹³³ en présence de plusieurs anions qui peuvent remplacer Cl⁻, dont Br⁻, NO₃⁻, I⁻ et NO₂. Cette étude a révélé la présence d'un second site fixateur d'anion à partir duquel les états S_n élevés pouvaient être réduits par NO₂ et I⁻.

iii. Cas particulier du fluorure

Lorsque le Cl^- est substitué par le F^- , le dégagement d'oxygène ne représente que 10% du dégagement d'oxygène d'un échantillon de PSII contrôle¹³⁴ et l'activité n'est restaurée qu'à 87% par ré-addition de Cl^- . Le pic de thermoluminescence provenant de la recombinaison $\text{S}_2\text{Q}_\text{B}^-$ est décalé de 13°C vers les hautes températures lorsque le F^- est présent, mais l'aire sous la courbe de thermoluminescence, ce qui correspond à la luminescence totale, est sensiblement identique à celle du contrôle. Ceci suggère que la substitution de Cl^- par F^- n'affecte pas la formation et la recombinaison des paires de charges, mais plutôt les propriétés des paires de charges stabilisées. Lorsque du Cl^- est ré-ajouté à l'échantillon, le pic de thermoluminescence retrouve sa position normale, ce qui confirme la restauration réversible du dégagement d'oxygène. Par RPE, dans un échantillon de PSII contenant du F^- et éclairé à 200 K pour générer l'état S_2 , le signal $g \approx 4$ est formé au détriment du signal multilignes. Le signal $g \approx 4$ proviendrait d'une sous-population de centres S_2 dans lesquels le cluster de Mn_4Ca se trouve dans un environnement structural légèrement différent¹⁴¹

Chapitre II. MATERIEL ET METHODES

I) Un organisme de choix : *Thermosynechococcus elongatus*

La cyanobactérie thermophile *Thermosynechococcus elongatus* est un organisme de choix pour l'étude de la photosynthèse. Elle a été découverte dans une source chaude à Beppu, au Japon¹⁴². Le photosystème II de cette espèce est beaucoup plus stable que celui des plantes, bien que pratiquement identique et son génome a été récemment entièrement séquencé¹⁴³. Ses avantages sont : les progrès en cours sur la manipulation de son génome, et sa robustesse qui permet de la purifier et de la modifier biochimiquement sans craindre pour sa stabilité.

La souche que nous avons utilisée (fournie par M. Sugiura) tout au long de ce travail présente deux caractéristiques :

- Elle porte une étiquette His-Tag sur la sous-unité CP43 qui permet une purification rapide¹⁴⁴. Cette suite de six résidus histidine permet la fixation du PSII par chromatographie sur colonne de Ni²⁺, selon le protocole développé par M. Sugiura.
- Les gènes psbA1 et psbA2 ont été supprimés. La protéine D1 du PSII peut potentiellement être exprimée par trois gènes différents, psbA1, psbA2 et psbA3. Les alignements de séquences d'acides aminés sont comparés dans la Figure 33. Quand on compare la séquence d'acides aminés de D1-3 (codée par psbA3), les séquences de D1-1 (psbA1) et D1-2 (psbA2) diffèrent respectivement de 21 et 31 acides aminés (Figure 33).

psbA1: tlr1843	1	M T T T L Q R R E S A N L W E R F C N W V T S T D N R L Y V G W F G V I M I P T L L A A T I C F V I A F I A A P P V D I	60
psbA2: tlr1844	1	M T T V L Q R R Q T A N L W E R F C D W I T S T E N R L Y I G W F G V I M I P T L L A A T I C F V I A F I A A P P V D I	60
psbA3: tlr1477	1	M T T V L Q R R E Q L N L W E Q F C S W V T S T N N R L Y V G W F G V L M I P T L L A A T I C F V I A F I A A P P V D I	60
psbA1: tlr1843	61	D G I R E P V S G S L L Y G N N I I T G A V V P S S N A I G L H F Y P I W E A A S L D E W L Y N G G P Y Q L I I F H F L	120
psbA2: tlr1844	61	D G I R E P V S G S L L Y G N N I I T A A V V P S S N A I G L H L Y P I W D A A S L D E W L Y N G G P Y Q L I I F H F L	120
psbA3: tlr1477	61	D G I R E P V S G S L L Y G N N I I T G A V V P S S N A I G L H F Y P I W E A A S L D E W L Y N G G P Y Q L I I F H F L	120
psbA1: tlr1843	121	L G A S C Y M G R Q W E L S Y R L G M R P W I C V A Y S A P L A S A F A V F L I Y P I G Q G S F S D G M P L G I S G T F	180
psbA2: tlr1844	121	I G I F C Y M G R E W E L S Y R L G M R P W I P V A F S A P V A A A T A V L L I Y P I G Q G S F S D G L M L G I S G T F	180
psbA3: tlr1477	121	I G V F C Y M G R E W E L S Y R L G M R P W I C V A Y S A P V A A A T A V F L I Y P I G Q G S F S D G M P L G I S G T F	180
psbA1: tlr1843	181	N F M I V F Q A E H N I L M H P F H Q L G V A G V F G G A L F C A M H G S L V T S S L I R E T T E T E S A N Y G Y K F G	240
psbA2: tlr1844	181	N F M I V F Q A E H N I L M H P F H M L G V A G V F G G A L F A A M H G S L V T S S L I R E T T E T E S T N Y G Y K F G	240
psbA3: tlr1477	181	N F M L V F Q A E H N I L M H P F H Q L G V A G V F G G A L F S A M H G S L V T S S L I R E T T E T E S A N Y G Y K F G	240
psbA1: tlr1843	241	Q E E E T Y N I V A A H G Y F G R L I F Q Y A S F N N S R S L H F F L A A W P V V G V W F T A L G I S T M A F N L N G F	300
psbA2: tlr1844	241	Q E E E T Y N I V A A H G Y F G R L I F Q Y A S F N N S R S L H F F L A A W P V V G I W F A A L G I S T M A F N L N G F	300
psbA3: tlr1477	241	Q E E E T Y N I V A A H G Y F G R L I F Q Y A S F N N S R A L H F F L A A W P V I G I W F T A L G I S T M A F N L N G F	300
psbA1: tlr1843	301	N F N H S V I D A K G N V I N T W A D I I N R A N L G M E V M H E R N A H N F P L D L A S A E S A P V A M I A P S I N G	360
psbA2: tlr1844	301	N F N H S V V D A Q G N V I N T W A D I I N R A N I G I E V M H E R N A H N F P L D L A S G E L A P V A M I A P S I E A	360
psbA3: tlr1477	301	N F N H S V V D A Q G N V I N T W A D I I N R A N L G M E V M H E R N A H N F P L D L A S A E S A P V A M I A P S I N G	360

Figure 33 : Alignement des trois séquences d'acides aminés de la sous-unité D1 du photosystème II de *T. elongatus*. Les deux gènes psbA1 et psbA2 sont comparés à psbA3. Les différences sont surlignées en bleu.

Leur niveau d'expression dépend des variations qui ont lieu pendant la culture des cellules, notamment dans les conditions de lumière et de température^{145,146}. Le résultat d'une étude sur le niveau d'expression de ces gènes dans différentes conditions est résumé Figure 34. On peut voir que dans des conditions normales de croissance, le gène psbA1 est majoritairement exprimé, tandis que sous forte lumière, c'est le gène psbA3 qui s'exprime. Le gène psbA2 est quand à lui toujours exprimé très minoritairement.

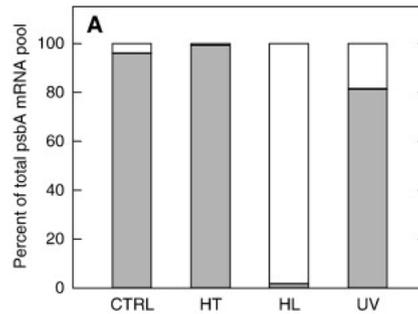


Figure 34 : Distribution de l'ARNm des gènes PsbA dans différentes conditions de lumière et de température. Des cellules *T. elongatus* poussées à 40°C et sous une intensité lumineuse de 40 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (CTRL) ont été exposées à différentes conditions : haute température à 60°C, pendant deux jours (HT), intensité lumineuse forte 1000 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, pendant 4 heures (HL), lumière UV-B de 12 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pendant 3 heures. En gris : psbA1, en noir, psbA2 et en blanc psbA3. Tiré de référence 145.

Dans la souche que nous utilisons, seul le gène psbA3 est exprimé, ce qui confère une plus grande homogénéité à nos préparations. Le choix de garder seulement psbA3, plutôt que psbA1 par exemple, a été fait pour faciliter la manipulation génétique, du fait que les deux gènes psbA1 et psbA2 sont situés côte à côte dans le génome. L'homogénéité de nos préparations est importante dans le cadre de nos mesures car l'ajout de Sr^{2+} ou de Br^- dans nos milieux pourrait être un facteur supplémentaire de variation d'expression des gènes codant pour D1.

II) Méthodes

1) Culture des cellules et purification des thylakoides et du PSII

a) Conditions de culture

Les cellules sont cultivées dans 1L de milieu DTN (Tableau 1) dans des erlenmeyers de 3L, sous agitation continue, dans une atmosphère enrichie en CO₂, à 45°C, sous lumière continue (80 μmol de photons.m⁻².s⁻¹). La température optimale d'une culture de *T. elongatus* est de 55-60°C, mais du fait de la présence de cassettes de résistance non thermophiles aux antibiotiques dans certaines cultures, il a fallu abaisser cette température. Le milieu est enrichi de 0,8 mM de CaCl₂, SrCl₂, CaBr₂ ou SrBr₂ en fonction du type d'échange biosynthétique.

A		B		C	
milieu DTN		medium 40X (pour 1 L)		Micronutriments (pour 1L)	
	Concentration finale	EDTA 2Na	7,6 g	H ₂ SO ₄ (conc)	0,5 mL
medium 40X	1X	MgSO ₄ , 7H ₂ O	4 g	H ₃ BO ₃	0,5 g
FeIII sans Cl	14,4 mM	KNO ₃	4 g	MnSO ₄ , H ₂ O	2,28 g
Na ₂ S ₂ O ₃	160 mM	NaNO ₃	28 g	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,5 g
Na ₂ SO ₃	160 mM	Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O	5,6 g	CuSO ₄ , 5H ₂ O	25 mg
NaHSO ₃	320 mM			Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	25 mg
Tricine (NaOH)	1M pH 7,6			CoSO ₄ , xH ₂ O	29 mg
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 M			(NH ₄) ₂ Ni(SO ₄) ₂ , 6H ₂ O	19 mg
micronutriments	0,5 mL pour 1 L			Na ₂ SeO ₄	4 mg

Tableau 1 : Composition du milieu de culture DTN. Le milieu DTN utilisé pour les cellules est celui dont la composition est donnée dans le tableau A. Il contient deux solutions à préparer antérieurement : une solution appelée Medium 40X (tableau B) et une solution de micronutriments (tableau C). Le pH du milieu DTN et du Medium 40X est ajusté à pH 7,60-7,65 avec NaOH. Les flacons de milieu DTN sont autoclavés à 120°C durant 20 min. Après autoclave, 10 mM de NaHCO₃ sont ajoutés sans modifier le pH. La pureté des produits utilisés est toujours la meilleure disponible dans le commerce.

Le pourcentage de chlorure est inférieur à 0,001% dans le glycérol, à 0,02% dans la bétaine et à 0,005% dans le MES. La contamination en Cl⁻ est estimée d'après les spécifications fournies par les fabricants de l'ordre de 40 μM (provenant essentiellement de la tricine).

La concentration cellulaire est estimée par mesure de la diffusion à 750 nm. Les cellules sont cultivées jusqu'à obtenir 16 L de milieu avec une densité optique (DO) comprise

entre 1 et 1,2 à 750 nm, qui mesure la diffusion. Avec une DO de cette valeur, la concentration en chlorophylle est d'environ 10 mg/L de culture.

b) Purification des thylakoides

La purification des thylakoides et du PSII nécessite l'utilisation de trois solutions tampon différentes appelées TP1, TP3 et TP4 dont la composition est donnée dans le Tableau 2.

TP1		TP3		TP4	
Glycérol	10%	Glycérol	10%	Glycérol	10%
MES	40 mM	MES	40 mM	Bétaine	1 M
Bétaine	1 M	Bétaine	1 M	MgX ₂	15 mM
MgX ₂	15 mM	MgX ₂	15 mM	CaX ₂	15 mM
CaX ₂	15 mM	CaX ₂	15 mM	NaX	200 mM
		NaX	100 mM	Imidazole	300 mM
		Imidazole	15 mM	MES	160 mM
		βDM	0.03%	βDM	0.06%

Tableau 2 : Compositions des solutions tampons TP1, TP2 et TP3. Le pH de ces solutions est ajusté à pH 6,5 avec NaOH (pour TP1) et HX (pour TP3 et TP4). X représente Cl ou Br selon l'échange biosynthétique réalisé. Le βDM est ajouté après ajustement du pH et du volume.

Les cellules sont concentrées par centrifugation à 6500 rpm à température ambiante. Après un lavage à température ambiante dans du TP1, les cellules sont resuspendues dans 100 à 150 mL de TP1 auquel on ajoute 1 mM d'acide caproïque, 1 mM de benzamidine, 0,2 % de BSA et une pointe de spatule de DNase I (pancréas bovin, Sigma). Acide caproïque et benzamidine sont des antiprotéases, et la BSA est utile pour piéger les lipides relâchés dans le milieu pour éviter qu'ils ne jouent le rôle de détergent. Les cellules sont cassées à la presse de French. Après une centrifugation à 3500 rpm pendant 6 minutes pour enlever les cellules non cassées, le surnageant contenant les protéines solubles ainsi que les membranes (dont les thylakoides) est centrifugé pendant 25 minutes à 50000 rpm à 4°C puis resuspendus dans du TP1 à trois reprises. Le culot de thylakoides final est repris dans du TP1. Pour des mesures sur thylakoides, la concentration finale en chlorophylle est d'environ 2 mg.mL⁻¹. Les échantillons sont conservés dans l'azote liquide dans certains cas, pour une utilisation particulière. Sinon, la purification du PSII est enchaînée immédiatement.

c) Purification du PSII

Les thylakoides préparés selon le protocole précédent sont repris dans un volume total tel que la concentration finale en chlorophylle soit de 1 mg.mL^{-1} , après ajout des produits suivants dans le TP1 : du détergent β DM (dodecyl-beta-D-maltoside) dont la concentration finale est égale à 1% pour les échantillons CaX_2 et 0,8% pour les échantillons SrX_2 , et 100 mM de NaCl ou NaBr. La suspension est ensuite centrifugée pendant 15 minutes à 45000 rpm à 4°C , puis le surnageant est mélangé à environ 100 mL de résine ProBond™ qui a auparavant été équilibrée avec du TP1. Le mélange thylakoides solubilisés - résine est déposé sur une colonne et lavé avec au moins 5 volumes de résine à l'obscurité à 4°C avec du TP3 (composition donnée dans le Tableau 2). La vitesse d'écoulement est de 0,5 à 1 mL.min^{-1} . Le PSII est ensuite élué avec du TP4 (composition donnée dans le Tableau 2). L'éluat est concentré et lavé une fois en utilisant des tubes Amicon Ultra-15 (Millipore) dans du TP1. Pour un volume de 16 L de culture de cellules, on obtient généralement 160 mg de chlorophylle après le cassage des cellules, et le rendement en chlorophylle après la purification du PSII est de 3 à 5 %. Le PSII est conservé dans l'azote liquide à une concentration de $1,5\text{-}2 \text{ mg.mL}^{-1}$ dans du TP1.

d) Déplétion en manganèse

Les échantillons de PSII sont dilués approximativement 10 fois dans un milieu contenant 1,2 M de Tris-HCl (pH 9,2) et sont incubés à 4°C à la lumière pendant 1 heure. Les échantillons sont collectés par centrifugation (15 minutes à $170\,000g$) après addition de 1,2 M de Tris (pH 9,2) contenant 50 % de polyéthylène glycol 8000 pour que la concentration finale en PEG soit de 12 %. Le culot est ensuite repris dans une solution à pH 6,5 contenant 50 % de PEG, recentrifugé puis resuspendu dans du TP1 à pH 6,5, pour abaisser le pH. Le culot final est repris dans du TP1.

2) Dégagement d'oxygène sous éclairage continu

Le dégagement d'oxygène du PSII sous éclairage continu est mesuré par polarographie à 27°C , en utilisant une électrode de Clark (Hansatech) qui mesure la concentration en O_2 dissous. L'échantillon est dilué dans le TP1 décrit précédemment pour atteindre une concentration en chlorophylle de $5 \text{ }\mu\text{g/mL}$ dans la cuve de l'électrode, et éclairé

par une lumière blanche saturante. Un accepteur d'électrons est ajouté au milieu de mesure : du DCBQ (2,6-dichloro-p-benzoquinone) dissous dans du diméthylsulfoxyde, à une concentration finale de 0,5 mM. La bétaine, le DCBQ et Q_B réagissent ensemble en présence d' O_2 , au bout de quelques minutes. Pour cette raison, les mesures d'activité du PSII sont réalisées moins d'une minute après l'addition de DCBQ dans le milieu de mesure.

3) Oxymétrie résolue en temps

a) *Méthode*

Cette technique nous permet de mesurer la quantité d' O_2 émis au cours du temps par un échantillon éclairé par une série de flashes¹⁴⁷. L'électrode utilisée a été construite au laboratoire¹⁴⁸. Deux combinaisons d'électrodes ont été utilisées : soit Pt/Ag/AgCl pour les échantillons Ca/Cl et Sr/Cl, soit Pt/Ag/AgBr pour les échantillons Ca/Br et Sr/Br. Le dépôt de Cl^- ou Br^- sur l'électrode d'Ag a été fait par immersion dans l'acide HCl ou HBr à une concentration de 1M et en imposant une polarisation positive. L'électrode d'Ag est plongée dans un milieu circulant pour maintenir une concentration en O_2 constante. Le milieu circulant dont le volume total est de 250 mL contient 10% de glycérol, 1 M de bétaine, 15 mM de CaX_2 , 15 mM MgX_2 , 50 mM KX, et 40 mM de MES, à pH 6,5. Des informations cinétiques ne peuvent être déduites de ces mesures que si l'échantillon est sédimenté sur l'électrode de Pt sous la forme d'une mono-couche. Ces conditions sont approchées lorsqu'on dépose 25 μ L de thylakoides à une concentration de 1,2 mg de chlorophylle/mL. Après 45 minutes d'adaptation à l'obscurité, l'échantillon est éclairé à température ambiante par un flash au xénon (PerkinElmer Optoelectronics), dont l'intensité est saturante. Le signal direct obtenu est enregistré par un oscilloscope numérique.

b) *Analyse des données : émission d'oxygène sur une séquence de flashes*

Cette analyse a été développée par Lavorel¹⁴⁹. Le signal direct est enregistré, puis la dérivée en fonction du temps est calculée mathématiquement. Pour le calcul de la dérivée, on choisit un intervalle de temps de 10 ms (dt) pour les échantillons au calcium et un intervalle de 20 ms pour les échantillons au strontium étant donné que la vitesse d'émission d'oxygène est ralentie. Ensuite, l'amplitude du signal dérivé est représentée en fonction du nombre de

flashes. La dérivée est proportionnelle à la quantité d'O₂ émis à condition que la vitesse ne varie pas.

L'analyse des séquences est basée sur les deux équations suivantes en émettant l'hypothèse que les valeurs de α (manques) et β (doubles coups) sont identiques pour les transitions $S_1 \rightarrow S_2$, $S_2 \rightarrow S_3$, $S_3 \rightarrow S_0$ et $S_0 \rightarrow S_1$. Les manques correspondent aux centres qui ne peuvent pas avancer dans l'état S_{n+1} après un flash alors qu'ils se trouvent dans l'état S_n . Les doubles coups caractérisent les centres qui passent de l'état S_n à S_{n+2} après un flash. Des résultats publiés en 2008 ont d'ailleurs montré que cette hypothèse tend à se vérifier¹⁵⁰.

(1) $[O_2]_n = (1 - \alpha)[S_3]_{n-1} + \beta[S_2]_{n-1}$ où $[O_2]_n$ est le pourcentage de centres qui dégagent de l'O₂ après le flash n, et $[S_3]_{n-1}$ et $[S_2]_{n-1}$ sont les quantités de S_3 et S_2 avant le flash n,

(2) $S_i(n) = \alpha S_i(n-1) + (1 - \alpha - \beta)S_{i-1}(n-1) + \beta S_{i-2}(n-1)$

Le paramètre β n'est pas nul du fait de la longueur du flash électronique.

Un facteur multiplicatif des valeurs expérimentales a été introduit dans la procédure de simulation. En effet, on mesure une valeur arbitraire à l'oscilloscope. On fait ensuite correspondre à cette valeur un pourcentage de centres, tel que la somme des centres dans chacun des états S soit égal à 100% après chaque flash.

c) Analyse des données : vitesse d'émission d'oxygène

Le signal ampérométrique obtenu se décompose en deux phases après le flash : une phase de montée correspondant à l'émission d'oxygène, et une phase de déclin correspondant à la consommation de l'oxygène par l'électrode de platine.

Comme démontré par Lavorel¹⁴⁹ qui a théorisé ce type d'expérience, le signal ampérométrique de dégagement d'oxygène est le produit de convolution de la vitesse de dégagement d'oxygène $\Phi(t)$, dans le cas d'une émission instantanée d'une monocouche de thylakoides sur l'électrode, et de la vitesse de dégagement d'oxygène par le PSII pendant la transition $S_3Tyr_Z \cdot$ à S_0Tyr_Z (k_{ox}).

La fonction $\Phi(t)$ est donnée par l'équation suivante :
$$\Phi(t) = \frac{\sqrt{t_d}}{\sqrt{\pi} \times t^3} \times \exp\left(-\frac{t_d}{t}\right)$$

dans laquelle t_d est le temps de diffusion qui est une constante expérimentale correspondant au temps de réponse de l'électrode.

La vitesse de dégagement d'oxygène par le PSII pendant la transition $S_3Tyr_Z \cdot$ à S_0Tyr_Z est :

$$\frac{dO_2}{dt} = k_{ox} \times \exp(-k_{ox} \times t)$$

Le produit de convolution devient :

$$S_i = k_{ox} \times inc \times \sum_{j=0}^i (\Phi_j \times \exp(-k_{ox} \times inc \times (i - j)))$$

Dans lequel S_i est le signal ampérométrique au temps “ $inc \times i$ ” (“ inc ” est l’incrément de temps et “ i ” est l’intervalle de l’intégrale). “ Φ_j ” est la valeur de la fonction $\Phi(t)$ à l’étape “ $j = i$ ”.

4) Thermoluminescence

a) Principe

La thermoluminescence¹⁵¹ consiste à mesurer une émission de lumière provoquée par un chauffage de l’échantillon. L’émission de lumière intervient à une température caractéristique, qui dépend de l’état d’énergie de l’échantillon considéré.

Dans le photosystème II, la thermoluminescence provient de la recombinaison de charge entre la charge positive localisée sur le cluster de Mn_4Ca et l’électron stocké sur la quinone Q_B . Il existe en théorie une multitude de recombinaisons possibles entre les différents états de séparation de charges. Cependant, seules trois recombinaisons ont lieu à une vitesse significative. Elles sont schématisées Figure 35.

Seule une de ces recombinaisons est radiative, donnant lieu à la formation d’une chlorophylle excitée, source de luminescence. Les deux autres voies sont non radiatives. L’une est appelée « voie directe », avec Q_A^- comme source d’électrons, cette recombinaison a lieu quelle que soit la température et ne nécessite pas d’activation. La troisième voie de recombinaison est la « voie indirecte » où $Pheo^-$ fournit l’électron.

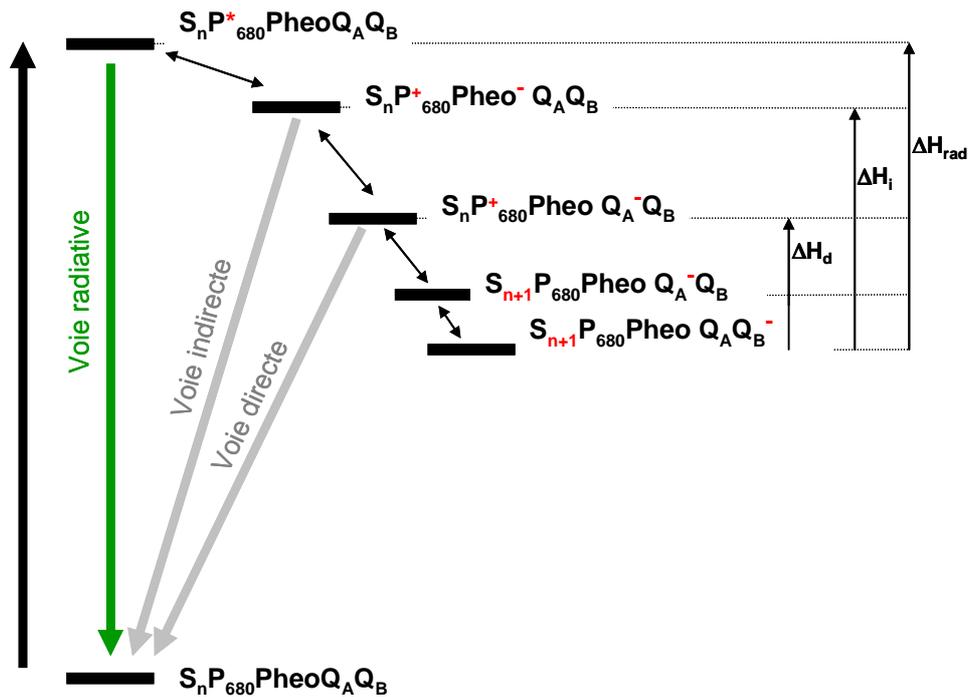


Figure 35 : Schéma représentant les recombinaisons possibles entre les différents états de séparation de charges. Seule la voie radiative donne lieu à une émission de thermoluminescence. Les voies directes et indirectes sont non radiatives.

La température de recombinaison dépend en partie du potentiel redox des cofacteurs impliqués dans le processus de recombinaison, c'est-à-dire le potentiel redox des couples S_{n+1}/S_n , $\text{Tyr}_Z^{\bullet}/\text{Tyr}_Z$, $P_{680}^{\bullet+}/P_{680}$, $\text{Pheo}_{D1}^{\bullet}/\text{Pheo}_{D1}$, Q_A^{\bullet}/Q_A et Q_B^{\bullet}/Q_B . Si on avance l'hypothèse en première approximation que les échanges $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ et Cl^-/Br^- ne modifient pas significativement ni les potentiels redox des couples $P_{680}^{\bullet+}/P_{680}$, $\text{Pheo}_{D1}^{\bullet}/\text{Pheo}_{D1}$, Q_A^{\bullet}/Q_A et Q_B^{\bullet}/Q_B , ni la proportion de Q_B^{\bullet} présente dans les échantillons adaptés à l'obscurité, alors les changements observés en thermoluminescence correspondent aux changements des propriétés redox du couple S_{n+1}/S_n .

b) Matériel

Les courbes de thermoluminescence sont mesurées sur une machine construite au laboratoire¹⁵² (Figure 36).

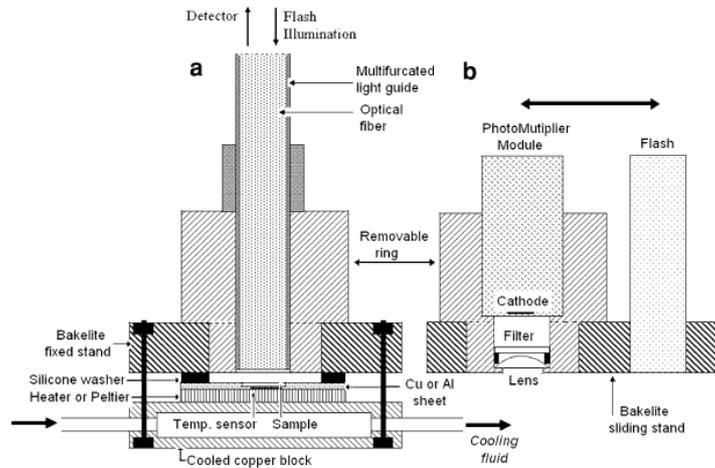


Figure 36 : Montage expérimental de thermoluminescence (tiré de référence 153). Deux montages sont présentés ici : a) pour les échantillons émettant beaucoup de thermoluminescence (feuilles) et b) pour les échantillons émettant peu (montage utilisé ici). Dans ce cas, un photomultiplicateur permet d'améliorer le signal. Le système de régulation de température représenté en a) en bas de l'image est le même pour les deux montages. Le liquide de refroidissement est de l'azote liquide dans le cas de nos mesures à basse température. La double flèche indique un glissement de l'élément supérieur qui permet de placer alternativement le flash et le détecteur en face de l'échantillon.

Les échantillons de PSII ont été dilués à une concentration de $10 \mu\text{g}$ de chlorophylle. mL^{-1} et ceux de thylakoides à une concentration de $50 \mu\text{g}$ de chlorophylle. mL^{-1} . Nous avons réalisé deux types de mesures : des mesures d'émission de thermoluminescence pour connaître la température de recombinaison, et des mesures de température de blocage des transitions $S_i \rightarrow S_{i+1}$ en utilisant comme sondes les pics d'émission de S_2 et S_3 . Pour les mesures d'émission de thermoluminescence, le protocole est schématisé dans la Figure 37.

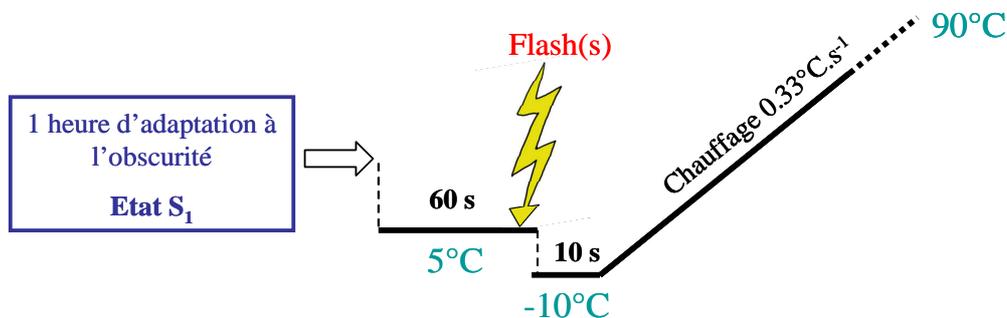


Figure 37 : Protocole de mesure des émissions de thermoluminescence. Après une heure d'adaptation à l'obscurité, l'échantillon est illuminé par des flashes saturants au xénon (PerkinElmer Optoelectronics) à 5°C , puis congelé à -10°C en 5 secondes. Après 10 secondes supplémentaires à l'obscurité, les échantillons congelés sont chauffés à la vitesse de $0,33^\circ\text{C/s}$. Les états S_2 et S_3 sont considérés comme stables avant l'étape de chauffe.

Pour l'étude des températures de blocage des transitions S_2 à S_3 et S_3 à S_0 , l'échantillon adapté à l'obscurité est flashé une ou deux fois à 5°C selon que l'on souhaite atteindre l'état S_2 ou S_3 , congelé et flashé à la température désirée, puis réchauffé à -10°C en 10 secondes avant de subir la rampe de température.

c) Analyse des données

Concernant la thermoluminescence, deux théories ont été avancées. La première, la plus simple est celle de Randall-Wilkins dont J.M. Ducruet a fait un traitement numérique¹⁵⁴. Elle est basée sur l'hypothèse que la voie prédominante de recombinaison est la voie radiative. Or ce n'est pas le cas : il a été montré par le groupe de Van Gorkom que la voie radiative ne représentait que 3% des processus de recombinaison¹⁵⁵. La voie directe représente 15-20%^{156,157} et la voie indirecte est majoritaire : environ 80-85%. La seconde théorie a été avancée par Rappaport¹⁵⁸. Cette dernière est plus complète que celle de Randall-Wilkins car elle tient compte des différentes voies de recombinaison qui sont en compétition avec la voie radiative (Figure 38).

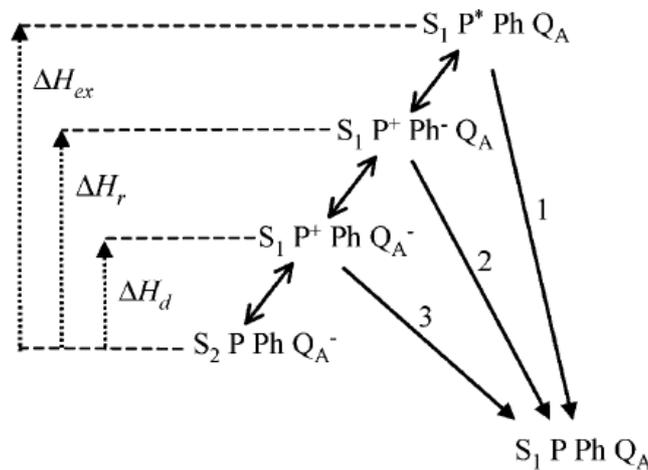


Figure 38 : Voies possibles de recombinaison depuis l'état $S_2 Q_A^-$ dans le PSII. La voie 1 est la voie radiative. Son enthalpie d'activation est ΔH_{ex} . La voie 2 est la voie de recombinaison prédominante (indirecte) avec une enthalpie d'activation ΔH_r . La voie 3 est la voie directe, avec une enthalpie d'activation ΔH_d . Elle est normalement négligeable par rapport à la voie 2.

La théorie de Rappaport est très difficile à appliquer pour simuler les courbes expérimentales de thermoluminescence car elle demande de connaître chacune des énergies d'activation mises en jeu.

Nous avons donc dans un premier temps essayé de baser l'analyse de nos données sur la théorie de Randall-Wikins. Les courbes de thermoluminescence provenant des recombinaisons de charges $S_2Q_B^-$ et $S_3Q_B^-$ peuvent être simulées par une méthode numérique développée par Ducruet¹⁵⁴. Cette méthode repose sur l'équation d'Arrhenius-Eyring et consiste à calculer itérativement pour chaque étape de la mesure à la température T(K), la luminescence L(t) émise pendant l'intervalle Δt .

$$L(T) = N \cdot s \cdot T \cdot \Delta t \cdot e^{-\frac{E_a}{k_B \cdot T}}$$

N est le nombre de paires de charges capables de recombinaison à la température T considérée, il décroît de L(T) à chaque étape. N_0 , le nombre de paires de charges initial, correspond à l'aire de la bande de thermoluminescence, E_a est l'énergie d'activation (enthalpie) et k_B la constante de Boltzmann. S est le facteur préexponentiel.

L'analyse des courbes nous fournit trois paramètres caractéristiques des bandes de thermoluminescence : l'aire intégrée (N_0), l'énergie d'activation apparente (E_a) et le facteur préexponentiel (s). Ces trois paramètres ont été calculés pour les bandes $S_2Q_B^-$ produites après un flash. Pour les courbes correspondant à $S_3Q_B^-$, les paramètres E_a et S de la composante $S_2Q_B^-$ déduits sont bloqués, la valeur de N_0 est calculée et imposée d'après le pourcentage de manques et la valeur du ratio S_0/S_1 à l'obscurité, une deuxième composante $S_3Q_B^-$ est créée et le signal total est simulé.

Nous avons supposé que seul le niveau d'énergie du cluster de Mn_4Ca était modifié par les échanges Ca^{2+}/Sr^{2+} et Cl^-/Br^- , ce qui est une grande simplification car nous savons que l'échange Ca^{2+}/Sr^{2+} affecte au moins l'équilibre $Q_A Q_B^{\bullet} \leftrightarrow Q_A^{\bullet} Q_B$ ⁸⁴. Nous montrerons dans les résultats que cette méthode est trop simplifiée pour donner une estimation exacte de la variation du potentiel redox.

5) Spectroscopie de changements d'absorption UV-visible

a) Méthode : matériel et intérêt

Les changements d'absorption sont mesurés sur un spectrophotomètre de type Joliot¹⁵⁹. L'échantillon est éclairé par deux lasers : un laser qui produit des flashes détecteurs pour mesurer les différences d'absorption entre une cuve de mesure et une cuve de référence, et un laser actinique pour exciter l'échantillon de Photosystème II. Les flashes détecteurs sont fournis par un laser Nd :YAG triplé qui produit des flashes monochromatiques (355 nm) d'une

durée de 6 ns et injecté dans un OPO qui permet d'obtenir des flashes dont la longueur d'onde varie de l'UV jusqu'au vert. Un laser à colorant pompé par un laser Nd:YAG doublé en fréquence produit les flashes actiniques à 685 nm, longueur d'onde à laquelle est excitée la chlorophylle du PSII. L'échantillon de PSII est déposé dans les cuves à une concentration en chlorophylle de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Après une heure d'adaptation à l'obscurité à température de la pièce, l'accepteur d'électrons est ajouté : 0,1 mM de PPBQ dissous dans du diméthylsulfoxyde. Le montage est schématisé dans la Figure 39.

L'échantillon de PSII est présent à la fois dans la cuve de référence et dans la cuve de mesure, et seule la cuve de mesure est éclairée par le flash actinique.

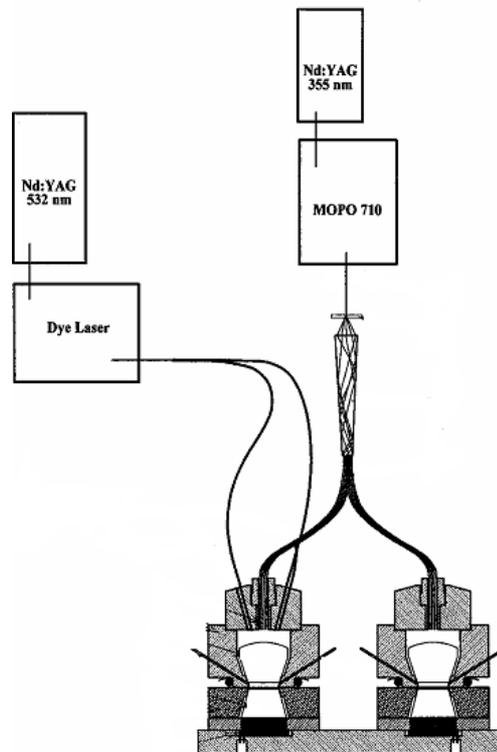


Figure 39 : Schéma du spectrophotomètre Joliot. A gauche, la cuve de mesure et à droite qui est illuminée par les deux lasers, la cuve de référence qui est illuminée seulement par le laser détecteur.

La difficulté lorsqu'on étudie des processus photochimiques par spectroscopie optique est d'utiliser une source analytique qui ne soit pas actinique pour l'échantillon. Dans les montages habituels, les changements d'absorptions sont analysés par une source lumineuse continue d'intensité faible, pour éviter les réactions photochimiques annexes. Le rapport signal sur bruit est proportionnel à la racine carrée du nombre de photons transmis, d'où la sensibilité limitée de ce type de mesure. Sur le spectrophotomètre Joliot, les changements d'absorptions sont analysés par des flashes monochromatiques courts. L'énergie lumineuse totale reçue par l'échantillon n'est pas plus grande que dans le cas d'une faible lumière

continue, mais le rapport signal sur bruit est grandement amélioré du fait du grand nombre de photons envoyés pendant un intervalle de temps réduit.

On ne peut éviter des fluctuations dans l'énergie des flashes détecteurs, c'est pourquoi une partie de la lumière incidente est déviée à chaque flash vers une cellule de référence. On peut ainsi éliminer les variations d'intensité dues au flash détecteur.

On réalise deux types de mesures : des mesures de la variation du signal en fonction du cycle des états S_n sous forme d'oscillations, et des mesures en fonction du temps pour connaître les cinétiques de changements d'absorption.

b) Simulation des oscillations

On réalise une simulation des oscillations pour extraire les valeurs des coefficients d'extinction. Pour calculer les deux paramètres α (manques) et β (doubles coups) sans connaître les valeurs des coefficients d'extinction, nous avons utilisé les expressions suivantes^{160,161} :

$$[\mathbf{S1}] (Y_{i+4}-Y_i) - \sigma_1(Y_{i+3}-Y_i) + \sigma_2(Y_{i+2}-Y_i) - \sigma_3(Y_{i+1}-Y_i) = 0$$

$$[\mathbf{S2}] \sigma_1 = 4\alpha$$

$$[\mathbf{S3}] \sigma_2 = 6\alpha^2 - 2\beta^2$$

$$[\mathbf{S4}] \sigma_3 = 4[\alpha^3 - \alpha\beta^2 + \beta(1-\alpha-\beta)^2]$$

Y_i désigne les valeurs $\Delta I/I$ mesurées à chaque flash i de la séquence.

Les valeurs de α et β sont calculées d'après ces équations en minimisant la valeur de l'équation [S1] à chaque flash, en utilisant le solveur d'Excel.

Pour calculer les valeurs des trois coefficients d'extinction $\Delta\epsilon_0$, $\Delta\epsilon_1$, $\Delta\epsilon_2$ (correspondant aux transitions $S_0 \rightarrow S_1$, $S_1 \rightarrow S_2$ and $S_2 \rightarrow S_3$), on utilise la méthode développée par Lavergne¹⁶¹.

On peut calculer la proportion de centres dans l'état S_i après le flash n qui est donné par la formule :

$$S_i(n) = \alpha S_i(n-1) + (1 - \alpha - \beta) S_{i-1}(n-1) + \beta S_{i-2}(n-1)$$

On utilise les valeurs de α et β déterminées grâce aux équations [S1] à [S4].

On calcule ensuite le poids de chaque transition :

$$[\mathbf{S5}] T_0(i) = S_0(i-1) - S_0(i)$$

$$[\mathbf{S6}] T_1(i) = T_0(i) + S_1(i-1) - S_1(i)$$

$$[\mathbf{S7}] T_2(i) = T_1(i) + S_2(i-1) - S_2(i)$$

Puis la valeur théorique $\Delta I/I$ pour chaque flash de la séquence, en imposant au départ des valeurs arbitraires pour $\Delta\epsilon_0$, $\Delta\epsilon_1$, $\Delta\epsilon_2$.

$$(\Delta I / I)(i) = \sum_{i=0}^2 \Delta\epsilon_i T_n(i)$$

Avec le solveur d'Excel, on ajuste au mieux les valeurs $\Delta I/I$ théoriques aux valeurs expérimentales, en faisant varier les trois coefficients $\Delta\epsilon_0$, $\Delta\epsilon_1$, $\Delta\epsilon_2$, et les proportions S_0 et S_1 . Les données obtenues au premier flash ne sont pas incluses dans la procédure, du fait d'un signal supplémentaire correspondant à des centres « inactifs »¹⁶¹. Ces centres ne transfèrent pas d'électrons à la quinone Q_B . Ce phénomène a été observé uniquement en mesure d'absorption et reste encore aujourd'hui difficile à expliquer.

6) Résonance Paramagnétique Electronique

a) Principe

La résonance paramagnétique électronique (RPE) est une spectroscopie d'absorption basée sur l'interaction entre les moments magnétiques associés aux électrons présents dans la matière et une onde électromagnétique. La gamme de fréquence électromagnétique utilisée en RPE va de 1 à 500 GHz. Sur un spectromètre classique de bande X, la fréquence électromagnétique est de 9,4 GHz.

Un électron a un spin, qui lui confère un moment magnétique. Placés dans un champ magnétique externe, les moments magnétiques peuvent s'orienter dans une direction soit parallèle soit antiparallèle à la direction du champ magnétique, comme représenté sur la Figure 40. Ceci crée deux niveaux d'énergie distincts pour les électrons. En présence de champ magnétique, il y aura plus d'électrons dans le niveau d'énergie le plus bas (c'est à dire parallèles au champ) que dans le niveau supérieur. Une irradiation micro-ondes de fréquence fixe est utilisée pour exciter des électrons du plus bas niveau d'énergie vers le plus élevé. Pour que la transition ait lieu, un champ magnétique externe est appliqué pour que la différence de niveaux d'énergie entre les deux états soit égale à $h\nu$, l'énergie associée à la fréquence micro-ondes. Pour atteindre cette condition, le champ magnétique externe est balayé tout en exposant l'échantillon à une fréquence micro-ondes fixe. Une fois la condition atteinte, il y a absorption de l'énergie : c'est la condition de résonance.

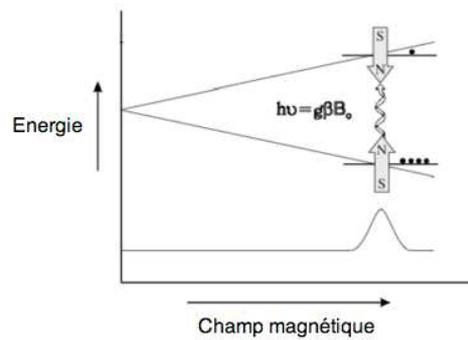


Figure 40 : Principe de base de la RPE. L'irradiation micro-ondes excite un électron jusqu'au niveau d'énergie supérieur. Le champ magnétique B_0 est balayé jusqu'à atteindre la condition de résonance indiquée par l'équation (β désigne le magnéton de Bohr, g le facteur de Landé).

La RPE est un moyen d'investigation des systèmes paramagnétiques, c'est-à-dire ayant des électrons non appariés tels que les métaux de transition, les radicaux, etc...

Les renseignements fournis par la RPE concernent la structure électronique et géométrique des systèmes étudiés, leur comportement dynamique, les mécanismes de réaction, etc...

b) Protocole

Les spectres de RPE continue sont réalisés sur un spectromètre de bande X Bruker Eleksys 500 équipé d'un résonateur bande X standard ER 4102 (Bruker) et d'un cryostat Oxford Instruments (ESR 900). La fréquence des micro-ondes est de 9,4 GHz.

Nous réalisons des expériences soit à température ambiante dans des cellules plates, en éclairant la cellule contenant l'échantillon directement dans la cavité de la machine RPE, soit à basse température dans des tubes de 3 mm de diamètre en éclairant en-dehors de la cavité, puis en congelant et en réinsérant le tube dans la cavité après éclairage.

Dans le cas d'illumination par flashes à température ambiante, ils sont fournis par un laser Nd :YAG (532 nm, 550 mJ, 8 ns Spectra Physics GCR-230-10).

Environ 150 μL d'échantillon de PSII à environ 1 mg de Chl. mL^{-1} sont introduits dans le noir dans des tubes RPE en quartz, puis adaptés à l'obscurité pendant une heure à température ambiante. Nous utilisons cette concentration pour que le flash soit saturant. Ensuite, les échantillons sont synchronisés en S_1 , si nécessaire, par un préflash à température ambiante. Après une nouvelle période d'adaptation à l'obscurité d'une heure, 0,5 mM de PPBQ sont ajoutés dans le tube, comme accepteur d'électrons. Les échantillons sont ensuite

congelés à 198 K puis transférés à 77 K. Avant la mesure, les échantillons sont dégazés à 198 K.

Le préflash est utilisé pour synchroniser les centres dans l'état $S_1\text{Tyr}_D^\bullet$. Cette procédure consiste en une adaptation à l'obscurité à température ambiante durant 1 heure, puis un flash à température ambiante, puis à nouveau 1 heure à l'obscurité à température ambiante. Les centres présents soit dans l'état $S_0\text{Tyr}_D^\bullet$, soit dans $S_1\text{Tyr}_D$ (après une heure à l'obscurité à température ambiante), ce qui représente 25 % des centres au total¹⁶², sont convertis en $S_1\text{Tyr}_D^\bullet$ et $S_2\text{Tyr}_D$, par le préflash. Les centres en $S_1\text{Tyr}_D^\bullet$ sont stables, alors que les centres en $S_2\text{Tyr}_D$ sont rapidement convertis vers l'état $S_1\text{Tyr}_D^\bullet$ durant l'adaptation à l'obscurité après le flash. Les centres présents dans l'état $S_1\text{Tyr}_D^\bullet$ depuis le début (75%) sont convertis en $S_2\text{Tyr}_D^\bullet$ avec le flash. En absence d'un accepteur d'électrons externe, S_2 est ré-converti en S_1 durant l'adaptation à l'obscurité, principalement par recombinaison avec l'électron présent sur Q_B^{-163} . Cette procédure de préflash est donc utile pour convertir tous les centres dans l'état $S_1\text{Tyr}_D^\bullet$.

Pour la mesure de la formation de la tyrosine Tyr_Z^\bullet et son déclin à température ambiante, les échantillons ($[\text{Chl}] = 1\text{mg.mL}^{-1}$) sont introduits dans une cellule plate avec 0,5 mM PPBQ et illuminées directement dans la cavité RPE par un laser Nd :Yag (amplitude de modulation 4 G, puissance micro-ondes 20 mW, fréquence micro-ondes 9,4 GHz, constante de temps 0,32 ms). Le signal est enregistré à la position du champ où le signal Tyr_Z^\bullet est maximal. L'échantillon est soumis à une série de 64 flashes saturants et les traces enregistrées sont accumulées.

Chapitre III. ECHANGE BIOSYNTHETIQUE DES COFACTEURS

I) Introduction

Nous présentons ici les résultats obtenus après remplacement biosynthétique du Cl^- par le Br^- dans du PSII de *T. elongatus*, avec soit du Ca^{2+} , soit du Sr^{2+} dans le site actif. Des mesures enzymologiques et spectroscopiques ont été réalisées sur les quatre types d'échantillons Ca/Cl, Ca/Br, Sr/Cl et Sr/Br.

Nous cherchons à répondre aux questions suivantes : le chlorure est-il présent dans le PSII ? Est-il remplaçable par le bromure, en présence de calcium ou de strontium ? Quels sont les effets de ce remplacement ?

II) Résultats

1) Croissance des cellules

La capacité de croissance des cellules dans du milieu contenant du Sr^{2+} à la place de Ca^{2+} , et/ou du Br^- à la place du Cl^- a été testée en réalisant des courbes de croissance de *T. elongatus* dans les différentes conditions. La concentration des cellules a été estimée par mesure de la DO à 750 nm. La Figure 41 présente les résultats obtenus.

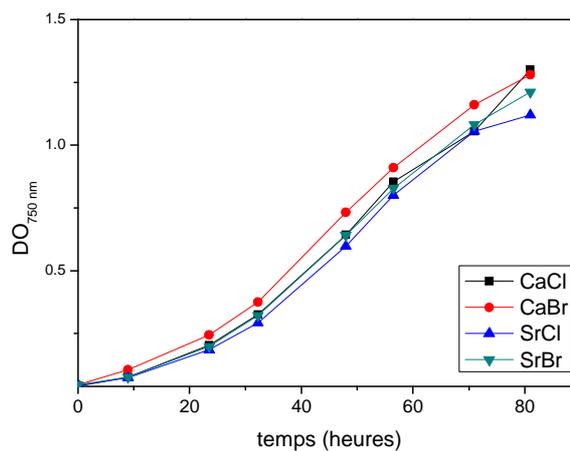


Figure 41 : Courbes de croissance de cellules *T. elongatus* $\Delta\text{psbA1-}\Delta\text{psbA2}$ cultivées dans du milieu DTN sans halogénure auquel on a ajouté 0,8 mM CaCl_2 , 0,8 mM CaBr_2 , 0,8 mM SrCl_2 ou 0,8 mM SrBr_2 .

Les cellules gardent presque la même capacité de croissance, quelle que soit la composition du milieu de culture. Ce résultat est en accord avec des résultats obtenus

auparavant sur des cellules *T. elongatus* qui exprimaient les trois gènes $psbA_i$ codant pour la protéine D1¹¹⁰. Il avait été montré que ces cellules poussées avec des sels de Sr^{2+} à la place de Ca^{2+} présentaient une vitesse de croissance similaire.

2) Purification enzymatique

Il a été montré précédemment au laboratoire¹¹⁰ que des cellules *T. elongatus* poussées en présence de Sr^{2+} à la place de Ca^{2+} incorporent un Sr^{2+} pour 4 ions Mn, et que le Sr^{2+} prend la place du Ca^{2+} . L'ion Sr^{2+} n'est ensuite plus échangeable quand on met l'échantillon dans une solution contenant du Ca^{2+} . Dans le cas du Br^- , l'échangeabilité avec du Cl^- est encore en discussion. Pour éviter tout échange Br^-/Cl^- lors de la purification et des mesures, les thylakoides et le PSII ont été repris dans une solution tampon contenant soit des sels de Cl^- pour les cellules poussées en présence de chlorure, soit des sels de Br^- pour les cellules poussées en présence de bromure. Nous obtenons ainsi quatre types de préparations de PSII ou thylakoides biosynthétiques : Ca/Cl, Ca/Br, Sr/Cl et Sr/Br.

3) Dégagement d'oxygène sous éclairage continu

a) Sur cellules entières

Nous avons commencé par mesurer l'activité sous éclairage continu des cellules poussées dans les quatre conditions différentes (Tableau 3).

Cellules	Activité ($\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg Chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Pourcentage d'activité
Ca/Cl	500	100
Ca/Br	450	90
Sr/Cl	300	60
Sr/Br	250	50

Tableau 3 : Dégagement d'oxygène sous éclairage continu des cellules entières *T. elongatus* $\Delta psbA1$ - $\Delta psbA2$. Les cellules ont été poussées durant 6 jours avant la mesure d'activité. Les cellules sont diluées dans du TP1 à 10 μg de chlorophylle/mL pour la mesure et 0,5 mM de DCBQ dilué dans du DMSO ont été ajoutés dans la cuve de mesure. La référence 100% correspond à l'activité de l'échantillon contrôle Ca/Cl. Chaque échantillon a été mesuré dans la solution tampon appropriée à savoir une solution contenant des sels de Cl^- pour les échantillons Ca/Cl et Sr/Cl et une solution contenant des sels de Br^- pour les échantillons Ca/Br et Sr/Br.

On observe une baisse d'activité des échantillons substitués, dans l'ordre suivant : Ca/Cl>Ca/Br>Sr/Cl>Sr/Br.

b) Sur PSII

Nous avons ensuite mesuré le dégagement d'oxygène sous éclairage continu des quatre types de PSII purifié. Les résultats sont présentés dans le Tableau 4.

PSII	Activité ($\mu\text{mol O}_2\text{.mg Chl}^{-1}\text{.h}^{-1}$)	Pourcentage d'activité
Ca/Cl	5000-6000	100
Ca/Br	3200-3600	60
Sr/Cl	1800-2600	40
Sr/Br	1500-2000	30

Tableau 4: Dégagement d'oxygène sous éclairage continu des échantillons de PSII purifié. Les cellules ont été purifiées selon le protocole décrit dans le chapitre II. Les échantillons de PSII sont dilués dans du TP1 à 5 μg de chlorophylle/mL pour la mesure et 0,5 mM de DCBQ dilué dans du DMSO ont été ajoutés dans la cuve de mesure. La référence 100% correspond à l'activité de l'échantillon contrôle Ca/Cl.

La baisse d'activité est toujours observée dans les échantillons substitués, et dans le même ordre que pour les cellules entières, à savoir : Ca/Cl>Ca/Br>Sr/Cl>Sr/Br, ce qui montre que les différences observées ici sont bien dues à la substitution et non au processus de purification qui aurait pu modifier les centres substitués.

Il a été montré que l'activité était maximale dans du PSII de *T. elongatus* pour un pH égal à 6,5¹⁶⁴. Nous avons vérifié que cela était toujours le cas après substitution des cofacteurs, en mesurant l'activité en fonction du pH de l'échantillon doublement substitué Sr/Br (Figure 42).

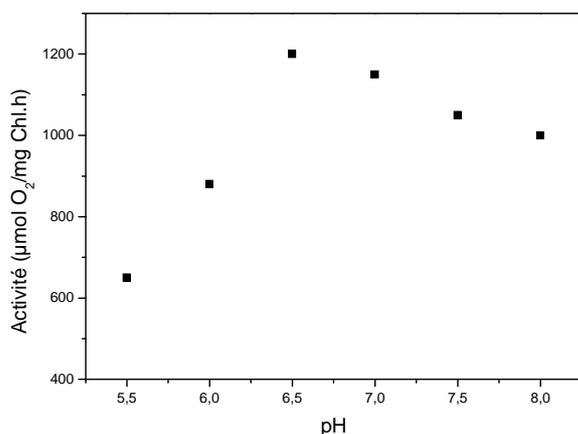


Figure 42 : Dégagement d'oxygène sous éclairage continu de PSII Sr/Br mesurée à différentes valeurs de pH. La mesure d'activité a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. En fonction du pH désiré, le MES a été remplacé par de l'HEPES dans la solution de TP1.

L'activité de l'échantillon de PSII Sr/Br varie sous la forme d'une courbe en cloche et est maximale à pH 6.5. La double substitution ne modifie donc pas la valeur du pH optimal pour l'activité du PSII sous éclairage continu. Nous verrons par la suite que le pH affecte certaines transitions $S_i \rightarrow S_{i+1}$ prises séparément (chapitre V).

La question que l'on se pose immédiatement est la suivante : pourquoi l'activité baisse-t-elle dans les échantillons substitués biosynthétiquement. L'enzymologie consiste à faire varier la quantité de substrat de l'enzyme pour pouvoir conclure sur la raison du ralentissement de l'activité par rapport à un échantillon contrôle : augmentation des manques, ralentissement de l'étape limitante ou présence de centres inactifs. Dans le cas du PSII, le substrat principal est l'eau dont on ne peut pas faire varier la concentration ou très peu, contrairement au deuxième substrat : la lumière.

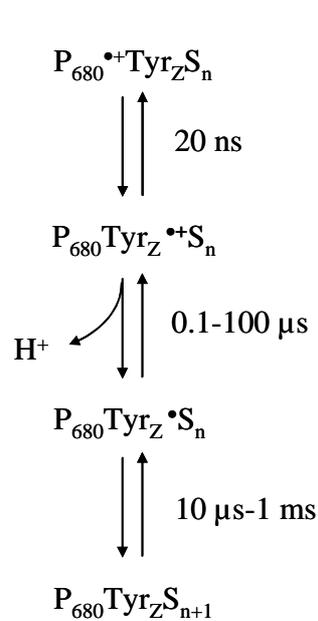
Deux cas extrêmes peuvent facilement être atteints en faisant varier la quantité de lumière : un cas où la concentration en substrat est maximale (mesure d'activité sous éclairage continu que nous avons déjà réalisée) et un cas correspondant à une concentration en substrat minimale. Ce deuxième cas correspond en réalité à un éclairage par flash car la quantité de lumière est alors extrêmement limitante : les centres ne peuvent avancer que d'une étape dans le cycle des états S_n à chaque flash. Nous allons donc maintenant étudier l'avancement du cycle sous éclairage par flash pour tenter d'expliquer la baisse d'activité des échantillons : est-ce une inhibition ou un ralentissement ?

Plusieurs méthodes spectroscopiques peuvent être combinées à un éclairage par flash : 1) La RPE, mais c'est une technique qui est longue à mettre en œuvre et très consommatrice en échantillons ; 2) L'oxymétrie résolue en temps, mais seule la transition S_3 à S_0 est observée ; 3) La mesure des changements d'absorption à des longueurs d'ondes spécifiques des cofacteurs du PSII, par laquelle nous avons choisi de débiter cette étude.

4) Changements d'absorption

a) Introduction

Nous pouvons suivre le cycle des états S par mesure des changements d'absorption d'un échantillon qui est soumis à une série de flashes saturants.



Après la formation de $P_{680}^{\bullet+}$ suite à l'absorption de la lumière, les changements d'absorption dans une échelle de temps de l'ordre de la dizaine de ns, correspondent au pur transfert d'électron entre la tyrosine Tyr_Z et $P_{680}^{\bullet+}$. Ce transfert est ensuite suivi par une phase de relaxation multiphasique qui correspond à une mise à l'équilibre du système. Après la réduction de $P_{680}^{\bullet+}$ par la tyrosine Z, la tyrosine Z donne un proton à une histidine voisine (L'ordre de cette réaction n'est pas clairement définie, il est possible que la déprotonation ait lieu avant l'oxydation de la tyrosine Z¹⁶⁵). Le radical Tyr_Z^{\bullet} formé oxyde le cluster de Mn_4Ca dans des temps qui varient selon l'état d'oxydation du cluster de Mn_4Ca . En attendant un temps suffisamment long, on peut suivre

uniquement $S_n \rightarrow S_{n+1}$.

b) Changements d'absorption à 292 nm

Pour choisir une longueur d'onde adaptée pour suivre les changements d'absorption associés au cluster de Mn_4Ca , nous nous sommes reportés aux spectres d'absorption associés à chaque transition $S_i \rightarrow S_{i+1}$ déterminés par J. Lavergne¹⁶¹ dans les plantes et aux spectres d'absorption des transporteurs d'électrons Q_A et Tyr_Z (Figure 43).

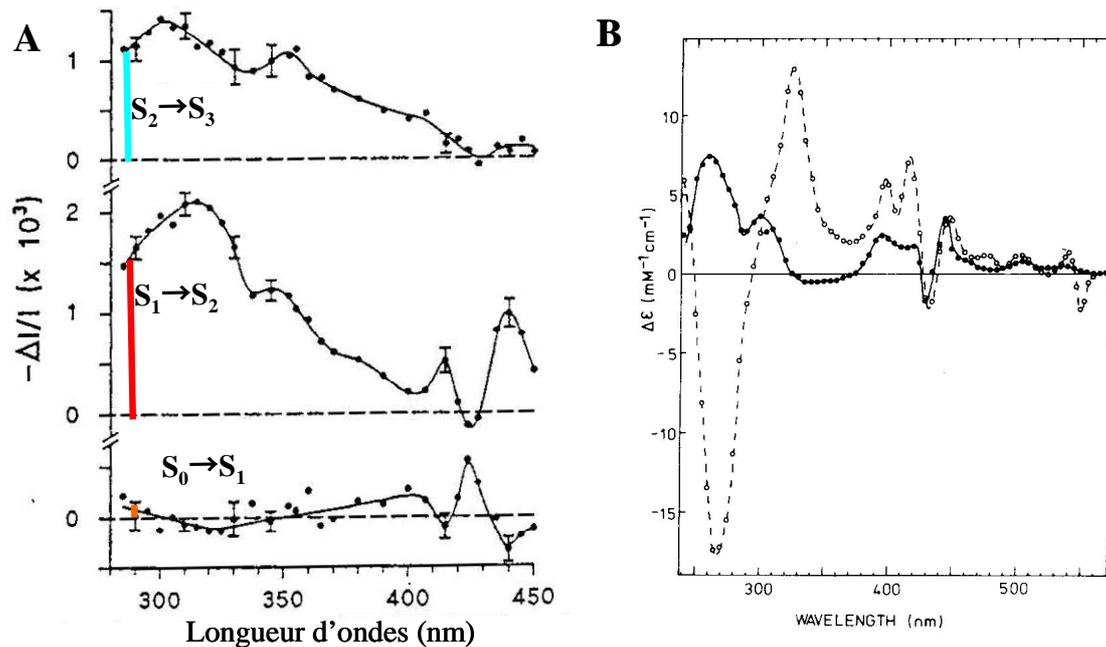


Figure 43 : A : Variations d'absorption dues à $S_i \rightarrow S_{i+1}$ dans du PSII de plante (référence 161). B : Spectres d'absorption de l'accepteur primaire Q_A (cercles vides) et du donneur secondaire Tyr_Z (cercles pleins) de préparations de PSII sans Mn. A 292 nm, la différence d'absorption ($Q_A^- - Q_A$) est nulle (référence 166).

Nous avons choisi de mesurer les changements d'absorption à 292 nm. On peut voir que le cluster de Mn_4Ca absorbe à cette longueur d'onde et que l'amplitude des changements d'absorption varie en fonction de la transition $S_i \rightarrow S_{i+1}$. Cette longueur d'onde est également un point isobeste pour Q_A^-/Q_A et pour l'accepteur d'électrons PPBQ, il n'y a donc aucune interférence avec le côté accepteur. On peut voir que la tyrosine Z absorbe dans cette région du spectre. Cependant, pour éviter sa contribution dans nos mesures, nous nous plaçons à un temps suffisamment long après le flash pour que la transition $S_i Tyr_Z \cdot \rightarrow S_{i+1} Tyr_Z$ soit terminée¹⁶⁷ (400 ms). Dans cette région, l'absorption dépend donc uniquement des états S du cluster de Mn_4Ca .

A chaque transition correspond un changement d'absorption avec un coefficient d'extinction $\Delta \epsilon$ différent (Figure 44 B). On peut représenter ensuite en fonction du nombre de flashes, l'amplitude de la différence de changement d'absorption entre l'état S_n considéré et l'état S_{n-1} , ce qui conduit à observer des oscillations de période 4, qui s'amortissent au fur-et-à-mesure des flashes du fait des paramètres α correspondant aux manques et β correspondant aux doubles coups (Figure 44 C)..

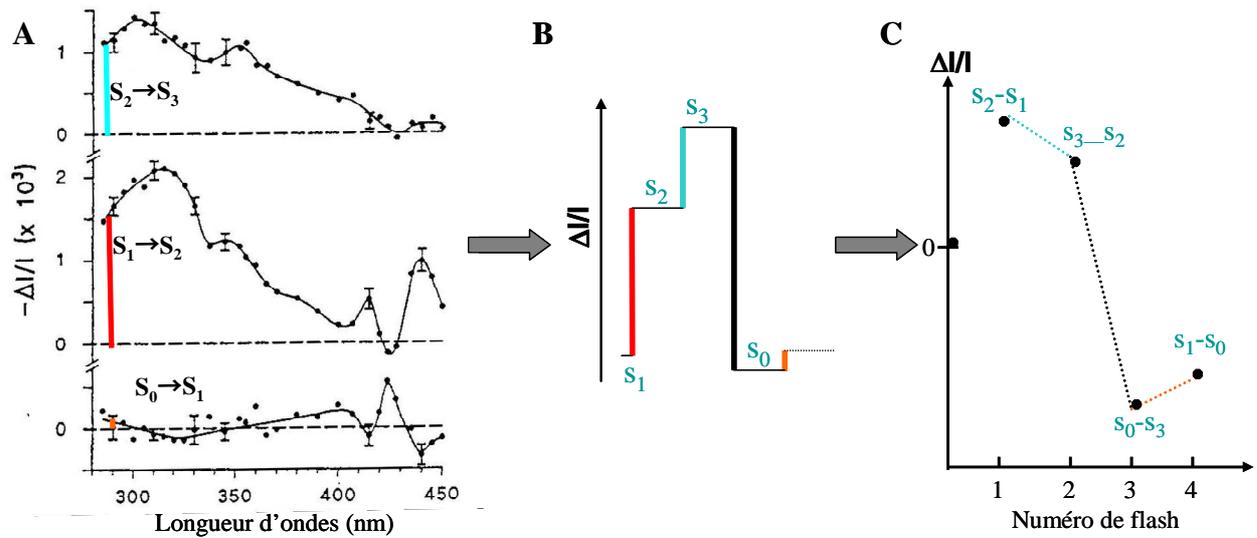


Figure 44 : Schéma explicatif des séquences d'amplitudes de changements d'absorption. A : Variations d'absorption dues à $S_i \rightarrow S_{i+1}$ (référence 161); B : Variations attendues à 292 nm après chaque flash ; C : représentation des différences de changements d'absorption à chaque flash.

La Figure 45 montre l'amplitude des changements d'absorption en fonction du nombre de flashes donnés aux échantillons adaptés à l'obscurité. L'adaptation à l'obscurité permet d'avoir la grande majorité des centres PSII dans l'état S_1 avant le premier flash.

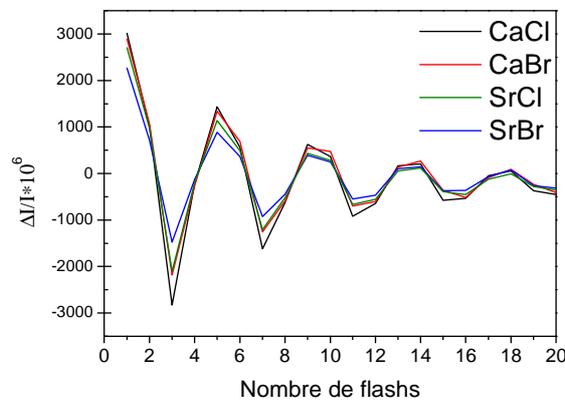


Figure 45 : Amplitude des changements d'absorption à 292 nm des quatre échantillons de PSII, au cours d'une série de flashes. Les mesures ont été faites durant une série de flashes saturants (séparés de 400 ms) donnés à des échantillons de PSII. Les échantillons (concentration en chlorophylle de 25 $\mu\text{g/mL}$) ont été adaptés durant 1 heure à température ambiante avant l'addition de 100 μM de PPBQ. Les mesures sont faites 400 ms après chaque flash, lorsque la réduction de la tyrosine Tyr_Z' est terminée.

Les oscillations de période 4 sont clairement visibles jusqu'au 20^{ème} flash dans les quatre échantillons. En utilisant la formule développée par Lavorel¹⁶⁰, nous avons pu déduire

des variations d'absorption observées après chaque flash les paramètres α (manques) et β (doubles coups). Les résultats sont présentés dans le Tableau 5.

PSII	α (%)	β (%)
Ca/Cl	9	4
Ca/Br	9	4
Sr/Cl	9	5
Sr/Br	8	4

Tableau 5 : Valeur des paramètres α (manques) et β (doubles coups) déduits de la simulation des séquences d'amplitude de changements d'absorption à 292 nm. La méthode est décrite dans le chapitre II.

Les valeurs de α et β déterminées dans les quatre types de PSII ne sont pas significativement différentes. Le paramètre β correspondant aux doubles coups a une valeur de 4-5 %, qui est dûe à un petit effet actinique du flash détecteur et non à de vrais doubles coups qui sont impossibles avec un laser nanoseconde. Le paramètre α correspondant aux manques est indépendant de la nature des cofacteurs.

En utilisant la méthode développée par Lavergne¹⁶¹ (cf. Chapitre II), nous avons réalisé la simulation des oscillations à 292 nm pour déterminer les valeurs des coefficients d'extinction $\Delta\epsilon_0$, $\Delta\epsilon_1$, $\Delta\epsilon_2$ à cette longueur d'onde (correspondant aux transitions $S_0 \rightarrow S_1$, $S_1 \rightarrow S_2$ and $S_2 \rightarrow S_3$). Nous avons réalisé une première simulation indépendante, c'est-à-dire en imposant des valeurs différentes de $\Delta\epsilon_0$, $\Delta\epsilon_1$ et $\Delta\epsilon_2$ pour les quatre types d'échantillons (Figure 46A), puis ensuite une simulation globale en imposant des valeurs identiques à chaque coefficient d'extinction $\Delta\epsilon_i$ pour les quatre échantillons (Figure 46B). Le paramètre S_0/S_1 qui correspond à la proportion de centres dans les états S_0 et S_1 dans l'échantillon adapté à l'obscurité est une variable pour chaque type d'échantillon.

	Simulation indépendante				Simulation globale			
	S_0/S_1 (%/%)	$\Delta\epsilon_0$	$\Delta\epsilon_1$	$\Delta\epsilon_2$	S_0/S_1 (%/%)	$\Delta\epsilon_0$	$\Delta\epsilon_1$	$\Delta\epsilon_2$
Ca/Cl	3/97	$0,6 \cdot 10^{-3}$	$2,4 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-3}$	0/100	$0,7 \cdot 10^{-3}$	$2,0 \cdot 10^{-3}$	$1,3 \cdot 10^{-3}$
Ca/Br	11/89	$0,6 \cdot 10^{-3}$	$2,2 \cdot 10^{-3}$	$1,3 \cdot 10^{-3}$	10/90			
Sr/Cl	9/91	$0,7 \cdot 10^{-3}$	$1,9 \cdot 10^{-3}$	$1,4 \cdot 10^{-3}$	9/91			
Sr/Br	23/77	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$1,4 \cdot 10^{-3}$	$0,8 \cdot 10^{-3}$	23/77			

Tableau 6 : Valeurs des paramètres S_0/S_1 et $\Delta\epsilon_i$ calculées dans les quatre types d'échantillons d'après la procédure de simulation décrite auparavant.

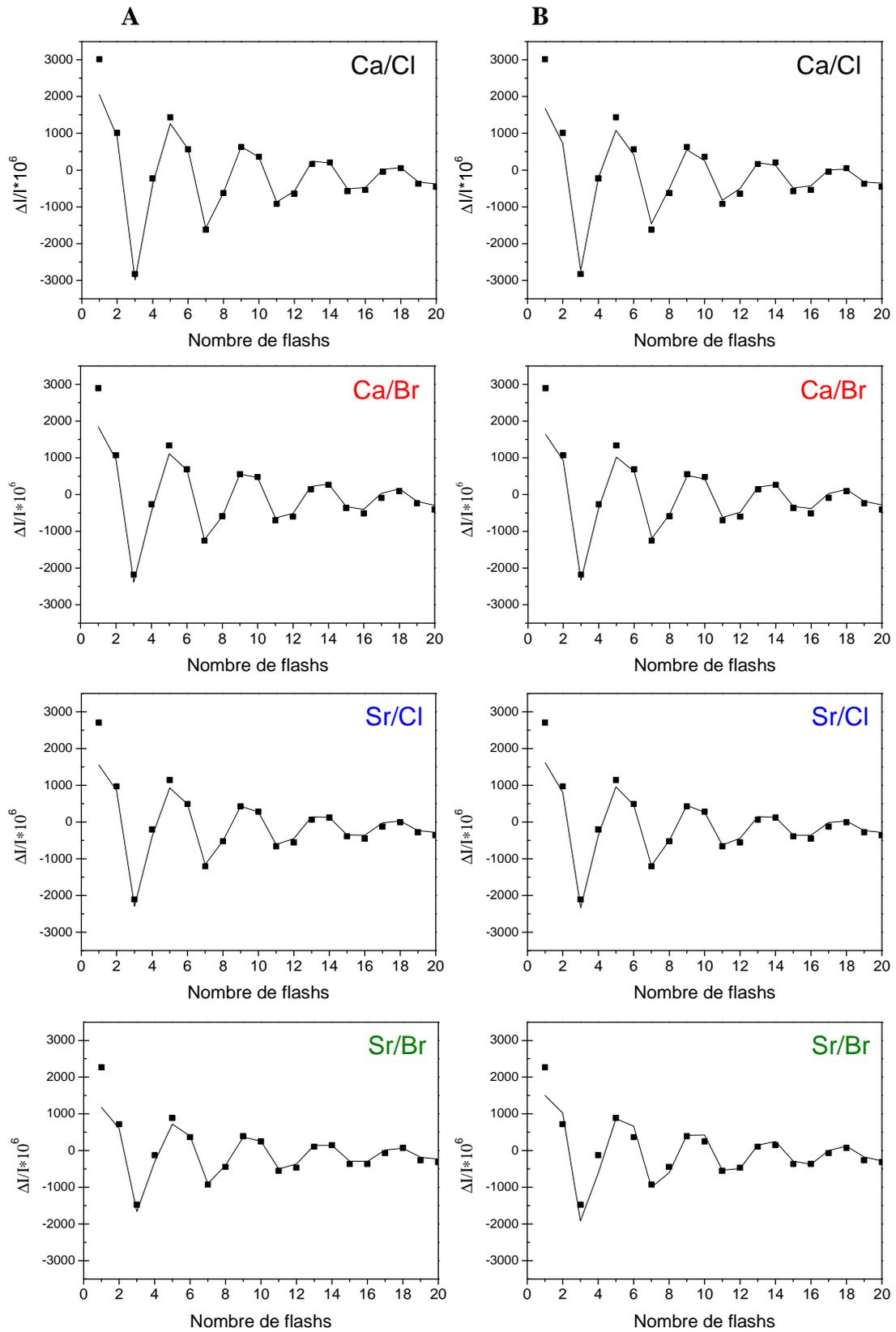


Figure 46 : Simulation des oscillations à 292 nm. Sur les graphes, les carrés correspondent aux points expérimentaux et les lignes à la simulation des données. Colonne A : simulation indépendante. Colonne B : simulation globale.

Les valeurs des coefficients d'extinctions sont relativement proches dans les deux procédures de simulation et également en accord avec les valeurs des coefficients d'extinction mesurées auparavant à cette longueur d'onde chez *T. elongatus*¹⁶⁸ et chez les plantes¹⁶¹. On considèrera par la suite les résultats de la simulation globale qui sont satisfaisants bien que le nombre de paramètres soit réduit par rapport à la simulation globale. Le fait que l'on puisse utiliser les mêmes valeurs de coefficient d'extinction pour les quatre échantillons indique : 1) l'absorption du cluster de Mn₄Ca n'est pas modifiée (à 292 nm) dans les échantillons où le Cl⁻ a été remplacé par le Br⁻ ou/et le Ca²⁺ par le Sr²⁺ ; 2) il n'y a pas de centres inactifs dans les échantillons modifiés car si par exemple 50% des centres étaient inactifs dans l'échantillon Sr/Br, alors l'amplitude des oscillations dans cet échantillon serait deux fois moins grande que pour l'échantillon Ca/Cl ; 3) la baisse d'activité sous éclairage continu dans les échantillons modifiés est donc due à un ralentissement d'une étape du cycle des états S, et non à la présence de centres inactifs dans les échantillons.

On peut noter également dans le Tableau 6 que la proportion de centres PSII dans l'état S₀ est plus grande après adaptation à l'obscurité pour l'échantillon Sr/Br. L'état appelé « S₀ » regroupe en réalité deux types de centres PSII : les centres dans l'état S₀Tyr_D[•] et les centres dans l'état S₁Tyr_D. La tyrosine D oxydée est capable d'oxyder S₀ en S₁ à l'obscurité à température ambiante. Il existe une technique qui permet de connaître la quantité de tyrosine D oxydée : la RPE. Pour savoir si la plus grande proportion de S₀ à l'obscurité chez Sr/Br est due majoritairement à l'existence de centres dans les états S₀Tyr_D[•] ou S₁Tyr_D, nous avons mesuré par RPE la quantité de Tyr_D[•] présente dans les échantillons adaptés à l'obscurité avant et après un préflash à température ambiante suivi d'une heure d'adaptation à l'obscurité à température ambiante (Figure 47). Les centres dans l'état S₀Tyr_D[•] avant le préflash passent dans l'état S₁Tyr_D[•] après le préflash, état stable à l'obscurité. Les centres dans l'état S₁Tyr_D avant le préflash passent dans l'état S₂Tyr_D, qui est reconverti en S₁Tyr_D[•] à l'obscurité. Si il y a une grande proportion de Tyr_D réduite dans les échantillons adaptés à l'obscurité, le signal Tyr_D[•] doit fortement augmenter après le préflash suivi de l'adaptation à l'obscurité.

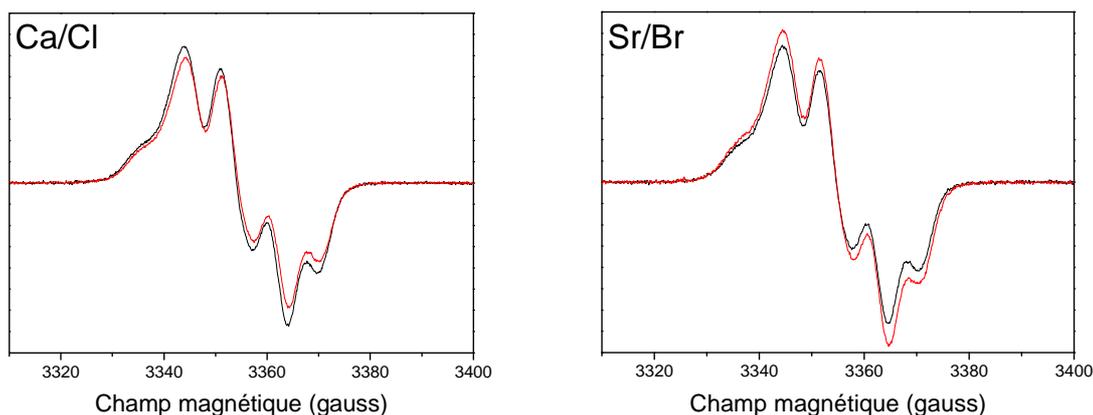


Figure 47 : Spectre RPE de Tyr_D• enregistré sur les échantillons de PSII Ca/Cl et Sr/Br. En noir le spectre avant préflash, et en rouge après le préflash suivi d'une adaptation à l'obscurité. Température : 8,5 K ; amplitude de modulation : 2,8 G ; puissance micro-ondes : 2 μW , fréquence micro-ondes : 9,4 GHz ; fréquence de modulation : 100 kHz.

On observe tout d'abord que le signal de l'échantillon Sr/Br est légèrement plus grand que celui de l'échantillon Ca/Cl. Cela peut venir d'une différence de concentration des échantillons. Néanmoins, cela a peu d'importance dans le cadre de cette expérience car nous nous attachons à comparer la taille du signal avant et après le préflash.

Le changement d'amplitude dû au préflash dans chaque échantillon est très faible et non significativement différent entre Ca/Cl et Sr/Br. On peut donc dire que l'apparente plus grande proportion de centres dans l'état appelé S₀ dans les échantillons Sr/Br adaptés à l'obscurité correspond à une plus grande proportion d'états S₀Tyr_D• que S₁Tyr_D.

Nous montrons ainsi par ces mesures de changements d'absorption par flash que la baisse d'activité du photosystème II sous éclairage continu suite à l'échange des cofacteurs est due à l'apparition d'une étape cinétiquement limitante. Nous allons maintenant chercher à savoir où se situe cette étape dans le processus de transfert d'électrons du côté donneur, depuis la réduction de la tyrosine Tyr_Z en une dizaine de ns jusqu'à l'oxydation du cluster de Mn₄Ca (environ 100 ms après le flash).

c) Cinétiques à 433 nm

Nous allons donc commencer par observer les cinétiques liées à la phase de relaxation multiphasique ayant lieu après le transfert d'électron pur entre la tyrosine Tyr_Z et P₆₈₀^{•+}. Pour suivre le déclin de P₆₈₀^{•+}, nous avons choisi la longueur d'onde 433 nm à laquelle l'oxydation

de P_{680} est associée à une bande de blanchiment importante. De plus, Q_A^- et Tyr_Z^\bullet absorbent très peu à cette longueur d'onde.

Ces cinétiques sont présentées Figure 48. Les panneaux A, B, C et D correspondent aux cinétiques enregistrées respectivement après 1, 2, 3 ou 4 flashes, c'est à dire montrant les transitions $P_{680}^{*+}Tyr_ZS_n \rightarrow P_{680}Tyr_Z^\bullet S_n$ dans chacun des états S_1, S_2, S_3 et S_0 .

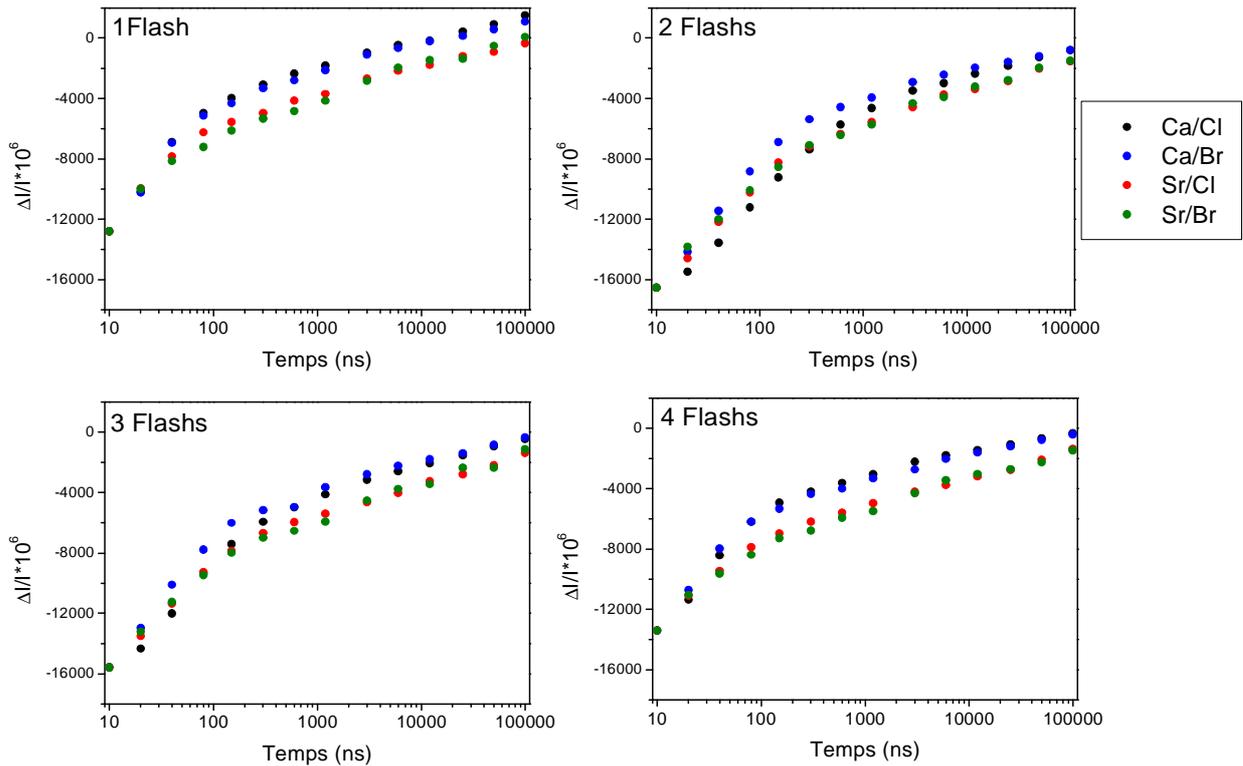


Figure 48 : Cinétiques de réduction de P_{680}^{*+} à 433 nm après 1, 2, 3 ou 4 flashes (Ca/Cl en noir, Ca/Br en bleu, Sr/Cl en rouge et Sr/Br en vert). Après adaptation à l'obscurité des échantillons ($Chl = 25 \mu g \cdot mL^{-1}$) durant 1 heure à température ambiante, $100 \mu M$ de PPBQ sont ajoutés. Ensuite, le(s) flash(s) est donné et le déclin de P_{680}^{*+} est suivi par une série de flashes détecteurs aux temps indiqués. Les quatre traces ont été normalisées à l'amplitude du signal observé pour le PSII Ca/Cl au temps le plus court.

On observe que les cinétiques de réduction de P_{680}^{*+} dans tous les états sont non significativement modifiées pour les quatre échantillons dans une échelle de temps de 10 à 20 ns. Ceci nous montre que le pur transfert d'électron entre la tyrosine Tyr_Z et P_{680}^{*+} n'est pas modifié significativement par les échanges Ca^{2+}/Sr^{2+} et Cl^-/Br^- . Par contre, de 0,1 à 100 μs , la réduction de P_{680}^{*+} par la tyrosine Z est ralentie par l'échange Ca^{2+}/Sr^{2+} , mais pas par l'échange Cl^-/Br^- , ceci est observé de façon très nette. Cette modification indique que

l'échange $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ affecte les phénomènes de relaxation associés à la réduction de $\text{P}_{680}^{*\bullet}$. Le calcium et non le chlorure, serait donc impliqué dans ces processus de relaxation.

Après l'oxydation de la tyrosine Tyr_Z par $\text{P}_{680}^{*\bullet}$ et le départ d'un proton, le radical Tyr_Z^\bullet oxyde le cluster de Mn_4Ca réduit. Pour observer les cinétiques liées à cette réduction, nous pouvons étudier soit les changements d'absorption liés à la tyrosine Tyr_Z , soit au cluster de Mn_4Ca . Nous avons choisi de mesurer les cinétiques d'absorption à 292 nm car c'est un point isobeste pour l'accepteur d'électrons.

d) Cinétiques à 292 nm

Nous avons mesuré les cinétiques de changement d'absorption à 292 nm, de 10 μs à une centaine de ms après chacun des 4 flashes donnés à l'échantillon adapté à l'obscurité (Figure 49). A cette longueur d'onde, comme mentionné auparavant, nous pouvons suivre les changements d'absorption liés au cluster de Mn_4Ca , et à la tyrosine Z durant les transitions $\text{S}_1\text{Tyr}_Z^\bullet \rightarrow \text{S}_2\text{Tyr}_Z$, $\text{S}_2\text{Tyr}_Z^\bullet \rightarrow \text{S}_3\text{Tyr}_Z$, $\text{S}_3\text{Tyr}_Z^\bullet \rightarrow \text{S}_0\text{Tyr}_Z$ et $\text{S}_0\text{Tyr}_Z^\bullet \rightarrow \text{S}_1\text{Tyr}_Z$.

À 292 nm, le spectre de différence ($\text{Tyr}_Z^\bullet - \text{Tyr}_Z$) étant environ deux fois plus petit que le spectre de la transition $\text{S}_1 \rightarrow \text{S}_2$ (Figure 43), on s'attend à observer une augmentation d'absorption durant la transition $\text{S}_1\text{Tyr}_Z^\bullet \rightarrow \text{S}_2\text{Tyr}_Z$. Le spectre de la transition $\text{S}_2 \rightarrow \text{S}_3$ est plus petit que celui de $\text{S}_1 \rightarrow \text{S}_2$, donc l'augmentation d'absorption sera moins importante, voire nulle. Le spectre de la transition $\text{S}_0 \rightarrow \text{S}_1$ est proche de 0. Ainsi, on s'attend à une baisse d'absorption lors de $\text{S}_0\text{Tyr}_Z^\bullet \rightarrow \text{S}_1\text{Tyr}_Z$, et enfin à une forte diminution lors de $\text{S}_3\text{Tyr}_Z^\bullet \rightarrow \text{S}_0\text{Tyr}_Z$ compensant l'augmentation d'absorption globale due aux transitions précédentes.

Les résultats des cinétiques sont présentés Figure 49. Le panneau A a été enregistré après un flash correspondant à la transition $\text{S}_1\text{Tyr}_Z^\bullet \rightarrow \text{S}_2\text{Tyr}_Z$, le panneau B après deux flashes correspondant à la transition $\text{S}_2\text{Tyr}_Z^\bullet \rightarrow \text{S}_3\text{Tyr}_Z$, le panneau C après trois flashes correspondant à $\text{S}_3\text{Tyr}_Z^\bullet \rightarrow \text{S}_0\text{Tyr}_Z$ et le panneau D après 4 flashes correspondant à $\text{S}_0\text{Tyr}_Z^\bullet \rightarrow \text{S}_1\text{Tyr}_Z$.

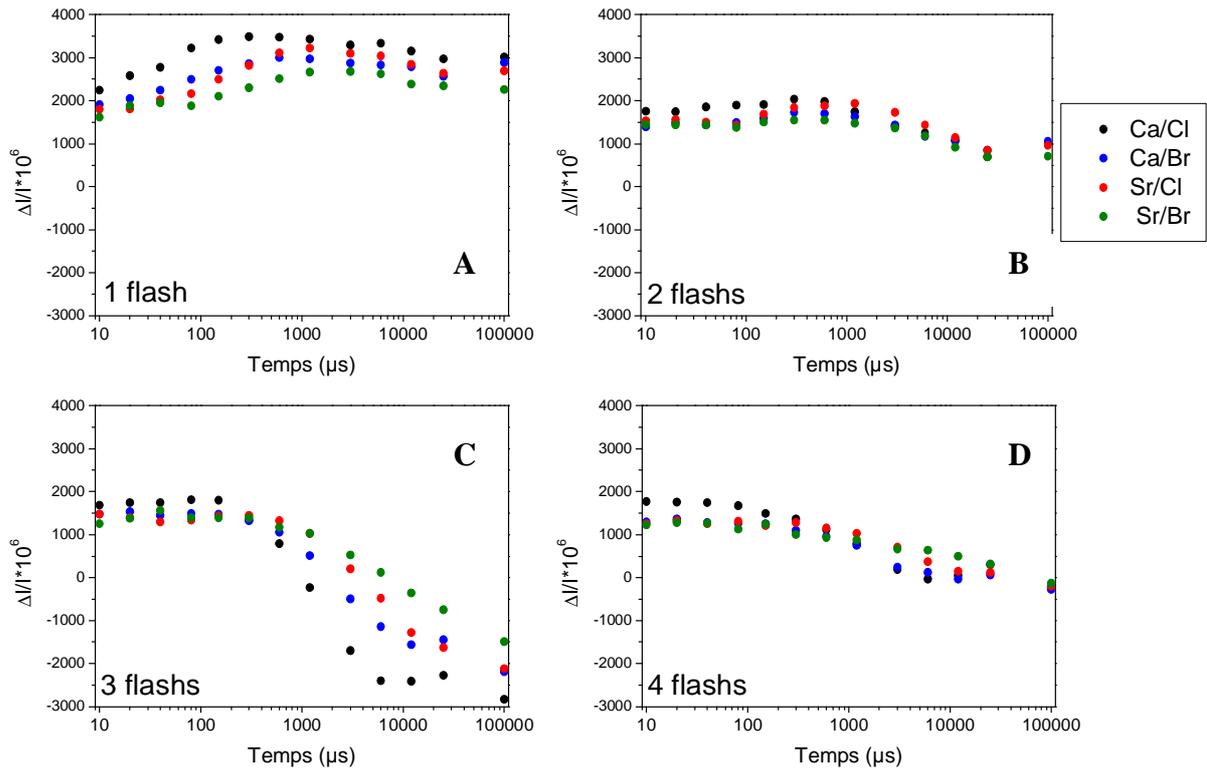


Figure 49 : Cinétiques des changements d'absorption à 292 nm après 1, 2, 3 ou 4 flashes. Après adaptation à l'obscurité des échantillons ($\text{Chl} = 25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) durant 1 heure à température ambiante, $100 \mu\text{M}$ de PPBQ sont ajoutés. Ensuite, le(s) flash(s) est donné et le changement d'absorption est suivi par une série de flashes détecteurs aux temps indiqués.

Après le premier flash, on observe pour l'échantillon Ca/Cl, une petite augmentation du signal. Dans les échantillons modifiés, cette transition est ralentie et ce de façon très significative dans l'échantillon Sr/Br.

Après le deuxième flash, on observe un très faible changement d'absorption car la variation liée à la transition S_2 à S_3 est totalement compensée par le déclin d'absorption correspondant à la réduction de la tyrosine Z, contrairement à la situation des autres flashes.

Au troisième flash, on observe deux phases : une phase de délai dite « lag », suivie par une phase de déclin d'absorption qui est plus lent dans les échantillons modifiés. La substitution affecte très fortement cette transition et nous y reviendrons par la suite.

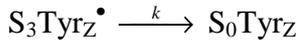
Au quatrième flash, les changements d'absorption sont à nouveau très faibles, car la transition $S_0 \rightarrow S_1$ absorbe très peu. De plus, du fait des manques, nous ne mesurons plus véritablement la transition $S_0\text{Tyr}_Z^{\bullet} \rightarrow S_0\text{Tyr}_Z$, mais plutôt un mélange de toutes les transitions. Cette transition est donc difficile à interpréter.

Revenons maintenant à la transition $S_3\text{Tyr}_Z^{\bullet} \rightarrow S_0\text{Tyr}_Z$.

Etant donné que de très faibles changements d'absorption sont observés après le premier et le deuxième flash et que les manques sont faibles, les transitions $S_1\text{Tyr}_Z^\bullet \rightarrow S_2\text{Tyr}_Z$ et $S_2\text{Tyr}_Z^\bullet \rightarrow S_3\text{Tyr}_Z$ vont très peu contribuer dans les changements d'absorption de la transition $S_3\text{Tyr}_Z^\bullet \rightarrow S_0\text{Tyr}_Z$ à 292 nm. Les vitesses des cinétiques de cette transition pourront être déterminées sur les données brutes dans les quatre types d'échantillons. Nous avons par ailleurs réalisé une simulation en prenant en compte ces contributions, mais les résultats ont montré que notre simplification est justifiée.

Les cinétiques de la transition $S_3\text{Tyr}_Z^\bullet \rightarrow S_0\text{Tyr}_Z$ mesurées à 292 nm ont été simulées par deux méthodes différentes, car il semble apparaître une phase de délai avant le déclin d'absorption correspondant à la formation de l'état $S_0\text{Tyr}_Z$.

Selon la méthode 1, la transition de $S_3\text{Tyr}_Z^\bullet \rightarrow S_0\text{Tyr}_Z$ est directe :



$$\text{Avec } A(t) = A(0).e^{-k.t}$$

Selon la méthode 2, il existe un état intermédiaire :



$$\text{Avec } A(t) = \frac{A(0)k_1}{(k_2 - k_1)} \cdot (e^{-k_1.t} - e^{-k_2.t}) + A(0).e^{-k_1.t}$$

Dans l'équation 2, $(S_3\text{Tyr}_Z^\bullet)'$ est un état transitoire qui aurait le même coefficient d'extinction que $S_3\text{Tyr}_Z^\bullet$ à 292 nm, par définition. La constante de vitesse k_1 correspond donc à une phase de délai avant le déclin d'absorption.

Les données de l'échantillon Ca/Cl ont été simulées par les deux méthodes, et comme nous pouvons le voir sur la Figure 50, le résultat obtenu semble meilleur avec l'équation 2, qui a été utilisée par la suite.

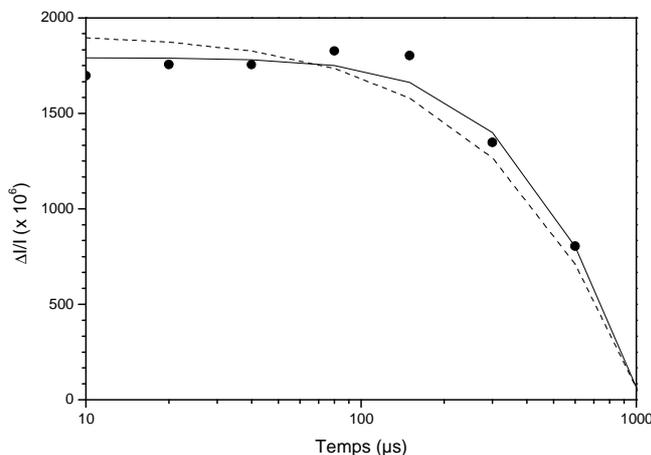


Figure 50 : Cinétiques de changements d'absorption à 292 nm après le troisième flash – Echantillon Ca/Cl Les points correspondent aux valeurs expérimentales, la ligne continue au fit obtenu avec l'équation 2 (avec délai dû à l'espèce intermédiaire $(S_3\text{Tyr}_Z^\bullet)'$) et la ligne en pointillés avec l'équation 1. Pour faciliter l'observation, la cinétique a été zoomée sur la zone du « lag ».

Pour cette raison, les quatre courbes correspondant aux quatre types d'échantillons ont été simulées selon l'équation en prenant en compte l'existence d'un délai. Les courbes et les valeurs des constantes de temps sont présentées Figure 51 et Tableau 7. Dans le tableau, se trouvent également les valeurs des constantes de vitesse que nous avons pu déterminer approximativement pour la transition $S_1Tyr_Z^{\bullet} \rightarrow S_2Tyr_Z$.

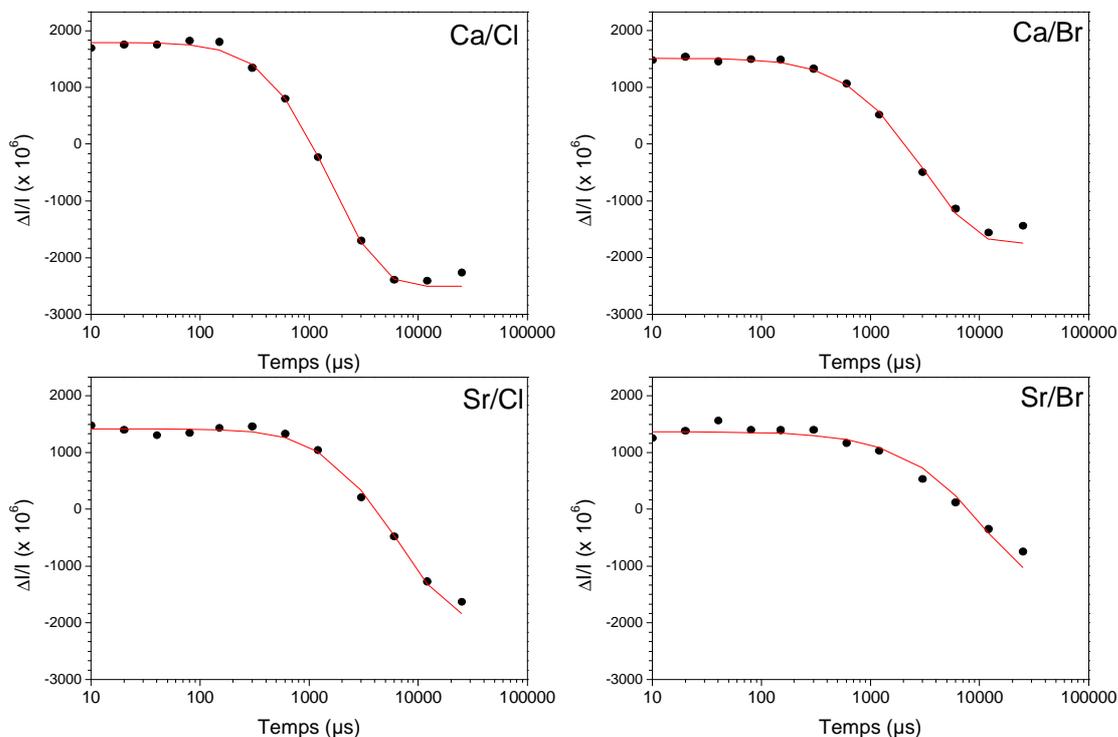


Figure 51 : Cinétiques des changements d'absorption à 292 nm après le troisième flash. Les carrés pleins correspondent aux points expérimentaux et la ligne rouge aux résultats de la simulation selon l'équation 2.

PSII	$S_1Tyr_Z^{\bullet} \rightarrow S_2Tyr_Z$		$S_3Tyr_Z^{\bullet} \rightarrow (S_3Tyr_Z^{\bullet})'$		$(S_3Tyr_Z^{\bullet})' \rightarrow S_0Tyr_Z$	
	k (s^{-1})	$t_{1/2}$ (μs)	k (s^{-1})	$t_{1/2}$ (μs)	k (s^{-1})	$t_{1/2}$ (ms)
Ca/Cl	14000	≈ 50	6000	115	630	1,1
Ca/Br	7000	≈ 100	4900	140	330	2,1
Sr/Cl	5000	≈ 150	3300	210	144	4,8
Sr/Br	1700	$\approx 400-500$	3000	230	96	7,2

Tableau 7 : Temps de demi-vie des transitions des états S mesurés à 292 nm. Le $t_{1/2}$ global de la transition $S_1Tyr_Z^{\bullet} \rightarrow S_2Tyr_Z$ a été estimé graphiquement. Les cinétiques de la transition globale $S_3Tyr_Z^{\bullet} \rightarrow S_0Tyr_Z$ ont été simulées selon l'équation 2, c'est-à-dire en incluant une espèce intermédiaire ($S_3Tyr_Z^{\bullet})'$.

Nous pouvons dans un premier temps considérer les valeurs de $t_{1/2}$ obtenues pour l'échantillon Ca/Cl et les comparer avec les valeurs trouvées dans la littérature pour du PSII de plante. Rappaport¹⁶⁹ et al. ont obtenu les $t_{1/2}$ suivants : 55 μs pour $S_1Tyr_Z^{\bullet} \rightarrow S_2Tyr_Z$, 30 μs

pour $(S_3\text{Tyr}_Z^\bullet) \rightarrow (S_3\text{Tyr}_Z^\bullet)'$ et 1,2 ms pour $S_3\text{Tyr}_Z^\bullet \rightarrow S_0\text{Tyr}_Z$. Seule la valeur du $t_{1/2}$ du lag est plus longue chez *T. elongatus* que chez les plantes. Les valeurs des autres $t_{1/2}$ sont comparables. Dans du PSII d'une cyanobactérie thermophile (*Synechococcus vulcanus*), H. Koike et al ont obtenu les $t_{1/2}$ suivants : 60 μs pour $S_1\text{Tyr}_Z^\bullet \rightarrow S_2\text{Tyr}_Z$, 120-150 μs pour $(S_3\text{Tyr}_Z^\bullet) \rightarrow (S_3\text{Tyr}_Z^\bullet)'$ et 1,3 ms pour $S_3\text{Tyr}_Z^\bullet \rightarrow S_0\text{Tyr}_Z$. Le $t_{1/2}$ du lag est plus proche de la valeur que nous avons obtenue.

On trouve que le $t_{1/2}$ de la phase de délai pour le PSII Sr/Br est égal au double du $t_{1/2}$ du PSII Ca/Cl. En accord avec la baisse de dégagement d'oxygène sous éclairage continu dans les échantillons modifiés, on trouve aussi que les cinétiques de $(S_3\text{Tyr}_Z^\bullet)' \rightarrow S_0\text{Tyr}_Z$ sont très ralenties dans les échantillons substitués : les $t_{1/2}$ vont de 1,1 ms pour Ca/Cl à 7,2 ms pour Sr/Br.

Une telle phase de délai correspond probablement à l'existence d'un état intermédiaire entre les états $S_3\text{Tyr}_Z^\bullet$ à $S_0\text{Tyr}_Z$ et a déjà été observée auparavant et attribuée à des réarrangements structuraux électrostatiques dans l'état $S_3\text{Tyr}_Z^\bullet$ ^{169, 170, 171, 172}. Nous en reparlerons dans la discussion suivante. On peut noter ici que seul l'échange $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ affecte les cinétiques de P_{680}^+ à 433 nm, alors que les cinétiques du cluster de Mn_4Ca et donc de réduction de Tyr_Z^\bullet sont affectées par les deux substitutions. Nous allons maintenant chercher à déterminer la nature de ce lag.

e) Cinétiques à 440 – 424 nm

Pour tenter d'explicitier plus précisément les processus se déroulant durant la phase de lag avant la réduction du radical Tyr_Z^\bullet , nous avons mesuré les cinétiques d'absorption à 440-424 nm. Les spectres d'absorption des transitions entre états S_n peuvent être interprétés, dans certains domaines de longueur d'onde, comme reflétant non pas directement les changements d'absorption d'une espèce redox, mais un effet électrochromique local. Cette contribution spectrale, dans les régions 400-450 nm et 650-700 nm est interprétée comme une variation électrochromique du potentiel électrostatique de la sonde chlorophyllienne P_{680} . On s'attend à ce que le relargage de protons ainsi que l'oxydation de Tyr_Z module la charge du système et donc le potentiel senti par la sonde électrochromique. Ainsi, l'amplitude du déplacement électrochromique lors des transitions $S_i \rightarrow S_{i+1}$ doit être liée entre autres à la stœchiométrie de libérations de protons.

Les longueurs 440 et 428 nm correspondent aux pics (positif et négatif) du spectre électrochromique¹⁶⁷. Pour suivre les changements associés aux réactions du côté donneur, nous avons mesuré la différence entre les signaux mesurés à 440 et 424 nm. A ces deux longueurs d'onde, le spectre de Q_A^-/Q_A a la même amplitude (Figure 43). En mesurant les changements d'absorption à (440-424) nm, on annule la contribution de l'espèce Q_A^- dans cette région spectrale, ce qui est important pour l'obtention des cinétiques de réduction de Tyr_Z^+ par les états S_i puisque l'oxydation de Q_A^- par Q_B a lieu dans un domaine de temps équivalent.

En premier lieu, nous avons réalisé les spectres d'absorption des échantillons Ca/Cl et Sr/Cl entre 410 et 460 nm pour vérifier que les longueurs d'ondes 440 et 424 nm sont bien adaptées pour réaliser les cinétiques, à la fois dans *T. elongatus* et dans l'échantillon biosynthétiquement modifié. Ces spectres ont été réalisés à 10 μ s et 100 ms après le premier flash. A 10 μ s, Q_A^- et le cluster de Mn_4Ca absorbent. A 100 ms, seul le cluster de Mn_4Ca absorbe car Q_A^- a été réoxydé par PPBQ (Figure 52).

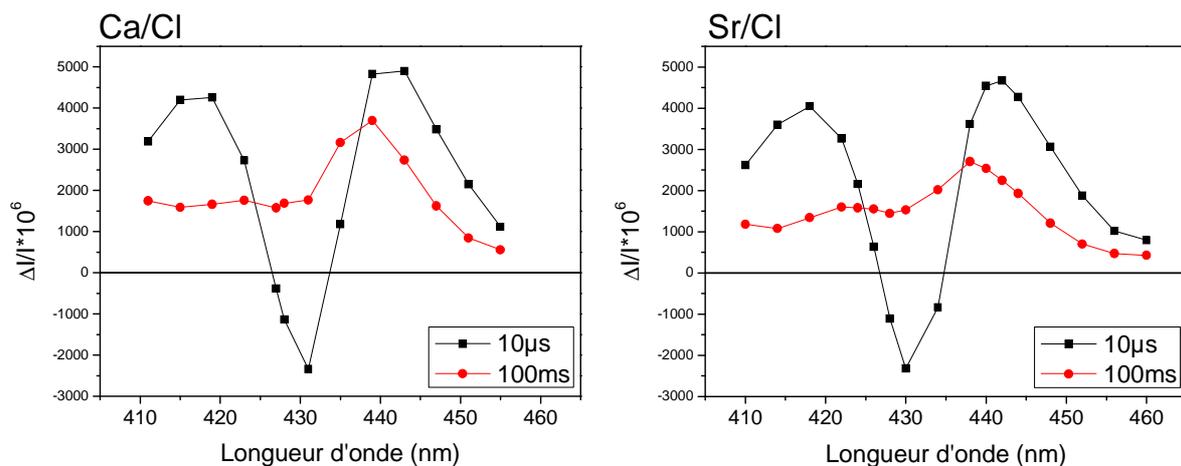


Figure 52 : Spectre des changements d'absorption d'un échantillon de PSII Ca/Cl (à gauche) et Sr/Cl (à droite). La longueur d'onde varie de 410 nm à 460 nm. L'échantillon est flashé une fois puis le changement d'absorption est mesuré 10 μ s (en noir), ou 100 ms (en rouge) après le flash.

Les spectres sont peu différents de ceux obtenus sur du PSII de plantes (Figure 43A et B), bien que l'amplitude du spectre soit assez faible à 100 ms après le flash. On obtient bien le maximum de signal pour 440 nm et un minimum autour de 430 nm. Pour s'affranchir de la contribution de Q_A^-/Q_A , nous maintenons la longueur d'onde de 424 nm.

Nous avons donc ensuite mesuré les cinétiques d'absorption à (440–424) nm pour suivre les changements d'absorption associés à l'oxydation de la tyrosine Z et aux transferts

de protons, de 10 μs à 100 ms après 1, 2, 3 et 4 flashes. Les résultats sont présentés dans la Figure 53. Le panneau A correspond aux cinétiques observées après 1 flash correspondant à la transition $S_1\text{Tyr}_Z^{\bullet} \rightarrow S_2\text{Tyr}_Z$, le panneau B après deux flashes correspondant à la transition $S_2\text{Tyr}_Z^{\bullet} \rightarrow S_3\text{Tyr}_Z$, le panneau C après 3 flashes correspondant à la transition $S_3\text{Tyr}_Z^{\bullet} \rightarrow S_0\text{Tyr}_Z$ et le panneau D après 4 flashes correspondant à la transition $S_0\text{Tyr}_Z^{\bullet} \rightarrow S_1\text{Tyr}_Z$.

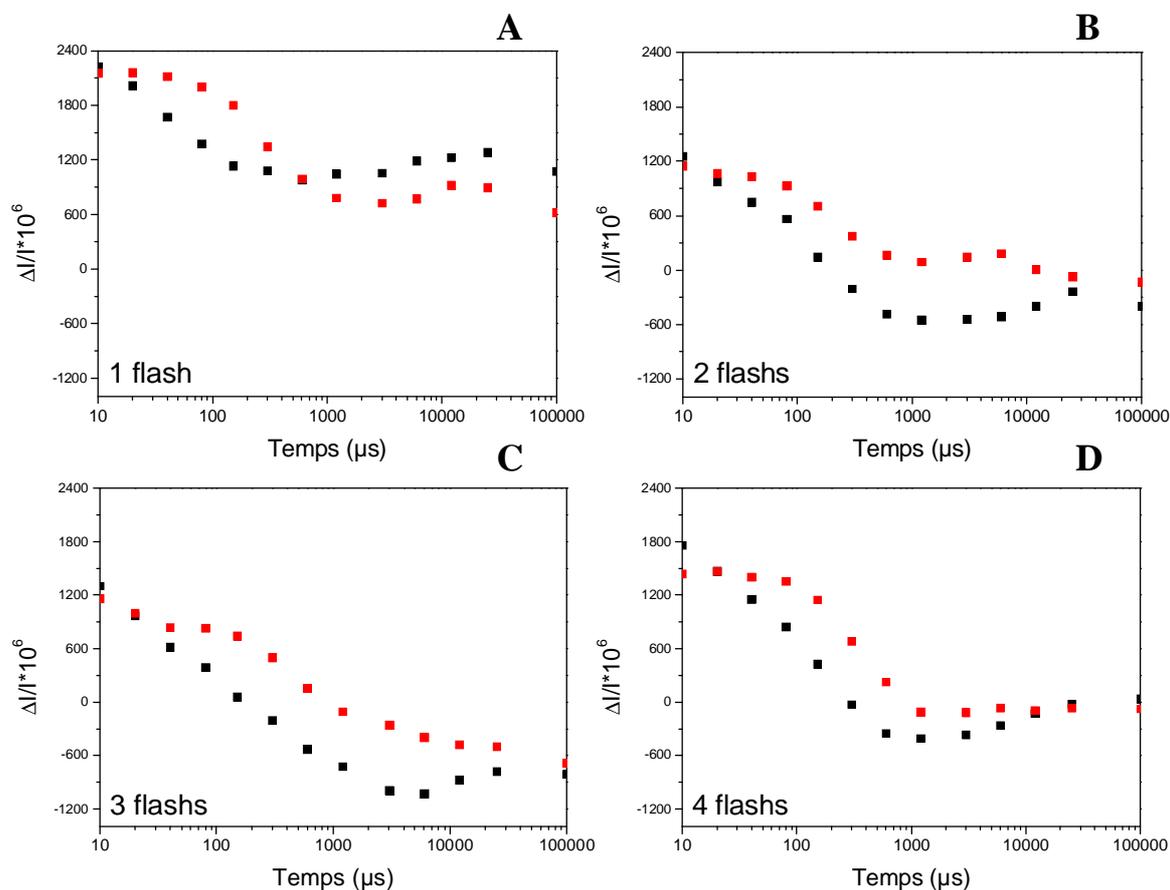


Figure 53 : Cinétiques de changements d'absorption à (440-424) nm des échantillons Ca/Cl (en noir) et Sr/Cl (en rouge). Après adaptation à l'obscurité des échantillons ($\text{Chl} = 25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) durant 1 heure à température ambiante, 100 μM de PPBQ sont ajoutés. Ensuite, le(s) flash(s) est donné et le changement d'absorption est suivi par une série de flashes détecteurs aux temps indiqués.

Après un flash (panneau A), la cinétique a un $t_{1/2}$ global qui correspond à celui déterminé sur la cinétique à 292 nm ($\sim 50\mu\text{s}$ pour Ca/Cl et $\sim 150\mu\text{s}$ pour Sr/Cl). La phase que nous observons correspond donc à $S_1\text{Tyr}_Z^{\bullet} \rightarrow S_2\text{Tyr}_Z$.

Après deux flashes (panneau B), nous n'avons pas pu déterminer le $t_{1/2}$ de la cinétique correspondant à $S_2\text{Tyr}_Z^{\bullet} \rightarrow S_3\text{Tyr}_Z$ à cause de l'amplitude trop faible du changement d'absorption à 292 nm. D'après la littérature, on sait que cette valeur se situe autour de 250-300 μs ¹⁶⁹ dans les plantes. On observe un $t_{1/2}$ d'environ 150 μs pour Ca/Cl, montrant que chez

T. elongatus, cette phase est accélérée d'un facteur ~ 2 . Nous savons qu'aucun proton n'est relâché dans le milieu durant cette transition (cf. Chapitre I). Le changement électrostatique que nous observons serait donc dû à un proton relâché quelque part dans la protéine, mais loin de la sonde électrochromique. La substitution du Sr^{2+} par le Ca^{2+} ralentit cette transition ($\sim 200 \mu\text{s}$).

Après quatre flashes (panneau D), on trouve sur la cinétique à 440 – 424 nm un $t_{1/2}$ de $\sim 100 \mu\text{s}$ pour Ca/Cl, ce qui pourrait correspondre à la cinétique de $\text{S}_0\text{Tyr}_Z^{\bullet} \rightarrow \text{S}_1\text{Tyr}_Z$. On sait d'après la littérature que la phase $\text{S}_0\text{Tyr}_Z^{\bullet} \rightarrow \text{S}_1\text{Tyr}_Z$ a un $t_{1/2}$ de $60\sim 200 \mu\text{s}$ ^{170,169}. Cependant, nous devons considérer ces données avec précaution sachant qu'après 4 flashes, nous sommes en présence d'un mélange d'états S_n du fait de l'existence de manques et de doubles coups. La substitution $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ semble malgré tout également ralentir cette transition ($\sim 200 \mu\text{s}$).

Sur la base des données que nous avons déjà obtenues, la transition qui nous intéresse plus particulièrement est la transition S_3 à S_0 durant laquelle est apparue une phase de délai à 292 nm attribuée à des réarrangements structuraux incluant des mouvements de protons que nous devrions détecter ici. Nous rappelons dans le Tableau 8, les valeurs des constantes de temps déterminées sur les cinétiques à 292 nm.

PSII	$\text{S}_3\text{Tyr}_Z^{\bullet} \rightarrow (\text{S}_3\text{Tyr}_Z^{\bullet})'$ (μs)	$(\text{S}_3\text{Tyr}_Z^{\bullet})' \rightarrow \text{S}_0\text{Tyr}_Z$ (ms)
Ca/Cl	115	1,1
Ca/Br	140	2,1
Sr/Cl	210	4,8
Sr/Br	230	7,2

Tableau 8 : Temps de demi-vie des transitions des états S mesurés à 292 nm et imposés dans la simulation des cinétiques à 440-424 nm.

Etant donné que la réduction de la tyrosine Tyr_Z^{\bullet} est observée à la fois dans la phase lente des cinétiques à 292 nm et dans la phase lente des cinétiques à (440-424) nm, nous avons réalisé une simulation des cinétiques à (440-424) nm après le troisième flash en prenant comme valeurs pour k_1 et k_2 les valeurs déterminées auparavant à 292 nm.

L'équation de la simulation est la suivante :

$$A(t) = p^* \frac{A(0) \times k_1}{k_2 - k_1} \cdot (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) + A(0) \cdot e^{-k_1 t} + \text{offset}$$

Par rapport à l'équation utilisée pour les cinétiques à 292 nm, nous avons été obligés de rajouter un paramètre supplémentaire (p), qui correspond au rapport des coefficients d'absorption entre l'espèce de départ et l'espèce intermédiaire qui sont des données inconnues. Les données montrent que ces deux espèces n'absorbent pas de la même manière. L'espèce transitoire absorbe moins puisque nous observons une baisse d'absorption.

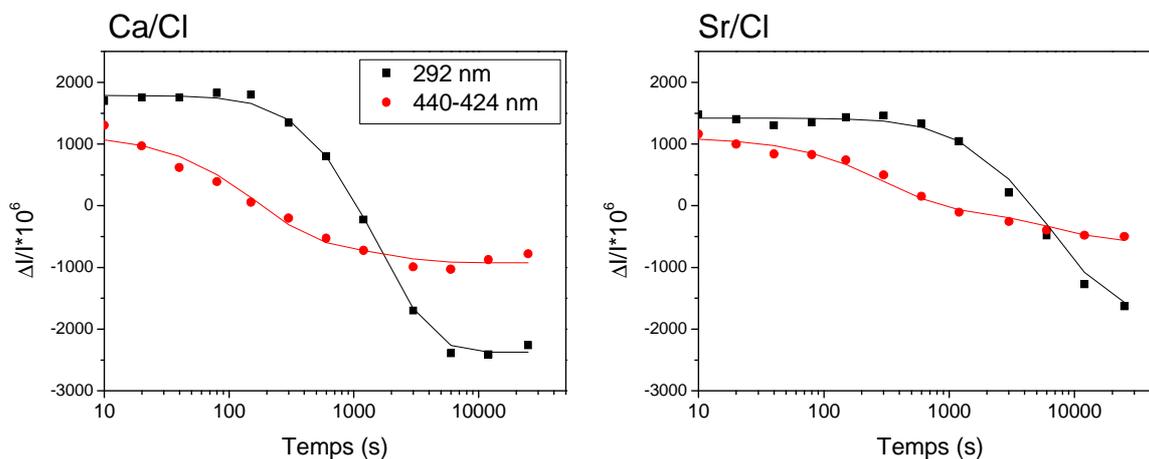


Figure 54 : Représentation simultanée des cinétique de changements d'absorption à 292 nm et à (440–424) nm pour les deux échantillons Ca/Cl et Sr/Cl après le troisième flash. Les points correspondent aux valeurs expérimentales et les lignes aux courbes simulées.

Nous observons que les courbes expérimentales et les courbes ajustées se superposent correctement. Dans les cinétiques à (440-424) nm on retrouve donc bien une phase lente correspondant à la phase ($S_3\text{TyrZ}^*$)' à $S_0\text{Tyr}_Z$ puisque les $t_{1/2}$ sont identiques à (440-424) nm et à 292 nm.

Les données électrochromiques et celles obtenues à 292 nm sont donc en accord. La phase de lag correspondrait à une phase pendant laquelle l'environnement électrostatique de P_{680} est modifié. Ceci est en accord avec les hypothèses émises auparavant que nous détaillerons par la suite, qui suggèrent que durant le lag, la réduction de la tyrosine Tyr_Z^* provoque l'expulsion d'un proton du centre catalytique.

5) Oxymétrie résolue en temps

Un autre moyen d'étudier la transition $S_3\text{Tyr}_Z^*$ à $S_0\text{Tyr}_Z$ est de suivre le dégagement d'oxygène. Cela peut être fait grâce à une électrode résolue en temps. Pour cette mesure, il est nécessaire d'utiliser des thylakoides au lieu du PSII car l'échantillon doit sédimenter sur l'électrode de platine.

Dans le montage utilisé, l'électrode d'Ag est plongée dans un milieu circulant pour que l'échantillon ne soit pas en anaérobiose. Dans un montage classique, le milieu circulant contient une grande quantité d'ions halogénures (15 mM de CaCl_2 , 15 mM MgCl_2 et 50 mM KCl). Pour éviter des échanges possibles entre Cl^- du milieu circulant et Br^- présent dans les échantillons de PSII Ca/Br et Sr/Br, nous avons réalisé deux types de montages : un montage classique Pt/Ag/AgCl et un montage Pt/Ag/AgBr dans lequel tout le Cl^- est remplacé par du Br^- .

a) Séquences de dégagement d'oxygène

Nous avons d'abord mesuré le dégagement d'oxygène sur une séquence de 20 flashes sur chaque échantillon (Figure 55).

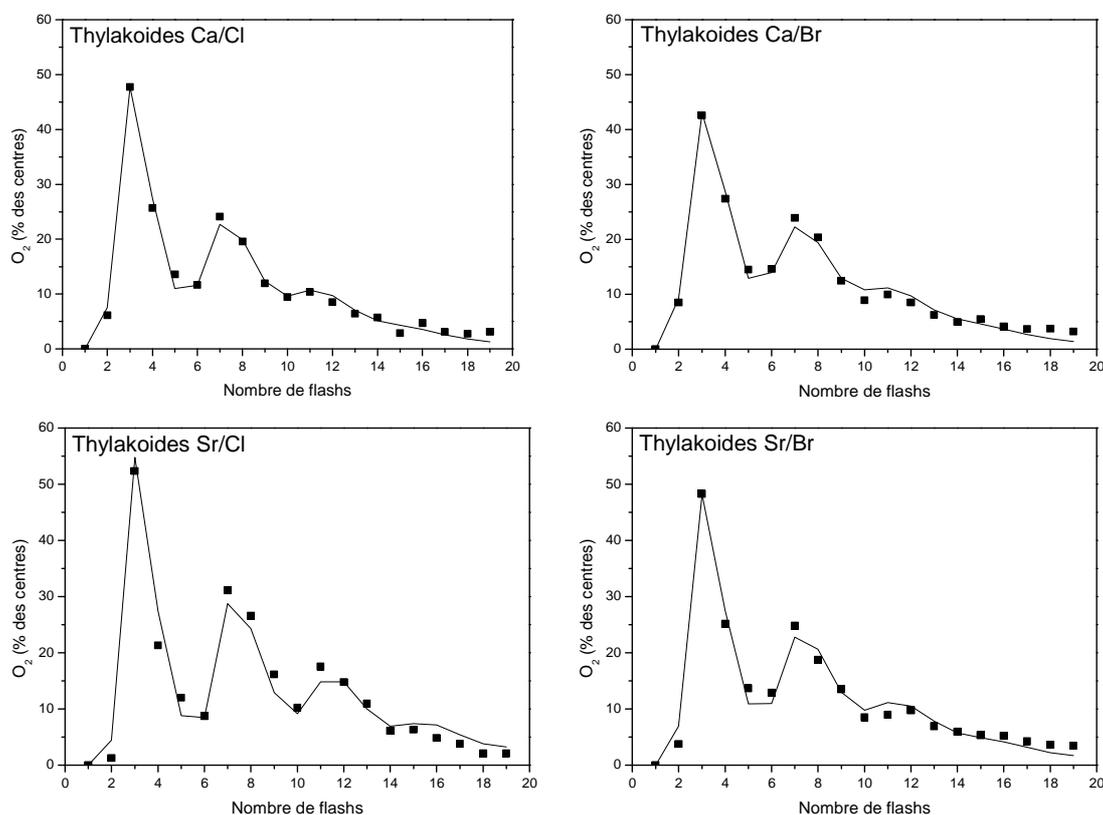


Figure 55 : Séquences de dégagement d'oxygène. Les échantillons de thylakoides ont été soumis à une série de 20 flashes séparés par 400 ms après adaptation à l'obscurité pendant une heure à température ambiante sur l'électrode de platine. L'amplitude du dégagement d'oxygène a été représentée de telle façon qu'elle correspond directement au pourcentage de centres qui produisent de l' O_2 . Les carrés représentent les valeurs expérimentales et les lignes les courbes simulées.

On observe sur les séquences de dégagement d'oxygène que les oscillations s'amortissent relativement vite. Pourtant des oscillations avaient été observées de façon très nette jusqu'au quatrième cycle dans des échantillons Ca/Cl et Sr/Cl biosynthétiques dans une publication précédente¹¹⁰. La différence entre les échantillons utilisés est le type de souche de *T. elongatus* utilisée : Δ psbA1- Δ psbA2 dans notre cas et 43H dans le cas cité. La souche 43H qui est la souche sauvage exprime les trois gènes codant pour la protéine D1. Il est possible que dans le cas des cellules Δ psbA1- Δ psbA2, le pool de quinones soit moins accessible au PSII et/ou qu'il s'épuise plus rapidement, ce qui expliquerait l'amortissement des oscillations.

Nous avons dans un premier temps calculé les valeurs des paramètres α (manques) et β (doubles coups) grâce à la simulation (Tableau 9) des oscillations (cf. chapitre II).

	Echantillon	α	β	S_0/S_1
Δ psbA1-A2	Ca/Cl	15	5	17/83
	Ca/Br	14	8	29/71
	Sr/Cl	12	3	15/85
	Sr/Br	16	5	15/85

Tableau 9 : Valeurs des paramètres α (manques), β (doubles coups) et rapport S_0/S_1 déduites de la simulation des séquences de dégagement d'oxygène. La procédure est décrite dans le Chapitre II.

Les valeurs de ces paramètres sont très proches dans tous les échantillons. Malgré le fort amortissement, nous pouvons comparer les séquences après substitution des cofacteurs. On observe donc que les séquences de dégagement d'oxygène sont identiques pour les quatre types d'échantillons.

b) Cinétiques de dégagement d'oxygène

Nous avons ensuite pu mesurer les cinétiques de dégagement d'oxygène pour chaque échantillon. Les thylakoides ont été adaptés à l'obscurité, puis éclairés par 3 flashes pour avoir le plus grand pourcentage de centres qui passent de S_3 à S_0 . La Figure 56 montre les courbes de dégagement d'oxygène obtenues pour les quatre types d'échantillons Ca/Cl (en noir), Ca/Br (en bleu), Sr/Cl (en rouge) et Sr/Br (en vert), sur les deux types de montage Pt/Ag/AgCl (panneau A) et Pt/Ag/AgBr (panneau B).

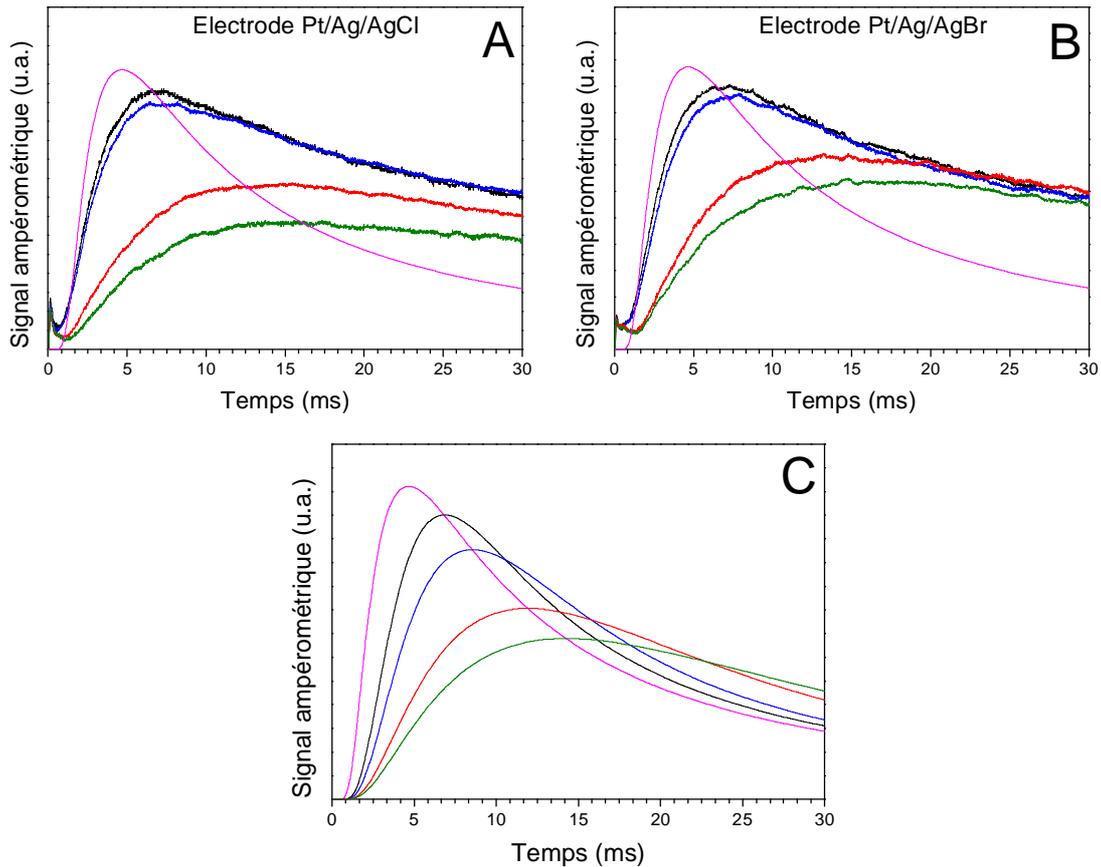


Figure 56 : Cinétiques de dégagement d'O₂ mesurées après le 3^{ème} flash donné à des thylakoides Ca/Cl (noir), Ca/Br (bleu), Sr/Cl (rouge) et Sr/Br (vert). Les mesurées ont été réalisées sur une électrode Pt/Ag/AgCl (A) ou Pt/Ag/AgBr (B). C, signal ampérométrique théorique. La courbe rose est la fonction $\Phi(t)$ pour un t_d égal à 7 ms. Les échantillons ont été adaptés à l'obscurité sur l'électrode de Pt durant une heure à température ambiante ($\text{Chl} = 1 \text{ mg.mL}^{-1}$).

Les données telles qu'elles sont présentées ici ont subi une normalisation. (Un exemple de données non normalisées est donné Figure 83). En effet, le rapport PSII/PSI varie légèrement d'un échantillon de thylakoides à l'autre (variation entre 1,9 et 2,9 selon les échantillons). Pour une même concentration en chlorophylle, la concentration en PSII peut donc être légèrement différente. Nous devons normaliser les courbes obtenues à ce qu'elles seraient pour la même concentration en PSII. Pour ce faire, nous nous basons sur la théorie de Lavorel : lorsque la concentration en PSII dans les échantillons est identique, la courbe $\Phi(t)$ doit croiser les autres courbes à leur maximum.

La courbe $\Phi(t)$ est donnée par l'équation suivante : $\Phi(t) = \frac{\sqrt{t_d}}{\sqrt{\pi} \times t^3} \times \exp\left(-\frac{t_d}{t}\right)$. Nous avons donc établi un protocole pour déterminer la valeur de la constante de diffusion t_d qui

peut être considérée comme une constante expérimentale, si la sédimentation ne varie pas d'une mesure à l'autre. Pour déterminer sa valeur, nous avons utilisé la procédure suivante.

Nous rappelons l'expression de la fonction S_i .

$$S_i = k_{ox} \times inc \times \sum_{j=0}^i (\Phi_j \times \exp(-k_{ox} \times inc \times (i - j)))$$

Dans lequel S_i est le signal ampérométrique au temps " $inc \times i$ " (" inc " est l'incrément de temps et " i " est l'intervalle de l'intégrale). " Φ_j " est la valeur de la fonction $\Phi(t)$ à l'étape " $j = i$ ".

La fonction S_i a été représentée avec différentes valeurs de t_d en prenant comme valeur de k_{ox} , la valeur obtenue pour Ca/Cl à 292 nm (630 s^{-1}) (voir chapitre III, Tableau 7). Pour chaque courbe correspondant à une valeur de t_d , nous avons déterminée la valeur du t_{max} à laquelle la courbe de S_i atteint son maximum. Nous avons représenté la valeur de « t_{max} » en fonction de « t_d ».

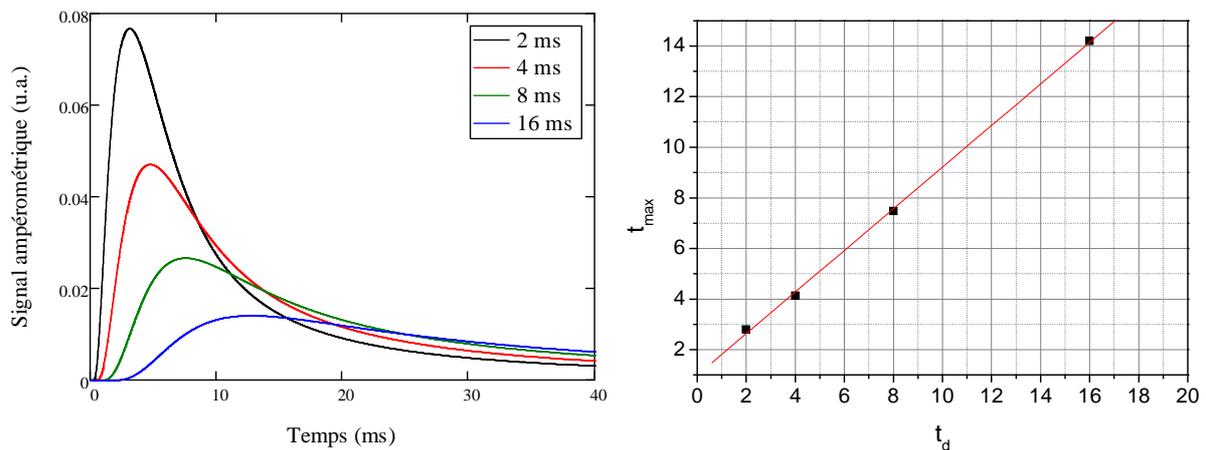


Figure 57 : Méthode de détermination de la constante de diffusion t_d . A gauche, exemples de signaux ampérométriques calculés d'après la fonction S_i pour différentes valeurs de t_d (indiquées dans l'encart) avec $k_{ox} = 630 \text{ s}^{-1}$. A droite, représentation du t_{max} (temps auquel le maximum de S_i est atteint) déterminé sur les courbes précédentes, en fonction du t_d .

Nous avons montré expérimentalement que la courbe d'émission d'oxygène des thylakoides Ca/Cl présente un maximum autour de 7 ms, ce qui correspond à une valeur de t_d de 7 ms, d'après notre courbe de calibrage.

Cette valeur de 7 ms pour le t_d a été injectée dans l'équation de la fonction S_i pour calculer les courbes théoriques des quatre types d'échantillons en utilisant les 4 valeurs de k_{ox} obtenues pour chaque échantillon à 292 nm.

La concordance entre les courbes théoriques et les courbes expérimentales montre que la sédimentation ne varie pas selon les échantillons, comme nous l'avions supposé.

On peut supposer que la valeur de la constante de diffusion n'est pas assez grande pour permettre une bonne résolution des différences entre les courbes de dégagement d'O₂ de Ca/Cl et Ca/Br. Malgré cela, on peut voir que les vitesses de dégagement d'oxygène évoluent dans le même ordre que les activités mesurées sous éclairage continu : Ca/Cl > Ca/Br > Sr/Cl > Sr/Br.

En 1988, est parue une publication de Plijter et al.¹⁷³ décrivant le processus de dégagement d'oxygène comme une étape limitante du cycle catalytique. Contrairement à l'idée selon laquelle le dégagement d'oxygène a lieu juste après la réduction du complexe de manganèse (domaine de temps de l'ordre de la ms), l'apparition d'oxygène serait un processus très lent. Après la formation d'O₂ durant la transition S₃ à S₀, la molécule d'O₂ reste dans le site mais n'empêche pas la formation de l'état S₃. Selon cette publication, les vitesses rapides de dégagement d'oxygène mesurées jusqu'alors sur des électrodes polarisées seraient des artefacts dus à la polarisation de l'électrode lors de la mesure.

Cependant, les différences détectées sur les vitesses après échange biosynthétique du Ca²⁺ par Sr²⁺, ainsi que la simulation réussie des courbes de dégagement d'oxygène en incluant dans la procédure les valeurs obtenues à 292 nm laissent présumer très fortement que ces mesures ne sont pas artefactuelles. Sinon, cela signifierait que l'artefact dû à la polarisation serait sensible à l'échange des cofacteurs.

Notre étude d'oxymétrie résolue en temps confirme l'hypothèse déjà émise auparavant : le déclin de l'activité dans les échantillons substitués provient de l'apparition d'une étape cinétiquement limitante dans le cycle catalytique, et non de l'existence de centres inactifs.

6) Etudes des propriétés thermodynamiques par thermoluminescence

Par notre étude des propriétés cinétiques du PSII après échange biosynthétique des cofacteurs, nous avons montré des effets très nets de la substitution. Nous démontrons ainsi l'implication du Cl⁻ dans la réaction d'oxydation de l'eau. Nous allons maintenant étudier l'aspect thermodynamique de la réaction.

Comme expliqué dans le chapitre II, en se basant sur un certain nombre de simplifications, on peut dire que les changements observés dans les courbes de thermoluminescence de thylakoides ou PSII reflètent les changements de propriétés redox du

couple S_{n+1}/S_n . La Figure 58 présente les résultats obtenus en thermoluminescence sur les quatre types d'échantillons de PSII après 1 flash (état S_2), ce qui correspond à la recombinaison $S_2Q_B^-$ et 2 flashes (état S_3) qui correspond à la recombinaison $S_3Q_B^-$.

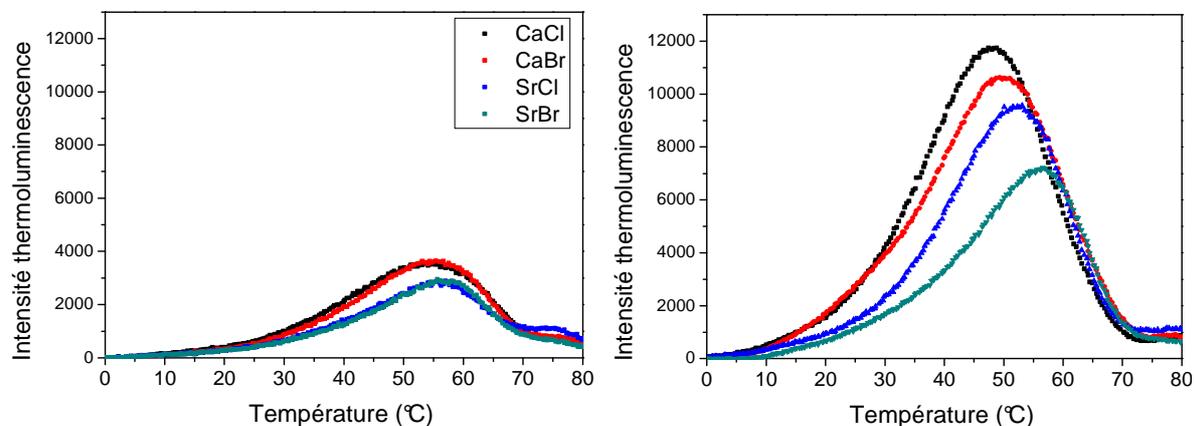


Figure 58 : Courbes d'émission de thermoluminescence provenant de la recombinaison $S_2Q_B^-$ après un flash (à gauche) et $S_3Q_B^-$ après deux flashes (à droite), d'échantillons de PSII. Les échantillons ont été adaptés à l'obscurité à température ambiante avant la mesure.

La Figure 58 montre que les courbes de thermoluminescence des échantillons substitués sont déplacées vers de plus hautes températures par rapport à Ca/Cl et l'ordre des températures de recombinaison est le suivant : $Ca/Cl < Ca/Br < Sr/Cl < Sr/Br$. Les valeurs des pics de température de la recombinaison $S_3Q_B^-$ sont respectivement : $48^\circ C$, $50^\circ C$, $52^\circ C$, $56^\circ C$ pour les échantillons Ca/Cl, Ca/Br, Sr/Cl et Sr/Br respectivement.

L'effet de la substitution des cofacteurs est plus grand sur les courbes provenant de la recombinaison de charges $S_3Q_B^-$ que de la recombinaison de charges $S_2Q_B^-$. Le niveau d'énergie libre de $S_2Q_B^-$ serait donc moins affecté par les substitutions que le niveau d'énergie de $S_3Q_B^-$. Ceci est en accord avec une étude précédente¹¹⁰ qui a montré que la réduction de S_3 à S_2 à l'obscurité est 3 fois plus lente dans les thylakoides Sr/Cl que dans les thylakoides Ca/Cl, alors que la stabilité de S_2 à l'obscurité est pratiquement inchangée.

L'aire sous la courbe de thermoluminescence est moins importante pour la recombinaison de charges $S_2Q_B^-$ que pour $S_3Q_B^-$. Dans les thylakoides de plantes, il a été montré que l'amplitude est deux fois plus grande pour $S_3Q_B^-$ que pour $S_2Q_B^-$. Dans notre expérience avec *T. elongatus*, ce facteur atteint une valeur de 3,5. Une explication possible est que le rapport Q_B^-/Q_B est plus grand après le deuxième flash qu'après le premier, ce qui correspondrait à un ratio Q_B^-/Q_B supérieur à 1 dans les échantillons de PSII adaptés à l'obscurité. Mais cette hypothèse est en contradiction avec une récente publication montrant

que ce ratio est proche voire inférieur à 1 dans *T. elongatus*¹⁷⁴. Cependant, c'est un paramètre qui est également dépendant des conditions de l'expérience : plus l'adaptation à l'obscurité à température ambiante sera longue, moins l'échantillon contiendra de Q_B^- .

D'autres hypothèses doivent être considérées. La recombinaison de $S_3Q_B^-$ a lieu à une température plus faible que celle de $S_2Q_B^-$. La différence d'énergie entre les couples S_2/S_1 et P_{680}^*/P_{680} est donc plus grande que celle entre les couples S_3/S_2 et P_{680}^*/P_{680} . Ainsi, le chauffage nécessaire pour repeupler P_{680}^* à partir de l'état $S_2Q_B^-$ doit être plus important qu'à partir de l'état $S_3Q_B^-$. Cela pourrait favoriser des recombinaisons de charges intermédiaires impliquant les voies non radiatives au détriment de la voie radiative.

Nous avons également mesuré les courbes d'émission de thermoluminescence des recombinaisons $S_2Q_B^-$ et $S_3Q_B^-$ sur des échantillons de thylakoides (Figure 59).

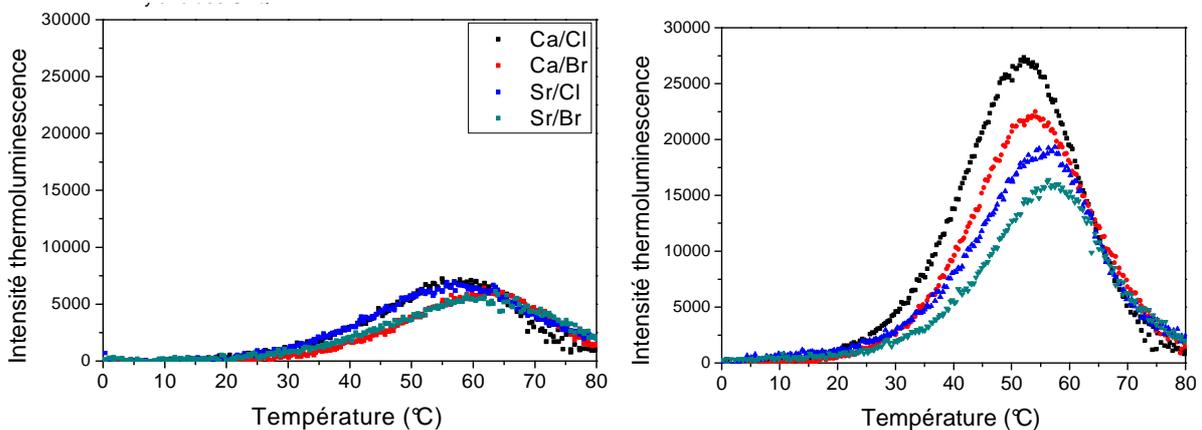


Figure 59 : Courbes d'émission de thermoluminescence provenant de la recombinaison $S_2Q_B^-$ après un flash (à gauche) et $S_3Q_B^-$ après deux flashes (à droite), d'échantillons de thylakoides. Les échantillons ont été préalablement adaptés à l'obscurité à température ambiante avant la mesure.

Les résultats concernant la recombinaison $S_3Q_B^-$ sont comparables à ceux obtenus sur PSII, à savoir les échantillons modifiés présentent des températures de recombinaisons supérieures à l'échantillon contrôle Ca/Cl dans l'ordre suivant : $Ca/Br < Sr/Cl < Sr/Br$. Nous pouvons ainsi prouver que la procédure de purification du photosystème II n'entraîne ni artefact ni modification majeure de la constitution des centres qui viendrait fausser nos mesures.

En principe, il est possible de connaître le niveau d'énergie du couple S_3/S_2 par simulation des courbes de thermoluminescence, selon la théorie de Rappaport¹⁵⁸ qui est la plus correcte (cf. chapitre II). Cependant, pour cause de manque de données concernant les

énergies d'activation de chaque étape du processus de recombinaison, sachant que l'échange $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ n'affecte pas seulement les propriétés redox du cluster de manganèse (par exemple, le transfert d'électrons entre Q_A et Q_B est ralenti⁸⁴) nous n'avons pas pu utiliser ce protocole.

Nous avons néanmoins réalisé une estimation qualitative de cette différence de niveau d'énergie d'après les données présentes dans la littérature, en comparant le rapport entre les décalages de température de thermoluminescence et les valeurs des différences d'énergie libre correspondantes. Il a été estimé qu'un décalage dans les pics de température correspondant aux courbes de thermoluminescence S_2Q_B^- et S_3Q_B^- égal à $\approx 8^\circ\text{C}$ correspond à une différence d'énergie libre entre les états S_2 et S_3 d'environ $50\sim 60 \text{ meV}^{175}$. Récemment, il a été montré qu'une mutation dans le voisinage de Q_A entraîne un décalage de température de thermoluminescence de 9°C et un changement d'énergie libre de $\approx 60 \text{ meV}^{176}$. Dans le cas de l'échantillon Sr/Br nous trouvons également un décalage de température de 8°C pour la recombinaison S_3Q_B^- , donc on peut estimer que le changement d'énergie libre associé à la double substitution $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ et Cl^-/Br^- est de $50\sim 60 \text{ meV}$.

Nous avons également cherché à appliquer la théorie de Randall-Wilkins pour estimer le niveau d'énergie du couple S_3/S_2 . Après 1 flash donné à un échantillon adapté à l'obscurité, la thermoluminescence provient de la recombinaison de charges entre S_2 et Q_B^- tandis qu'après 2 flashes, elle provient de la recombinaison S_3Q_B^- . A cause des manques, une partie de la courbe de thermoluminescence observée après 2 flashes provient également de la recombinaison S_2Q_B^- . En supposant que les manques sont de 9% comme nous l'avons calculé d'après les oscillations à 292 nm, nous avons pu simuler les courbes obtenues sur PSII après 2 flashes en distinguant les contributions S_2Q_B^- et S_3Q_B^- . Le Tableau 10 et la Figure 60 montrent les courbes obtenues ainsi que les valeurs des paramètres déduits de la simulation.

PSII	Energie d'activation, E_a (eV)	Facteur préexponentiel	T_m ($^\circ\text{C}$)
Ca/Cl	0.74	$(3.5 \pm 0.2) 10^7$	48.2
Ca/Br	0.75	$(3.7 \pm 0.2) 10^7$	48.7
Sr/Cl	0.83	$(70 \pm 5) 10^7$	51.6
Sr/Br	0.85	$(100 \pm 20) 10^7$	55.1

Tableau 10 : Paramètres résultats de la procédure de simulation (moyenne de trois échantillons).

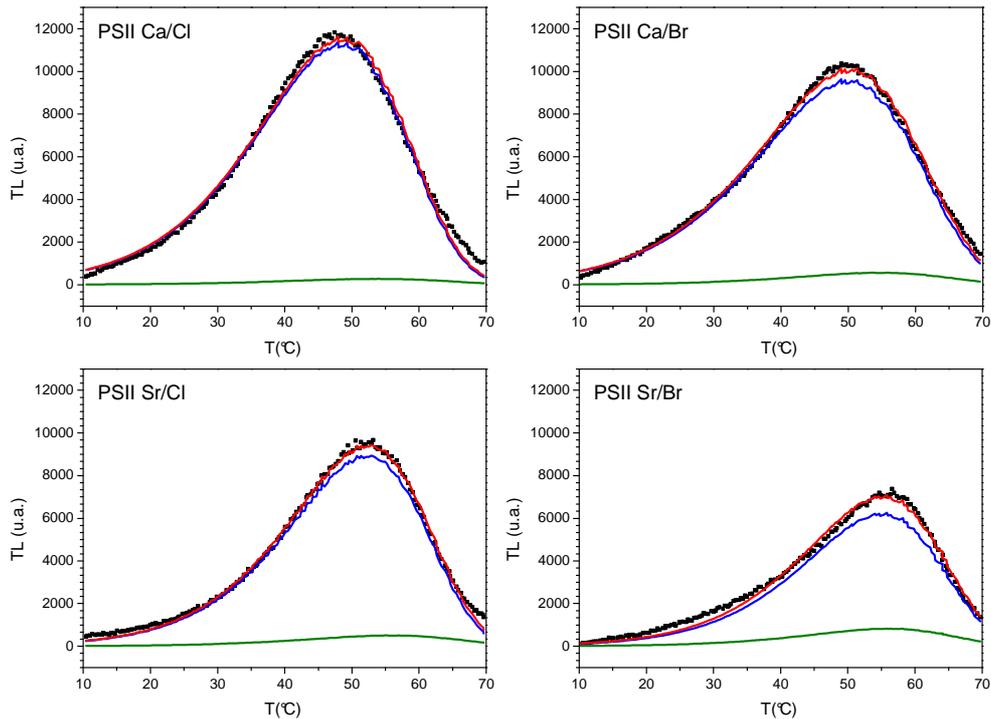


Figure 60 : Courbes simulées de thermoluminescence après 2 flashes, provenant de la recombinaison de charges $S_3Q_B^-$. En cercles noir, les points expérimentaux sont représentés. La courbe verte est la courbe simulée correspondant à la contribution $S_2Q_B^-$, la courbe bleue est la courbe simulée correspond à la contribution $S_3Q_B^-$ et la courbe rouge représente la somme des deux composantes simulées.

La contribution de $S_2Q_B^-$ est très faible et sera considérée comme négligeable par la suite. En utilisant l'application développée par Ducruet (cf. Chapitre II), nous trouvons donc que le niveau d'énergie de l'échantillon Sr/Br est abaissé de 110 meV par rapport à l'échantillon Ca/Cl, qui est une valeur trop élevée pour être considérée, comme nous le démontrerons dans la discussion. Cela provient de la trop grande simplification de la méthode.

7) Mesure des énergies d'activation

La thermoluminescence nous a permis d'approcher les valeurs d'enthalpies des réactions de recombinaison. Nous allons maintenant déterminer les valeurs des énergies d'activation en mesurant la dépendance en température des transitions $S_i \rightarrow S_{i+1}$. Dans un premier temps, nous nous sommes contentés d'étudier seulement les échantillons substitués simplement, à savoir Ca/Br et Sr/Cl, en plus de l'échantillon contrôle Ca/Cl, pour la transition S_3 à S_0 . L'effet synergique des deux substitutions sera étudié ultérieurement, ainsi que les autres transitions dont le faible changement d'absorption rend l'étude difficile.

Nous avons estimé la valeur des énergies d'activation des trois échantillons en mesurant les cinétiques de la transition ($S_3\text{Tyr}_Z$)' à S_0 à 292 nm à trois températures : 5°C, 21°C et 40°C. Les cinétiques obtenues ainsi que la représentation d'Arrhenius de ce phénomène sont représentées Figure 61 et Figure 62. Les valeurs de l'énergie d'activation et du facteur préexponentiel déduits du plot d'Arrhenius sont résumées dans le Tableau 11.

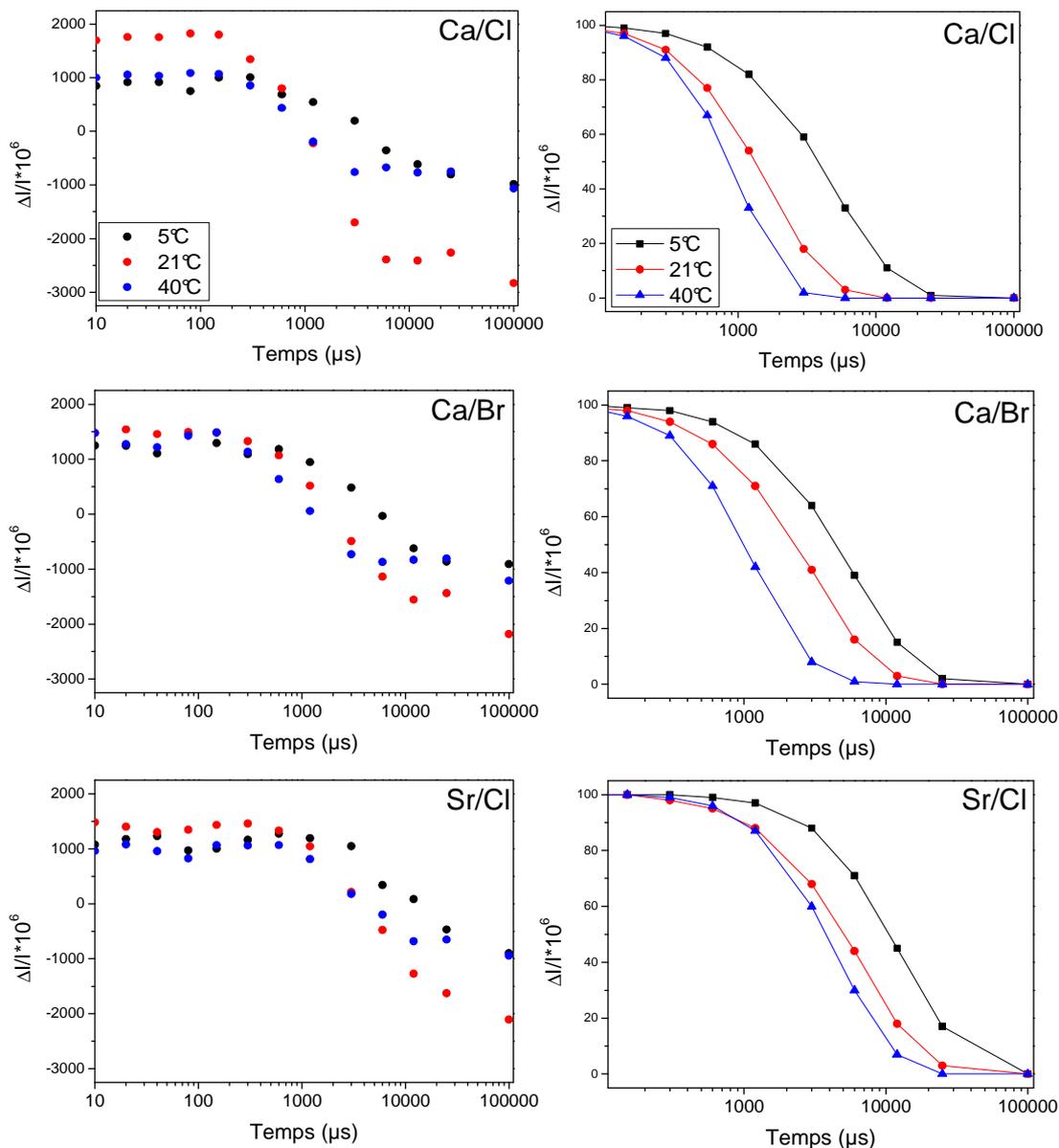


Figure 61 : Cinétiques d'absorption à 292 nm pour la transition S_3 à S_0 pour les trois échantillons Ca/Cl, Ca/Br et Sr/Cl aux trois températures indiquées. Les données brutes sont représentées à gauche, et les données normalisées de 0 à 100% à droite.

Pour les trois échantillons, on observe que le $t_{1/2}$ global dépend de la température entre 5°C et 40°C. Les cinétiques sont plus rapides à 40°C qu'à 5°C.

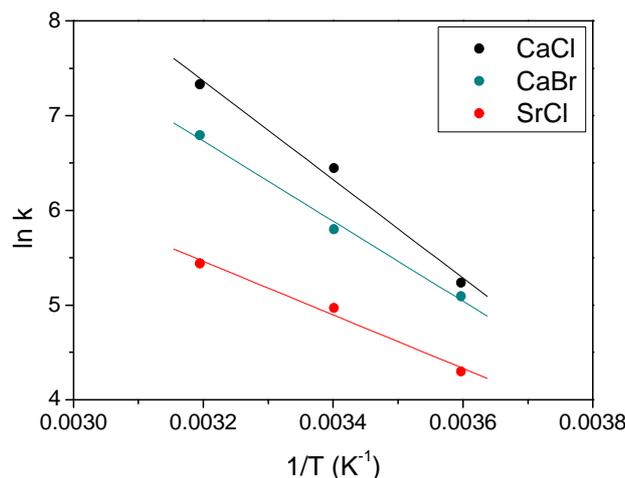


Figure 62 : Représentation d'Arrhénius pour la transition $(S_3Tyr_Z)' \rightarrow S_0Tyr_Z$.

Echantillon PSII	k (s ⁻¹)			Energie d'activation (kJ/mol)	Facteur préexponentiel
	5°C	25°C	40°C		
Ca/Cl	188	630	1527	43	$3 \cdot 10^{10}$
Ca/Br	163	330	892	35	$6 \cdot 10^8$
Sr/Cl	74	144	231	23	$2 \cdot 10^6$

Tableau 11 : Valeurs des constantes de temps à chaque température de mesure, des énergies d'activation et des facteurs préexponentiels déduits des cinétiques à 292 nm. Les constantes de temps k ont été déduites d'une simulation sur Excel selon la procédure décrite dans le chapitre II (selon l'équation 2 faisant intervenir une phase de délai).

Les valeurs des énergies d'activation et du facteur préexponentiel se trouvent être plus faibles dans les échantillons modifiées.

Nous avons également tenté de déterminer l'énergie d'activation du lag de $S_3Tyr_Z^*$ à $(S_3Tyr_Z)'$. Mais malheureusement, nous n'avons rien pu obtenir de concluant. C'est une étude préliminaire qui demandera à être poursuivie par des mesures à des températures plus nombreuses.

8) Caractérisation par Résonance Paramagnétique Electronique

a) Introduction : Cas de l'échantillon contrôle Ca/Cl dans l'état S_2

Nous allons commencer par étudier un échantillon contrôle Ca/Cl pour mettre en évidence les signaux d'intérêt dans l'état S_2 . Pour observer les différents signaux, on doit faire varier les conditions de température, de puissance micro-ondes, etc. d'enregistrement des spectres (que nous nommerons d'après la température utilisée pour enregistrer le spectre : 4 K, 8,5 K et 15 K). Les spectres présentés sont des spectres de différence entre l'état S_2

(obtenu par éclaircissement à 200K) et l'état S_1 (après préflash et adaptation à l'obscurité pendant une heure à température ambiante). L'intérêt de la procédure de préflash est d'amener 100% des centres dans l'état S_1 (voir chapitre II, page 58).

i. Spectre à 4 K

A 4 K, on observera préférentiellement les signaux suivants :

- A $g = 4,2$ (1600 gauss), un signal de Fe^{III} contaminant dont l'amplitude varie d'un échantillon de PSII à un autre.
- A $g = 7,9$ (850 gauss) et $g = 5,6$ (1200 gauss), des résonances qui font partie d'un signal de Fe^{III} non hème qui est situé entre les deux quinones Q_A et Q_B . Le fer non hème a les propriétés suivantes. L'amplitude des signaux à $g = 7,9$ et $g = 5,6$ oscille avec une période 2. l'explication de ces oscillations est donnée dans la Figure 63

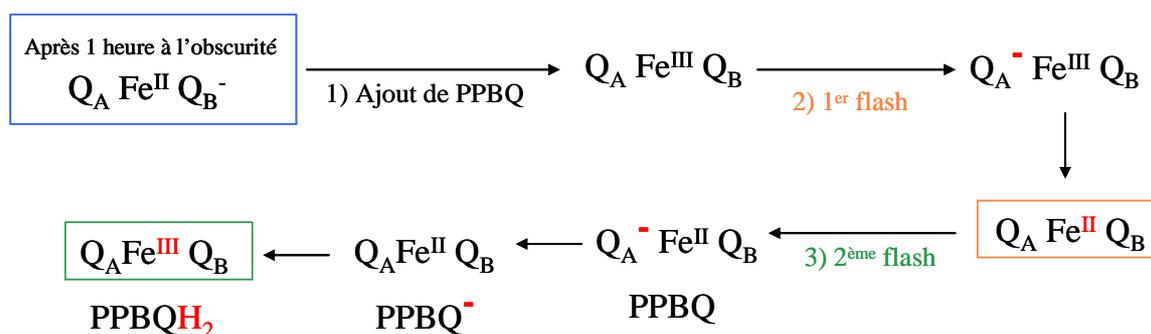


Figure 63 : Oscillations de période 2 des signaux du Fer non hème. 1) Après une heure d'adaptation à l'obscurité, l'état $Q_A Fe^{II} Q_B^-$ est présent dans une fraction des centres PSII. L'ajout de PPBQ résulte en la formation de l'état $Q_A Fe^{III} Q_B$ dans ces centres, suite à l'oxydation du Fe^{II} par $PPBQ^-$ qui est une espèce très oxydante. La proximité du Fe non hème et de $PPBQ$ favorise l'oxydation du Fe, au détriment de la transmutation de $PPBQ^-$. 2) L'illumination par un premier flash donne lieu à la formation de l'état $Q_A Fe^{II} Q_B$. 3) Après un deuxième flash, l'état $Q_A Fe^{III} Q_B$ est formé.

Ces trois premiers signaux sont observables sur le spectre présenté Figure 64 enregistré à 4K. Le grand signal hors échelle à $g \approx 2$ correspond à la tyrosine Tyr_D^\bullet . Le signal multilignes est déjà présent mais il est saturé dans ces conditions.

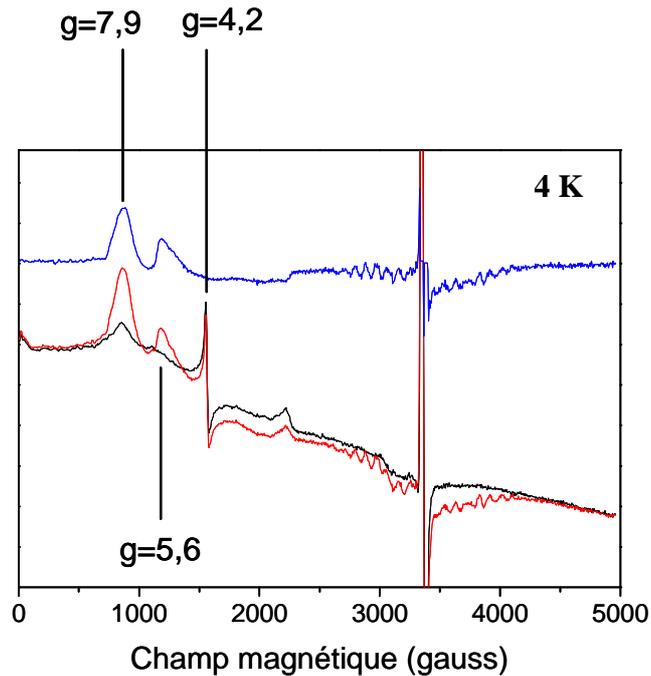


Figure 64 : Spectre RPE d'un échantillon de PSII Ca/Cl enregistré à 4 K. L'échantillon a été adapté à l'obscurité durant 1 heure à température ambiante, préflashé, puis adapté à nouveau à l'obscurité pendant une heure à température ambiante. 0,5 mM de PPBQ dissous dans du DMSO sont ajoutés avant congélation à 77 K et enregistrement des spectres. Le spectre en noir correspond au spectre de l'échantillon de PSII adapté à l'obscurité après addition de PPBQ, le rouge à celui après éclaircissement à 200 K, et le spectre bleu est le spectre de différence. Les autres paramètres d'enregistrement sont les suivants : amplitude de modulation : 25 G ; puissance micro-ondes : 20 mW, fréquence micro-ondes : 9,4 GHz ; fréquence de modulation : 100 kHz.

D'autres signaux peuvent être également dans d'autres conditions :

- A $g = 1,95$ (3440 gauss) un signal $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Q}_\text{B}^-$
- A $g = 1,82$ (3690 gauss) et $g = 1,90$ (3600 gauss), des signaux $\text{Q}_\text{A}^- \text{Fe}^{\text{II}}$
- A $g = 1,66$ (4050 gauss), un signal $\text{Q}_\text{A}^- \text{Fe}^{\text{II}}\text{Q}_\text{B}^-$

ii. Spectre à 8,5 K

Sur un spectre enregistré à 8,5K dans les conditions décrites dans la légende de la Figure 65, on observe le signal multilignes. Son amplitude est maximale après un éclaircissement à 200 K car les centres sont bloqués dans l'état S_2 .

Dans certains cas, on peut également enregistrer un signal à $g \approx 4$ (cf. Chapitre II, P.31). Les signaux liés au Fe non hème et au Fe contaminant sont toujours observables mais avec une amplitude plus faible.

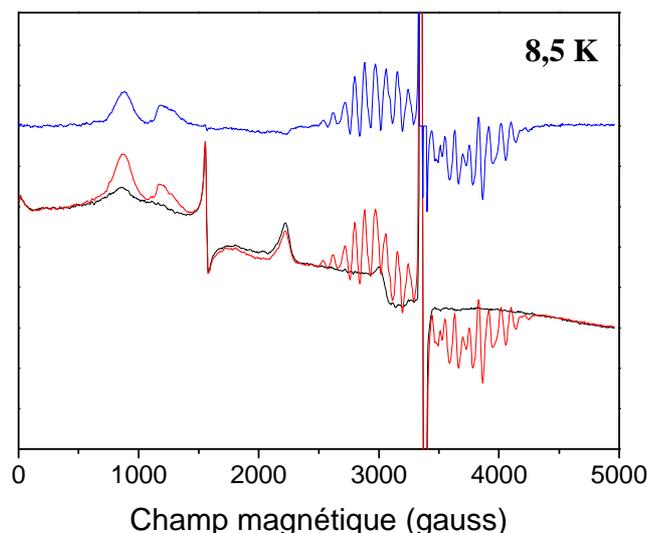


Figure 65 : Spectre RPE d'un échantillon de PSII Ca/Cl enregistré à 8,5 K. L'échantillon a été adapté à l'obscurité durant 1 heure à température ambiante, préflashé, puis adapté à nouveau à l'obscurité pendant une heure à température ambiante. 0,5 mM de PPBQ dissous dans du DMSO sont ajoutés avant congélation à 77 K (azote liquide) et enregistrement des spectres. Le spectre en noir correspond au spectre de l'échantillon de PSII adapté à l'obscurité après ajout de PPBQ, le rouge à celui après éclaircissement à 200 K, et le spectre bleu est le spectre de différence. Les autres paramètres d'enregistrement sont les suivants : amplitude de modulation : 25 G ; puissance micro-ondes : 20 mW, fréquence micro-ondes : 9,4 GHz ; fréquence de modulation : 100 kHz.

iii. Spectre à 15 K

A la température de 15 K (Figure 66), on observe préférentiellement les cytochromes *c550* et *b559* dans leur état oxydé. Trois signaux sont attribués aux résonances g_x , g_y et g_z du cytochrome *c550*: à $g_x = 1,49$ (4800 gauss, difficilement observable), $g_y = 2,24$ (2920 gauss) et $g_z \approx 2,97$ (2230 gauss). En cas d'oxydation du *cyt b559* dans certaines conditions, il est visible par un épaulement qui apparaît à $g = 3,02$. Le rôle du cytochrome *b559* dans le PSII n'est pas bien défini, il jouerait un rôle dans le voie secondaire de transfert d'électron protégeant le PSII contre des dommages induits par des conditions de photoinhibition (cf. Chapitre I). Le cytochrome *c550* (qui n'est trouvé que chez les cyanobactéries et certaines algues mais pas chez les plantes) serait important pour l'intégrité du PSII mais son rôle spécifique n'est pas clair. En principe, les spectres RPE devraient montrer à la fois les signaux *cyt b559* et *cyt c550*. Cependant, une étude a montré que le *cyt b559* est principalement réduit à l'obscurité et donc indétectable par RPE, tandis que le *cyt c550* qui a un bas potentiel est oxydé et visible par RPE.

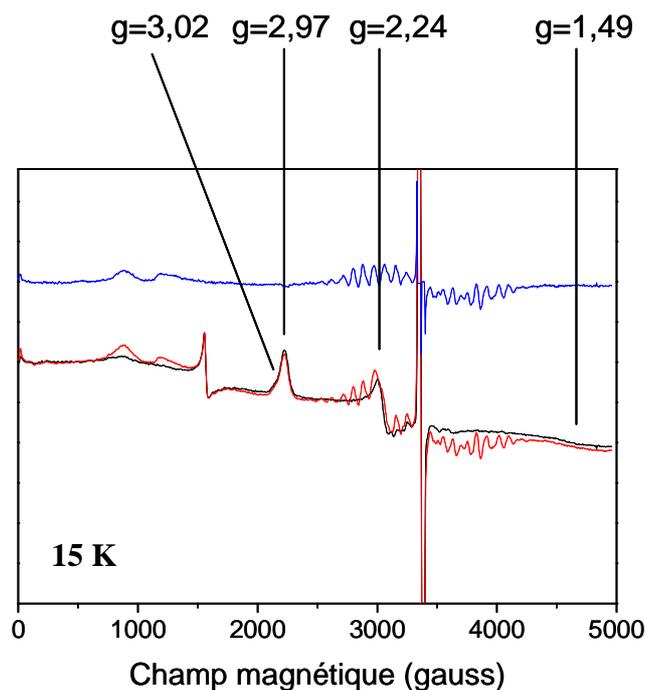


Figure 66 : Spectre RPE d'un échantillon de PSII Ca/Cl enregistré à 15 K. L'échantillon a été adapté à l'obscurité durant 1h à température ambiante, préflashé, puis adapté à l'obscurité pendant 1h à température ambiante. 0,5 mM de PPBQ dissous dans du DMSO sont ajoutés avant congélation à 77 K et enregistrement des spectres. Le spectre en noir correspond au spectre de l'échantillon adapté à l'obscurité après ajout de PPBQ, le rouge à celui après éclairage à 200 K, et le spectre bleu est le spectre de différence. Les autres paramètres d'enregistrement sont : amplitude de modulation : 25 G ; puissance micro-ondes : 5 mW, fréquence micro-ondes : 9,4 GHz ; fréquence de modulation : 100 kHz.

Nous avons enregistré les spectres RPE des quatre types d'échantillons substitués biosynthétiquement Ca/Cl, Ca/Br, Sr/Cl et Sr/Br dans différentes conditions, pour favoriser l'observation des différents signaux : à 4 K, à 8,5 K et à 15 K. Les échantillons ont été préflashés pour avoir le maximum de centres dans l'état S_1 après adaptation à l'obscurité.

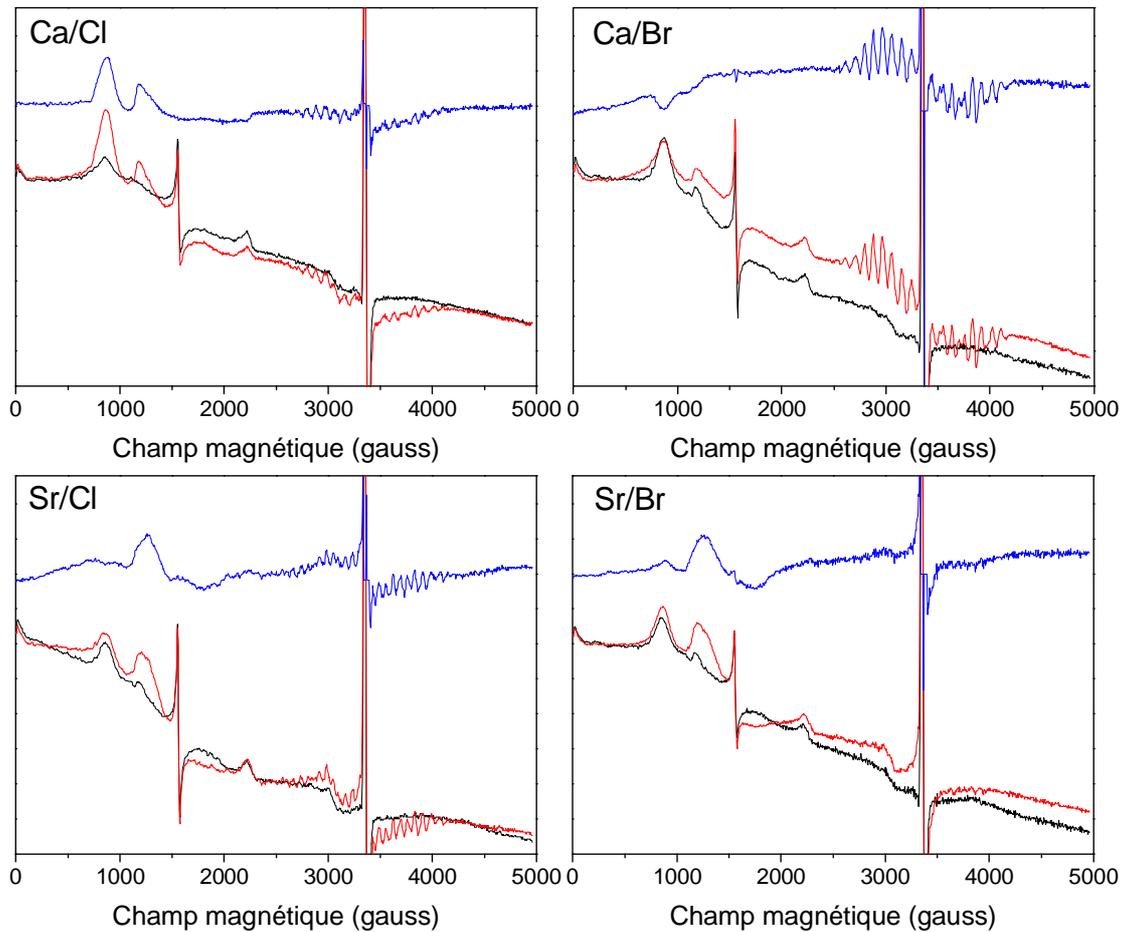
b) Spectres à 4 K

Figure 67 : Spectres RPE des quatre types d'échantillons dans l'état S_2 enregistrés à 4 K. En noir, le spectre enregistré après adaptation à l'obscurité, en rouge le spectre enregistré après éclaircissement à 200 K et en bleu, le spectre de différence. Paramètres : amplitude de modulation : 25 G ; puissance micro-ondes : 20 mW, fréquence micro-ondes : 9,4 GHz ; fréquence de modulation : 100 kHz.

Nous pouvons commencer par observer le signal du Fe^{III} associé aux quinones Q_A et Q_B . On observe une diminution du signal Fe^{III} après éclaircissement à $g = 7,9$ et $5,6$ pour l'échantillon Ca/Br. En se référant à la Figure 63, on peut en déduire que la majorité des centres se trouvait dans l'état $Q_A Fe^{II} Q_B^-$ après adaptation à l'obscurité et avant ajout de PPBQ. Pour les échantillons Ca/Cl, Sr/Cl et Sr/Br, on observe au contraire une augmentation du signal du Fe^{III} après éclaircissement à $g = 7,9$ et $5,6$, ce qui nous montre que la majorité des centres se trouvait dans l'état $Q_A Fe^{II} Q_B$ après adaptation à l'obscurité et avant ajout de PPBQ. Le rapport Q_B^-/Q_B est donc supérieur à 1 dans l'échantillon Ca/Br et inférieur ou égal à 1 dans les trois autres échantillons. C'est un paramètre difficilement maîtrisable, qui varie d'une préparation de PSII à l'autre. Le signal multilignes est observé dans les échantillons Ca/Br et

Sr/Cl, mais à la température de 4K et avec la puissance micro-ondes utilisée, il est saturé donc ne nous pouvons rien conclure sur son amplitude.

c) Spectres à 8,5 K

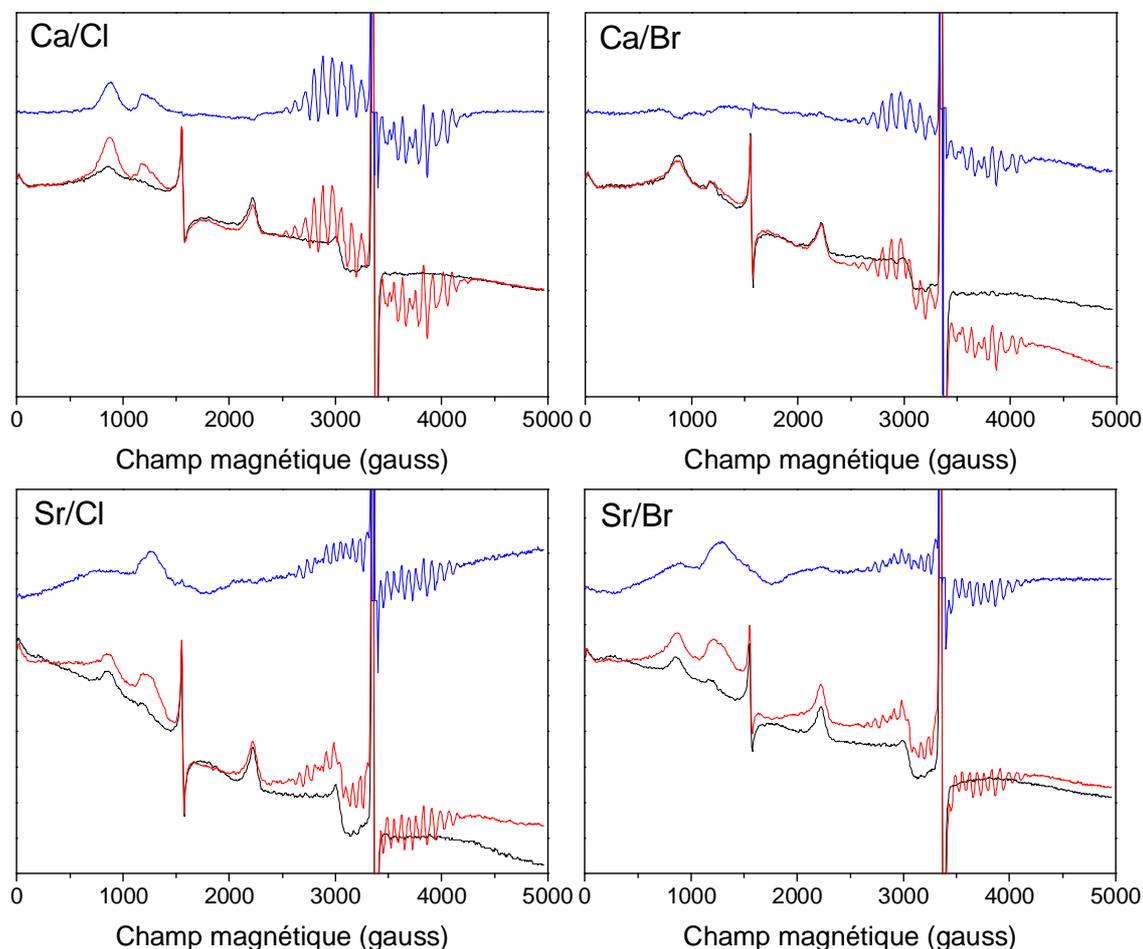


Figure 68 : Spectres RPE des quatre types d'échantillons dans l'état S_2 enregistrés à 8,5 K. En noir, le spectre enregistré après adaptation à l'obscurité, en rouge le spectre enregistré après éclaircissement à 200K et en bleu, le spectre de différence. Paramètres : amplitude de modulation : 25 G ; puissance micro-ondes : 20 mW, fréquence micro-ondes : 9,4 GHz ; fréquence de modulation : 100 kHz.

A 8,5 K, on observe le signal multilignes. On retrouve bien l'existence d'un signal multilignes modifié en présence de Sr^{2+} . Le signal multilignes Sr^{2+} est identique à celui déjà décrit auparavant dans du PSII de plantes déplété en Ca^{2+} et reconstitué en Sr^{2+87} , et dans du PSII de *T. elongatus* Sr/Cl biosynthétique¹¹⁰.

On observe également un peu de signal à $g = 4,1$ dans les spectres des échantillons Sr/Cl et Sr/Br. Ceci a déjà été observé dans du PSII de plantes déplété en Ca^{2+} et reconstitué en Sr^{2+87} .

On observe Figure 68 que l'amplitude du signal multilignes est plus petite dans les échantillons substitués que dans le PSII contrôle Ca/Cl. Ceci pourrait s'expliquer par la présence de centres morts dans les échantillons modifiés. Les centres morts sont visibles par RPE après éclaircissement à 200 K, ils exhibent un signal à $g = 2,0025-2,0035$ d'une largeur de 10 G. Ce signal correspond à un caroténoïde et une chlorophylle oxydée dans la voie secondaire de transfert d'électrons. Leur signal se superpose à celui de la Tyr_D^\bullet à $g = 2$. Nous avons donc enregistré les spectres RPE des échantillons Ca/Br et Sr/Cl dans une région spectrale commune à celle de la Tyr_D (Figure 69). Nous n'observons pas de radical dont le signal viendrait se superposer au signal de la Tyr_D^\bullet .

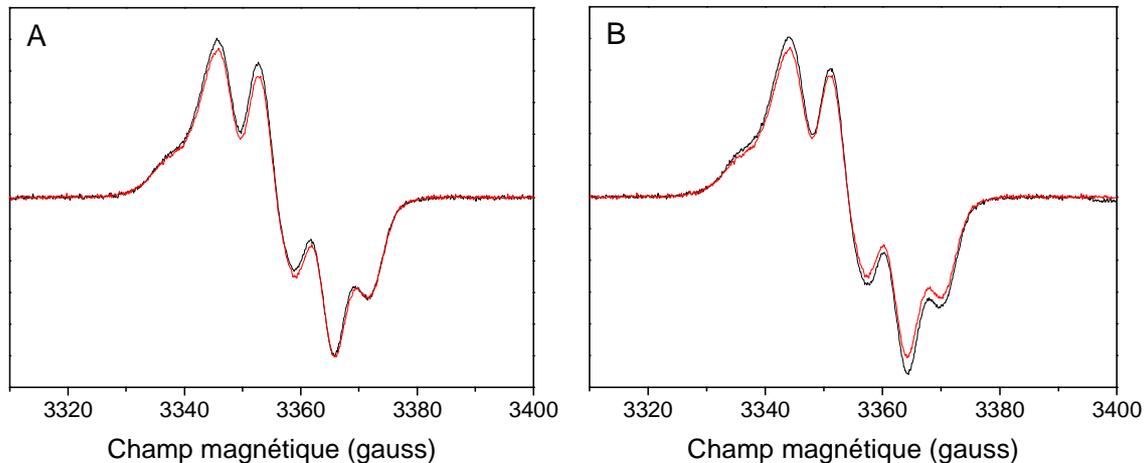


Figure 69 : Spectres RPE de Tyr_D^\bullet de PSII Ca/Br (panneau A) et Sr/Cl (panneau B). En noir, avant éclaircissement et en rouge, après éclaircissement à 200K. Paramètres : amplitude de modulation : 2,8 G ; puissance micro-ondes : 2 μW , fréquence micro-ondes : 9,4 GHz ; fréquence de modulation : 100 kHz.

La RPE confirme donc qu'il n'y a pas de centres morts après substitution des cofacteurs, comme nous l'avons montré précédemment.

d) Spectres à 15 K

A la température de 15 K et avec une faible puissance micro ondes, on suit le comportement des deux cytochromes du PSII, le cytochrome *b559* et le cytochrome *c550* oxydés¹⁷⁷. On n'en observe pas d'épaulement à $g = 3,02$ (Figure 70) donc le cytochrome *b559* n'est donc pas oxydé.

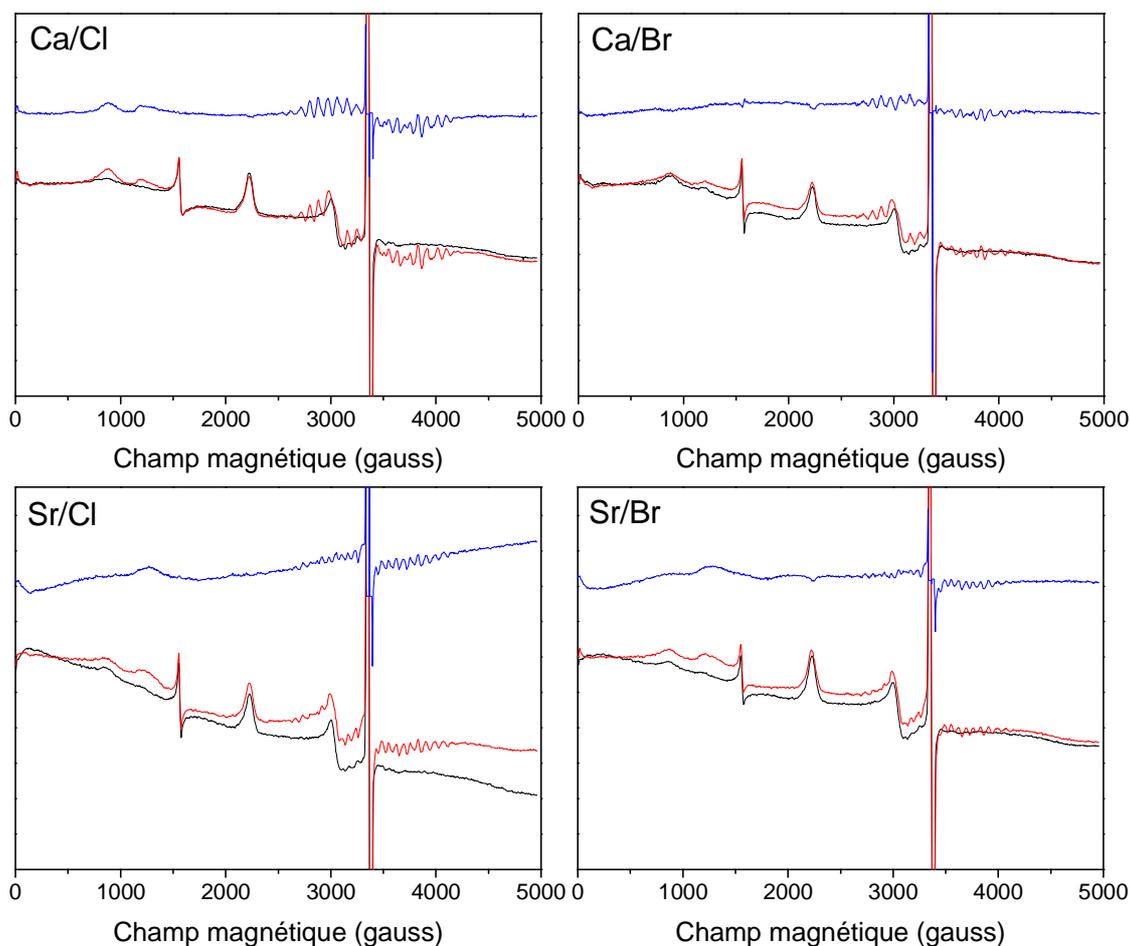


Figure 70 : Spectres RPE des quatre types d'échantillons dans l'état S_2 enregistrés à 15 K. En noir, le spectre enregistré après adaptation à l'obscurité, en rouge le spectre enregistré après éclaircissement à 200K et en bleu, le spectre de différence. Paramètres : amplitude de modulation : 25 G ; puissance micro-ondes : 5 mW, fréquence micro-ondes : 9,4 GHz ; fréquence de modulation : 100 kHz.

L'analyse RPE des échantillons biosynthétiquement modifiés nous a permis de montrer l'absence de centres morts dans les échantillons substitués. On observe bien la modification du signal multilignes comme attendu en présence de Sr^{2+} . Aucun effet supplémentaire n'est induit par la substitution des cofacteurs.

III) Discussion

Par cette étude sur les effets cinétiques et thermodynamiques des substitutions biosynthétiques du chlorure par le bromure, nous avons cherché à montrer l'implication du chlorure dans le mécanisme d'oxydation de l'eau.

Nous avons montré que des cellules de la cyanobactérie *T. elongatus* sont parfaitement capables de pousser dans des conditions modifiées pour incorporer au sein du PSII du bromure à la place du chlorure, et ceci soit en présence de calcium soit en présence de strontium.

Nous avons commencé par montrer que le dégagement d'oxygène sous éclaircissement continu de PSII ou de cellules ayant incorporé biosynthétiquement les cofacteurs Br^- et/ou Sr^{2+} était diminué par rapport à un échantillon contrôle Ca/Cl. Cette baisse pouvait être due soit à la présence de centres morts dans le PSII, soit au ralentissement d'une étape du cycle catalytique du PSII. La vitesse de dégagement d'oxygène ayant lieu durant la transition S_3 à S_0 est fortement ralentie en présence des cofacteurs substitués. Ce ralentissement de la transition S_3 à S_0 a ensuite été confirmé par les mesures des cinétiques à 292 nm, ainsi que par les mesures des cinétiques de dégagement d'oxygène. Une phase de délai a été mise en évidence durant la transition $\text{S}_3\text{Tyr}_Z \rightarrow \text{S}_0\text{Tyr}_Z$. Cette phase de délai est attribuée à des réarrangements structuraux de l'état $\text{S}_3\text{Tyr}_Z^{*169,170,171}$. Nous arrivons ainsi à mettre en évidence l'existence d'un intermédiaire réactionnel au cours de la transition, grâce au ralentissement dû à l'échange des cofacteurs Ca^{2+} et Sr^{2+} .

Nous avons ensuite étudié par spectroscopie les cinétiques liées au transfert de protons qui a lieu dans la centaine de μs après la réduction de P_{680}^{*+} par Tyr_Z . A 433 nm, le transfert d'électrons pur entre P_{680}^{*+} et Tyr_Z (jusqu'à 20 ns) n'est pas modifié par les substitutions. Par contre, les cinétiques qui ont lieu de 0,1 à 100 μs et qui correspondent aux phénomènes de relaxation liés au mouvement de protons, sont ralenties par la substitution $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ mais pas Cl^-/Br^- . Les cinétiques du shift électrochromique (à 440-424 nm) de 10 μs à 100 ms après le flash sont également ralenties suite à la substitution du Ca^{2+} par le Sr^{2+} . Pour la transition $\text{S}_3 \rightarrow \text{S}_0$, une première phase rapide est observée, correspondant à une modification de l'environnement électrostatique de la chlorophylle P_{680} . Cette phase a un $t_{1/2}$ qui correspond au $t_{1/2}$ de la phase de lag observée à 292 nm. Une deuxième phase plus lente correspond à la phase $(\text{S}_3\text{Tyr}_Z)^*$ à S_0Tyr_Z . Les cinétiques du shift électrochromique nous ont permis

d'estimer le $t_{1/2}$ de la transition $S_2\text{Tyr}_Z^{\bullet} \rightarrow S_3\text{Tyr}_Z$ alors que nous n'avions pas pu le faire à 292 nm à cause de la variation d'absorption trop faible. Ce $t_{1/2}$ est de $\sim 150 \mu\text{s}$ pour Ca/Cl et $\sim 200 \mu\text{s}$ pour Sr/Cl.

L'une des premières études qui atteste de l'existence du lag¹⁷⁰ a été réalisée dans du PSII d'une cyanobactérie thermophile, par mesure des cinétiques des transitions $S_i \rightarrow S_{i+1}$ dans l'ultraviolet à température ambiante. Cette phase a été interprétée comme une contribution de l'augmentation d'absorption due aux transitions $S_2 \rightarrow S_3$ et $S_1 \rightarrow S_2$ d'une petite population de centres PSII (25%). Ce lag a ensuite à nouveau été observé par Rappaport et al.¹⁶⁹ par mesure des cinétiques d'absorption à 292 nm dans du PSII de plante. Il a été attribué cette fois-ci à l'existence d'une contrainte électrostatique suite à la formation de $S_3\text{Tyr}_Z^{\bullet}$ qui cause l'expulsion d'un proton depuis le centre catalytique avec un $t_{1/2}$ de $30 \mu\text{s}$. La relaxation électrostatique décroît le potentiel redox du centre catalytique, permettant à la réduction de Tyr_Z^{\bullet} d'avoir lieu (réaction de 1,2 ms). Des mesures d'oxymétrie RPE ont également permis la détection de ce lag¹⁷¹. L'oxymétrie RPE est basée sur l'effet de l'oxygène moléculaire, en tant qu'espèce paramagnétique, sur les spectres de radicaux stables. Le lag ($t_{1/2}$ 100-200 μs) a été observé dans des thylakoides exposés à des conditions particulières : pH 6,0 ou 0,8 mM NaCl. Dans des conditions plus optimales, il a été estimé que le $t_{1/2}$ est inférieur à 50 μs . En accord avec les résultats de Rappaport et al.¹⁶⁹, le modèle suivant a été proposé :

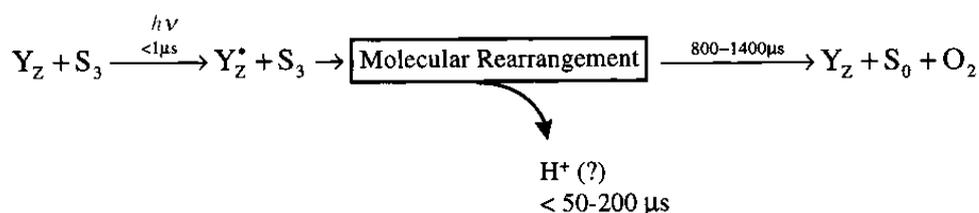


Figure 71 : Modèle de formation de O_2 durant la transition $S_3 \rightarrow S_0$, basé sur les résultats de Razeghifard¹⁷¹ et Rappaport¹⁶⁹. (Tiré de référence 171)

Enfin, une expérience de spectroscopie aux rayons X résolue en temps¹⁷² a reporté l'existence du lag durant la transition $S_3 \rightarrow S_0$ avec un $t_{1/2}$ de 250 μs . A nouveau, il a été proposé que l'oxydation de la tyrosine Tyr_Z induit électrostatiquement une réaction de déprotonation, réaction qui est prérequis pour la réduction de Tyr_Z^{\bullet} . Sur la base des structures cristallographiques, il est envisageable que l'espèce déprotonée soit l'Arg357 de la protéine CP43 (Figure 72).

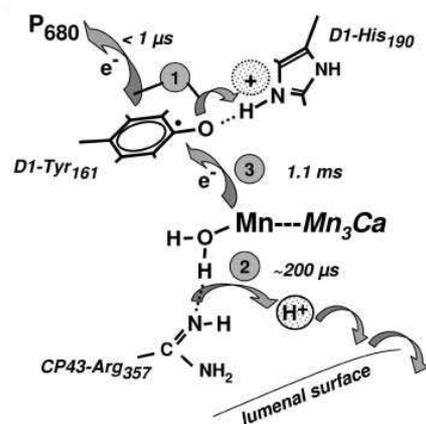


Figure 72 : Modèle proposé par Haumann et al.¹⁷² montrant la formation d'un état intermédiaire durant le lag (~200 μ s) avant la réduction de la tyrosine Tyr_Z' (1,1 ms). (1) L'absorption d'un photon est suivie par l'oxydation de Tyr_Z en moins de 1 μ s, processus couplé à la déprotonation de Tyr_Z vers le résidu His190 de la sous-unité D1. (2) Le charge positive localisée sur Tyr_Z' provoque la déprotonation de l'Arg357 de la sous-unité CP43. (3) La formation de (S₃Tyr_Z') est suivie par le transfert d'électron à Tyr_Z'.

En considérant ce modèle, on peut proposer que le Sr²⁺ a pour effet d'augmenter la valeur du pK du groupe qui est déprotoné durant le lag. Ceci est à confirmer par une mesure des cinétiques électrochromiques et de leurs amplitudes en fonction du pH.

Nous avons étudié l'étape suivante de la transition S₃ à S₀, à savoir (S₃Tyr_Z') → S₀ en mesurant l'énergie d'activation dans nos échantillons mono-substitués Ca/Br et Sr/Cl et dans l'échantillon contrôle Ca/Cl. Les données sont présentées dans le Tableau 12, ainsi que les valeurs trouvées dans la littérature qui ont été mesurées sur des échantillons de PSII provenant d'une autre cyanobactérie thermophile *Synechococcus vulcanus*¹⁷⁰, ou d'épinards¹⁷⁸. Dans les données de la littérature, la représentation d'Arrhenius pour la transition S₃ à S₀ est composée de deux lignes droites qui se coupent à une température caractéristique T_c. L'existence de ce point de cassure au niveau de la représentation d'Arrhenius a été interprétée comme l'existence de deux états conformationnels différents du complexe d'oxydation de l'eau dans l'état S₃ en dessous et au-dessus de la température critique T_c. Dans notre cas, du fait que nous n'avons déterminé la valeur de l'énergie d'activation qu'à partir de trois températures 5°C, 21°C et 40°C, nous ne pouvons l'observer, ni exclure la possibilité qu'elle existe également chez *T. elongatus*.

E _A (kJ/mol)				
<i>T. elongatus</i>		<i>S. vulcanus</i>	Epinards	
Ca/Cl	43	16	21	T < T _c
Ca/Br	35	59	67	T > T _c
Sr/Cl	23			

Tableau 12 : Energies d'activation de la transition S₃ à S₀ pour *T. elongatus*, *S. Vulcanus* (Koike et al., 1987), et des épinards (Karge et al., 1997). T_c = 16°C pour *S. vulcanus* et 6°C pour les épinards.

La valeur trouvée pour l'échantillon contrôle Ca/Cl est d'un ordre de grandeur comparable à celles déterminées dans les autres espèces. Les valeurs des énergies d'activation ne sont pas dépendantes de la thermophilie. Elles sont donc intrinsèques au mécanisme. La baisse des valeurs des énergies d'activation dans les échantillons substitués implique que le changement structural ayant lieu durant la transition (S₃Tyr_Z)' → S₀ est moins significatif que dans l'échantillon contrôle. Pour confirmer ce résultat, nous avons réalisé une étude de la température d'inhibition de la transition S₃ à S₀, dont nous présenterons les résultats dans le chapitre V.

Plusieurs expériences récentes reposent sur la capacité à inverser la réaction d'oxydation de l'eau en augmentant la pression en O₂. En effet, on peut tenter de ralentir la transition S₃ à S₀ pour piéger des intermédiaires en augmentant la concentration en produit de la réaction. Différentes valeurs ont été trouvées pour estimer la valeur de la force motrice nécessaire pour réaliser la transition S₃Tyr_Z/S₄ à S₀ + O₂ : une première valeur de 80 meV^{179,180} et une deuxième valeur de 130 meV¹⁸¹. Nous avons reporté sur la Figure 73 les valeurs de niveaux d'énergie que nous connaissons d'après la littérature¹⁸², pour l'échantillon contrôle Ca/Cl (en noir) entre l'état P⁺S₃Tyr_Z et l'état PS₀Tyr_Z. La perte d'énergie libre associée à l'oxydation de la tyrosine Z est estimée à 20-40 meV¹⁸². Celle associée à l'étape de déprotonation durant le lag est estimée à 110 meV à pH 6,4¹⁸².

Par thermoluminescence, nous avons déterminé que le niveau d'énergie libre de PS₃Tyr_Z baissait de 60 meV pour l'échantillon Sr/Br (le cas de l'échantillon Sr/Br est représenté en vert sur la Figure 73). Nous supposons dans le schéma que P⁺ n'a pas d'effet sur le niveau d'énergie de S₃. Concernant l'étape suivante d'oxydation de la tyrosine Z, nous avons montré que les phases μs associées à la réduction de P₆₈₀⁺ étaient ralenties par l'échange Ca²⁺/Sr²⁺ (cinétiques à 433 nm), d'un facteur environ égal à 2. En émettant l'hypothèse que la vitesse de réaction inverse n'est pas modifiée, on peut en déduire que

l'écart d'énergie entre $P^+S_3Tyr_Z(H^+)$ et $PS_3Tyr_Z(H^+)$ est diminué de 20 meV en présence de Sr^{2+} . Concernant la phase suivante de lag, son $t_{1/2}$ passe de 115 ms pour Ca/Cl à 230 ms pour Sr/Br. On peut estimer d'après ce ralentissement d'un facteur 2 que la perte d'énergie associée à la déprotonation de la base adjacente passe de 110 meV pour Ca/Cl à 90 meV pour Sr/Br (en supposant à nouveau que la vitesse de la réaction inverse n'est pas modifiée).

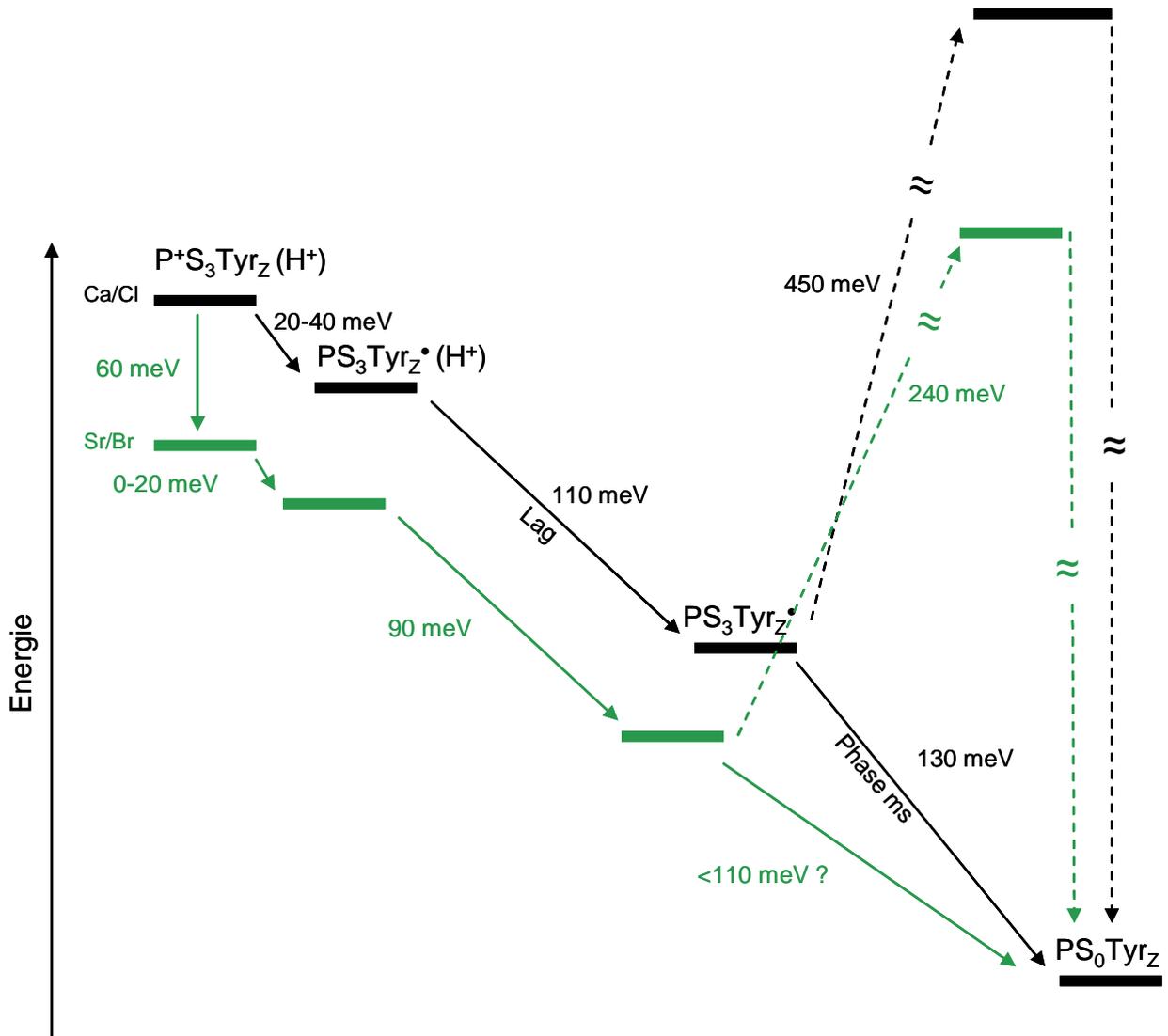


Figure 73 : Transfert d'électrons du côté donneur dans le photosystème II, durant la transition S_3 à S_0 . En noir, est représenté le cas de l'échantillon Ca/Cl, d'après les données de la littérature. En vert, est représenté Sr/Br en prenant en compte la baisse de niveau d'énergie libre de S_3Tyr_Z de 60 meV (estimée suite aux mesures de thermoluminescence). L'état $S_3Tyr_Z(H^+)$ correspond à l'état intermédiaire après l'oxydation de Tyr_Z mais avant la déprotonation de la base adjacente (H^+ représente le proton de la base adjacente à la tyrosine Z).

En baissant le niveau d'énergie libre de $P^+S_3Tyr_Z(H^+)$, on abaisse également la valeur de la force disponible pour réaliser l'oxydation de l'eau. On se rend compte que la valeur

estimée par la méthode simplifiée de Ducruet de 110 meV est trop grande pour être considérée, il resterait trop peu d'énergie pour réaliser l'oxydation de l'eau. La baisse du niveau d'énergie libre de $S_3\text{Tyr}_Z^*/S_4$ de 60 meV associé à une force de 80-130 meV pour réaliser l'oxydation de l'eau devrait résulter en l'accumulation d'une quantité détectable de $S_3\text{Tyr}_Z^*/S_4$ visible par augmentation de l'amplitude de la phase ms associée à l'oxydation de l'eau, ce qui n'est pas le cas dans notre expérience. Nous penchons donc plutôt en faveur de la valeur de 130 meV. Pour l'échantillon Sr/Br, la valeur de la force motrice pour réaliser l'oxydation de l'eau serait donc inférieure à 110 meV.

Malgré l'incertitude sur les valeurs des niveaux d'énergie mis en jeu, nous pouvons conclure que les cofacteurs modulent le niveau d'énergie de S_3 pour maintenir un équilibre énergétique. Le système doit avoir une énergie assez faible pour éviter les phénomènes de recombinaison, mais cependant suffisante pour réaliser l'oxydation de l'eau (Figure 74).

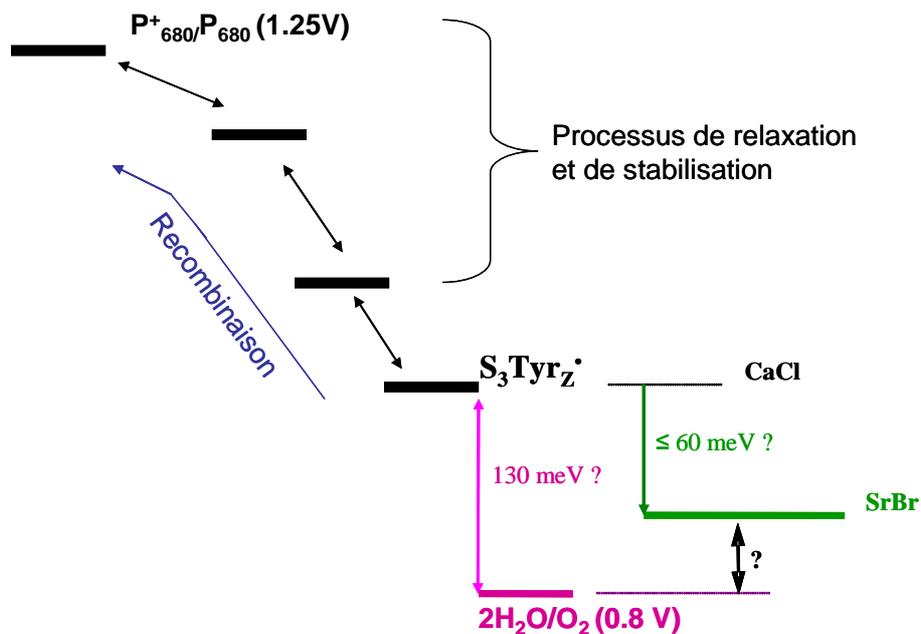


Figure 74 : La baisse du niveau d'énergie libre de $S_3\text{Tyr}_Z^*/S_4$ de 60 meV associé à une force de 80-130 meV pour réaliser l'oxydation de l'eau devrait résulter en l'accumulation d'une quantité détectable de $S_3\text{Tyr}_Z^*/S_4$.

Chapitre IV. ECHANGE BIOCHIMIQUE DU CHLORURE

I) Mise au point d'un protocole d'échange biochimique

1) Introduction

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre I, l'iodure I^- est un halogénure qui peut remplacer le chlorure dans le PSII. Les résultats présents dans la littérature à ce sujet sont parfois assez contradictoires, c'est pourquoi nous nous y sommes intéressés. Parallèlement, nous avons étudié le remplacement du chlorure par le fluorure F^- qui est un inhibiteur connu du dégagement d'oxygène. Nous avons voulu dans un premier temps connaître les propriétés d'échangeabilité du Cl^- . La question était de savoir dans quelles conditions on peut remplacer le bromure Br^- d'un échantillon de thylakoides ou de PSII biosynthétique, par du Cl^- , ou vice-versa. Pour définir les conditions de l'échange, nous nous sommes servis des propriétés des échantillons substitués que nous avons mises en évidence dans le chapitre précédent, en particulier les cinétiques de dégagement d'oxygène, les courbes de thermoluminescence et les cinétiques de réduction de Tyr_Z^* dans l'UV dans l'état S_3 .

2) Dans des thylakoides

a) Comparaison des résultats obtenus sur les deux types d'électrode (45 minutes)

Nous avons dans un premier temps analysé les vitesses de dégagement d'oxygène des quatre échantillons biosynthétiques sur les deux types d'électrode Pt/Ag/AgCl et Pt/Ag/AgBr (Figure 56) que nous avons présentées dans le chapitre précédent. La comparaison des résultats sur les deux électrodes nous montre que l'incubation des thylakoides Sr/Br, dans un milieu contenant du Cl^- et des thylakoides Sr/Cl dans un milieu contenant du Br^- , durant les 45 minutes nécessaires pour l'adaptation à l'obscurité des échantillons, n'entraîne aucune modification des cinétiques de dégagement d'oxygène. L'anion présent en grande quantité dans le milieu circulant ne paraît pas avoir d'incidence sur la vitesse de dégagement d'oxygène quel que soit l'échantillon considéré. Pour les thylakoides Sr/Br, sachant que nous déposons sur l'électrode de Pt 25 μ L d'un échantillon contenant 60 mM de Br^- , et que le milieu circulant contient 110 mM de Cl^- pour un volume total de 250 mL, la concentration en

sels de Br^- et de Cl^- est estimée respectivement à $6 \mu\text{M}$ et 110 mM , et vice versa pour les thylakoides Sr/Cl. Du fait que l'échange Cl/Br affecte très fortement la vitesse de dégagement d' O_2 dans les échantillons contenant du Sr^{2+} , nous pouvons conclure de la Figure 56 que durant le temps de l'expérience (environ 1 heure), aucun échange Cl/Br n'a eu lieu dans les thylakoides Sr/Br et Sr/Cl. Nous allons donc maintenant tester une durée d'échange plus longue.

b) Résultats de thermoluminescence : 5 heures

Pour tester un temps d'échange plus long, nous avons ensuite réalisé des mesures de thermoluminescence car les résultats précédents ont montré que les températures de recombinaison $\text{S}_2\text{Q}_\text{B}^-$ et $\text{S}_3\text{Q}_\text{B}^-$ étaient plus élevées dans l'échantillon Sr/Br que Sr/Cl. C'est donc un bon moyen pour sonder la présence de Cl^- ou de Br^- au niveau du site catalytique.

Les mesures ont été réalisées sur un échantillon de thylakoides Sr/Br qui a été séparé en deux parties aliquotes, l'une lavée dans du tampon Br^- (échantillon contrôle) et l'autre lavée dans du tampon Cl^- . Le lavage consiste à diluer $75 \mu\text{L}$ d'échantillon dans 15 mL de TP1 contenant 60 mM de Cl^- (ou Br^- pour le contrôle). Après centrifugation, le culot est resuspendu dans du TP1. Après deux lavages d'une durée de 2 heures chacun, suivis d'une heure d'adaptation à l'obscurité, les échantillons ont été flashés une ou deux fois, puis la thermoluminescence mesurée.

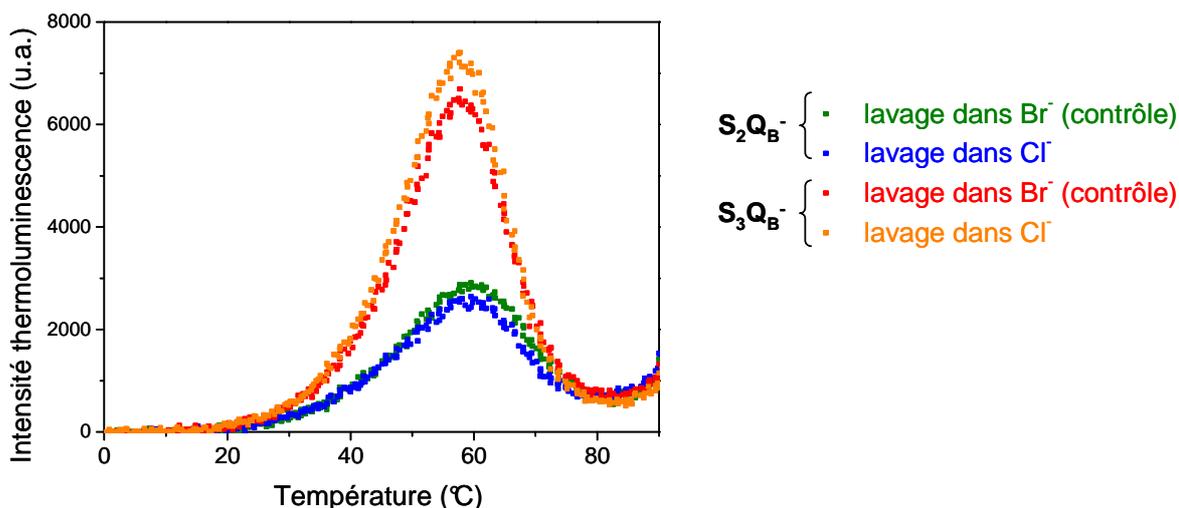


Figure 75 : Courbes d'émission de thermoluminescence provenant de la recombinaison $\text{S}_2\text{Q}_\text{B}^-$ après un flash et $\text{S}_3\text{Q}_\text{B}^-$ après deux flashes, d'un échantillon de thylakoides Sr/Br lavé dans une solution contenant 60 mM de Cl^- (courbes bleue et orange) ou Br^- (courbes verte et rouge). Les échantillons ont été préalablement adaptés à l'obscurité à température ambiante avant la mesure.

On voit sur la Figure 75 que les deux types d'échantillons de thylakoides Sr/Br, lavés dans Cl^- et lavé dans Br^- , présentent la même température de recombinaison, aussi bien après un flash qu'après deux flashes. Cela laisserait penser qu'après 5 heures, l'échange Cl/Br n'a toujours pas eu lieu. Nous allons donc tester un temps d'échange encore plus long, en utilisant à nouveau comme sondes les cinétiques de dégagement d'oxygène (le montage de thermoluminescence n'étant plus disponible au moment de cette expérience).

c) Electrode résolue en temps : purification de cellules Sr/Br dans milieu Cl^-

Nous avons réalisé une préparation de thylakoides Sr/Br avec des solutions contenant 60 mM de Cl^- , c'est-à-dire que les cellules *T. elongatus* ont été poussées en présence de Sr/Br, puis toute la procédure de purification a été réalisée avec du Cl^- , ce qui correspond à une durée d'environ 5 heures en présence de Cl^- .

La Figure 76 présente la courbe de dégagement d'oxygène d'un tel échantillon de thylakoides appelé « Sr/Br dans TP Cl^- » (en rouge). Sont présentes également les courbes correspondant à deux échantillons contrôle Sr/Cl (en noir) et Sr/Br (en bleu) biosynthétiques n'ayant subi aucune modification après purification.

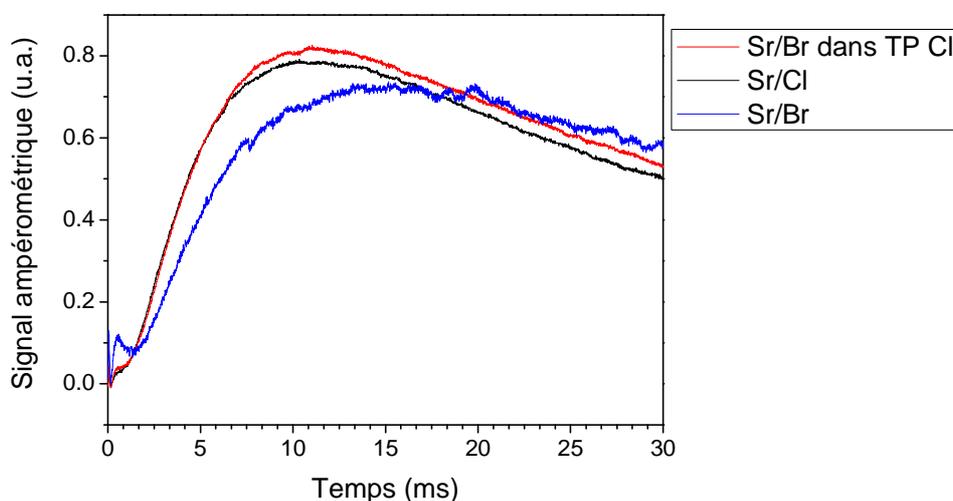


Figure 76 : Cinétiques de dégagement d'oxygène mesurées après le troisième flash. Les mesures ont été réalisées sur une électrode Pt/Ag/AgBr après le troisième flash donné à un échantillon de thylakoides ($\text{Chl} = 1 \text{ mg.mL}^{-1}$) adapté à l'obscurité. La préparation de l'échantillon « Sr/Br dans TP Cl^- » est décrite dans le texte.

On observe de façon très nette que l'échantillon de thylakoides « Sr/Br dans TP Cl^- » présente une vitesse de dégagement d'oxygène identique à celle de l'échantillon contrôle Sr/Cl. Il semblerait donc que le Br^- pourtant présent au début de la préparation puisque les

cellules ont été poussées dans un milieu contenant uniquement du Br^- , a ensuite été remplacé par le Cl^- au cours des 5 heures de purification des thylakoides. Il est difficile d'expliquer pourquoi il suffit de 5 heures dans cette expérience pour réaliser l'échange, alors que 4 heures n'étaient pas suffisantes dans l'expérience précédente (Figure 75). Il est possible que pour la Figure 75, les lavages n'aient pas été assez efficaces pour enlever tout le Br^- du milieu. Nous allons maintenant nous servir de ce résultat pour étudier l'échangeabilité Cl^-/Br^- dans le PSII.

3) Dans le PSII

Nous pouvons nous servir des résultats obtenus précédemment pour les cinétiques à 292 nm après le troisième flash, pour étudier l'échangeabilité Cl^-/Br^- dans le PSII. En effet, l'échantillon de PSII Sr/Br a une cinétique nettement ralentie par rapport à l'échantillon Sr/Cl (Figure 50).

Les échantillons de PSII testés ont été obtenus à la suite de la préparation de thylakoides décrits dans le paragraphe précédent. Les cellules ont été poussées en présence de Sr/Br, puis toute la procédure de purification a été réalisée avec Cl^- uniquement, ce qui correspond à une durée d'environ 30 heures en présence de Cl^- .

Les résultats sont présentés dans la

Figure 77. Avant la mesure des cinétiques d'absorption à 292 nm, le PSII est incubé durant 6 heures supplémentaires à température ambiante dans du tampon Cl^- (courbe verte), ou dans du tampon Br^- (courbe bleue). Nous réalisons également la mesure sur des échantillons contrôles : PSII Sr/Cl (courbe noire) et Sr/Br biosynthétiques « normaux » (courbe rouge).

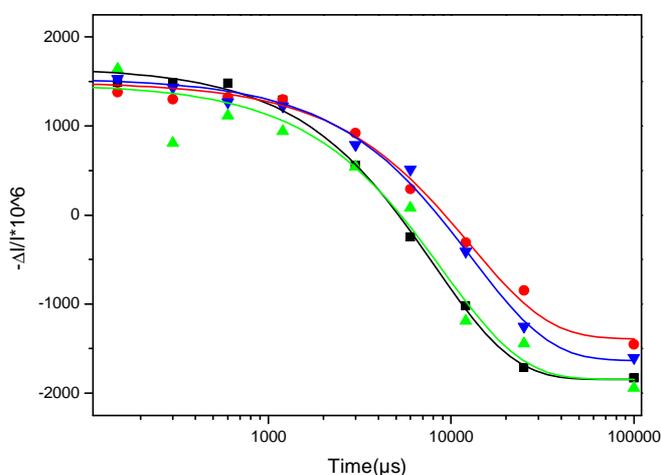


Figure 77 : Cinétiques de changements d'absorption à 292 nm après le troisième flash. En noir, l'échantillon contrôle Sr/Cl, en rouge l'échantillon contrôle Sr/Br, en vert, l'échantillon de PSII Sr/Br purifié dans du Cl^- et incubé 6 heures dans du tampon Cl^- , et en bleu l'échantillon de PSII Sr/Br purifié dans du Cl^- et incubé 6 heures dans du tampon Br^- .

Pour les échantillons contrôles, nous retrouvons les résultats précédents, à savoir une cinétique ralentie pour l'échantillon contenant du Br^- . L'échantillon incubé dans du tampon Cl^- (en vert) a une cinétique superposée à celle de l'échantillon Sr/Cl (en noir), ce qui laisse entendre que la procédure de purification de 30 heures suivie de 6 heures d'incubation dans le tampon contenant 60 mM de Cl^- est suffisante pour échanger le Br^- par du Cl^- . D'autre part, l'échantillon issu de la préparation spéciale, incubé 6 heures dans le tampon Br^- (en bleu) a une cinétique qui se trouve proche de celle de Sr/Br (en rouge). Il semblerait donc que procédure de ré-échange Cl^-/Br^- soit détectable.

4) Conclusion

Pour les thylakoides, nous avons montré que l'échange Br^-/Cl^- était total après 5 heures d'incubation dans un milieu contenant 60 mM de Cl^- .

Pour le PSII, nous avons montré qu'après 36 heures en présence de 60 mM de Cl^- sans Br^- dans le milieu, l'échange était complet. Nous avons au cours de la même expérience montré qu'après 6 heures d'incubation, l'échange Cl^-/Br^- avait débuté. On pourra donc trouver un compromis entre ces deux durées pour réaliser l'échange du Cl^- par d'autres halogénures : l'iodure et le fluorure.

Il est important de noter que l'échange a lieu à l'obscurité, c'est-à-dire dans l'état S_1 car il est fort possible que les propriétés d'échangeabilité varient en fonction de l'état S_n dans lequel se trouve le centre PSII.

II) Etude des propriétés de l'iodure

Nous avons dans un premier temps cherché à caractériser l'effet de la substitution du Cl^- par I^- sur l'activité du PSII, les valeurs rapportées dans la littérature étant peu concordantes (cf. Chapitre I). Pour avoir matière à comparaison, nous avons également substitué le Cl^- par F^- , qui est un inhibiteur connu du dégagement d'oxygène. Puis nous avons étudié les propriétés cinétiques de tels échantillons par RPE à température ambiante, par oxymétrie résolue en temps et par thermoluminescence.

1) Dégagement d'oxygène sous éclairage continu

Les mesures de dégagement d'oxygène sous éclairage continu sont réalisées sur du PSII. Des cellules de PSII ont été cultivées dans du milieu contenant du Cl^- , le PSII en a été extrait d'après la procédure de purification déjà décrite. Une fois déposé sur la colonne de Ni^{2+} , le PSII a été lavé avec la solution TP3 habituelle contenant du Cl^- durant toute la nuit, puis un deuxième lavage supplémentaire avec une solution contenant seulement $50 \mu\text{M}$ de Cl^- a été fait. L'éluion a ensuite été réalisée avec une solution ne contenant pas de Cl^- , ni d'autre halogénure. Après concentration de l'échantillon de PSII recueilli en bas de colonne, il a été réparti en 5 aliquots. Un aliquot a été conservé sans halogénure. Les autres ont été dilués dans une solution contenant 60 mM soit de Cl^- , soit de Br^- , soit d' I^- ou soit de F^- (Figure 78).

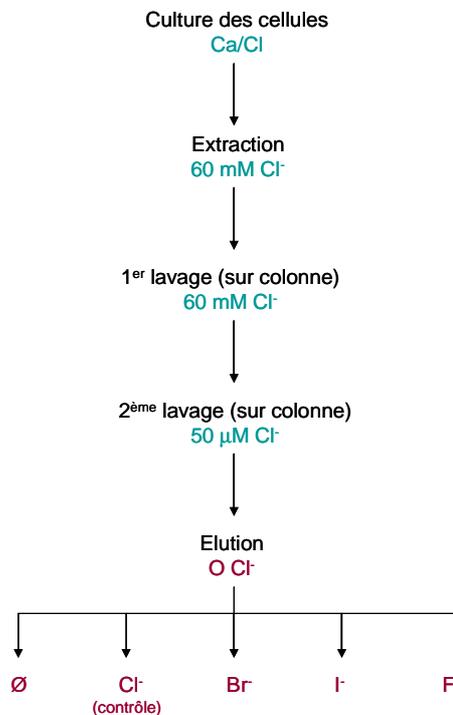


Figure 78 : Protocole de préparation des échantillons de PSII.

Nous avons ensuite mesuré le dégagement d'oxygène sous éclairage continu de ces échantillons dans les solutions contenant l'anion correspondant. Les résultats sont présentés Figure 79. La mesure d'activité a eu lieu soit immédiatement après la dilution dans le tampon (bâtons gris), soit après une incubation durant la nuit sur la glace (bâtons blanc). La référence 100% correspond à l'échantillon contrôle repris dans du tampon contenant 60 mM de Cl^- . Sa

valeur d'activité est de $4200 \mu\text{mol O}_2/\text{mg Ch}$. La valeur de l'activité de l'échantillon mesurée dans un tampon sans halogénure est de 80% (donnée non montrée).

L'activité de l'échantillon sans halogénure baisse relativement peu (80% de l'activité de l'échantillon contrôle). Deux hypothèses peuvent donc être émises à ce sujet : soit le chlorure n'est pas nécessaire à l'activité, soit le site de fixation du chlorure est de très forte affinité. Il serait alors possible que tous les sites de fixation au Cl^- ne soient pas libérés au cours de la procédure de lavage.

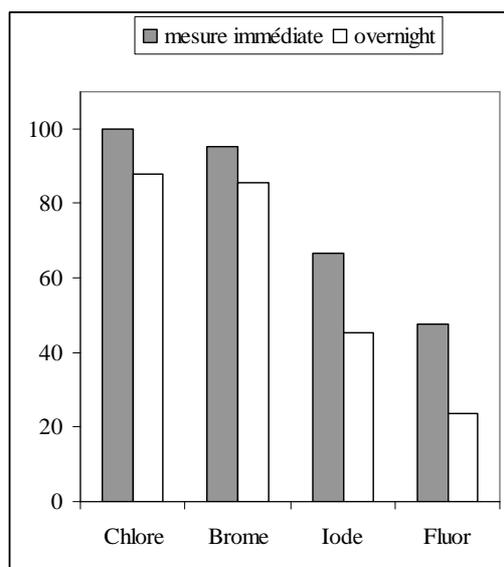


Figure 79 : Mesures d'activité d'échantillons de PSII qui ont été préparés selon la procédure décrite dans la Figure 78. L'activité a été mesurée dans un tampon contenant 60 mM de l'halogénure correspondant. La mesure a été réalisée soit immédiatement après dilution, soit après une incubation durant la nuit à l'obscurité.

On observe que l'activité décroît dans l'ordre suivant : $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{F}^-$, que la mesure soit faite avant ou après incubation. Les valeurs d'activité après incubation baissent peu pour les échantillons Cl^- et Br^- et dans les mêmes proportions (~ 90%). Pour l'échantillon Cl^- et vraisemblablement pour l'échantillon Br^- aussi, cette baisse peut être expliquée par une inhibition de l'échantillon lorsqu'on l'incube alors qu'il est déjà dilué. L'activité baisse de manière plus importante (50-60 %) pour les échantillons I^- et F^- , soit parce que l'effet de la dilution est plus important pour une dilution équivalente, soit à cause d'un effet spécifique à I^- et F^- que nous chercherons à caractériser par la suite.

Pour savoir si l'inhibition par I^- et F^- est réversible, nous avons replacé les échantillons repris dans le tampon I^- et F^- dans du tampon contenant 60 mM de Cl^- et mesuré leur activité soit immédiatement, soit après 2 heures d'incubation (Figure 80). Si l'inhibition est

réversible, nous saurons que les échantillons sont inhibés à cause d'un échange du Cl^- par I^- et F^- , et non pas d'un relargage des Mn.

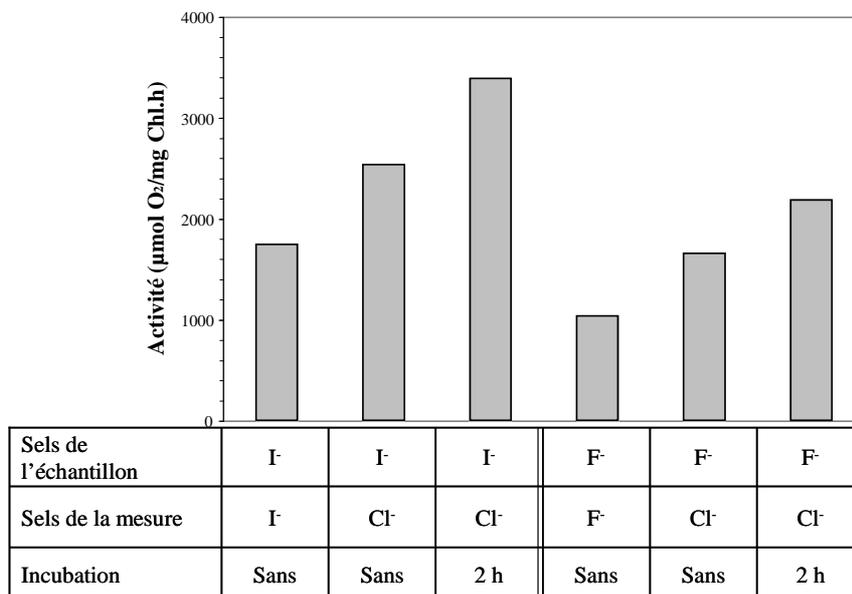


Figure 80 : Mesures d'activité d'un échantillon de PSII Ca/Cl qui a été mis dans du tampon contenant 60 mM de I^- ou F^- à la fin de la procédure de purification. Les mesures ont été réalisées soit immédiatement après avoir replacé les échantillons dans un tampon contenant 60 mM de Cl^- , soit après 2 heures d'incubation. Les mesures contrôles correspondent à une mesure dans le tampon contenant l'halogénure correspondant à l'échantillon (I^- ou F^-).

L'activité des échantillons I^- et F^- remonte en présence de Cl^- . Pour l'échantillon I^- , l'incubation de deux heures permet de retrouver un niveau de dégagement d' O_2 proche de celui d'un échantillon Ca/Cl contrôle (4200 $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl.h}$). La perte d'activité avec I^- à la place de Cl^- est donc un phénomène réversible. La réversibilité est moins importante avec le F^- . De la même manière que nous l'avons fait pour l'échange biosynthétique, nous allons étudier l'effet de l'échange biochimique du Cl^- par I^- , par différentes méthodes, pour tenter de mettre en évidence l'origine de la baisse d'activité. Seul l'échange avec I^- est désormais étudié car c'est celui qui présente les caractéristiques les plus intéressantes.

2) Cinétiques de déclin du radical TyrZ^\bullet

Premièrement, nous avons voulu étudier les cinétiques du côté donneur en mesurant la réduction du radical TyrZ^\bullet par le cluster de Mn_4Ca par RPE à température ambiante. Cette méthode nous permettra aussi d'estimer la proportion de centres inactifs pour le dégagement d'oxygène.

Les études des cinétiques de formation et de déclin des deux radicaux Tyr_Z^\bullet et Tyr_D^\bullet ont souvent été conduites sur du PSII déplété en Mn, car le déclin de Tyr_Z^\bullet est beaucoup plus long dans ce type de matériel. Le radical Tyr_Z^\bullet décline avec des valeurs de $t_{1/2}$ variant de 20-600 ms, alors que dans du PSII actif, les $t_{1/2}$ sont de 0,03-1ms. Comparé à Tyr_Z^\bullet , Tyr_D^\bullet est très stable : elle décline avec un $t_{1/2}$ dans un domaine de temps des plusieurs minutes à heures.

Les premières mesures de vitesse de réduction de la tyrosine Z par RPE à température ambiante ont été réalisées par Babcock et al.¹⁸³, qui ont montré que la vitesse variait en fonction de l'état d'oxydation du cluster de Mn_4Ca . Des études plus récentes ont montré que ces vitesses peuvent être altérées quand le complexe d'oxydation de l'eau est modifié chimiquement, biochimiquement ou génétiquement^{184,185,186}. Une étude qui nous intéresse particulièrement est celle qui concerne des membranes de PSII qui ont été déplétées en Ca^{2+} , puis reconstituées par du Sr^{2+} ¹⁸⁷. Les cinétiques de réduction de Tyr_Z^\bullet ont été déterminées dans deux conditions : 1) En les moyennant sur tous les états S_n . Ces cinétiques sont biphasiques. La phase rapide représente 50 % de l'amplitude totale et est attribuée aux transitions $\text{S}_1\text{Tyr}_Z^\bullet \rightarrow \text{S}_2\text{Tyr}_Z$ et $\text{S}_2\text{Tyr}_Z^\bullet \rightarrow \text{S}_3\text{Tyr}_Z$. La phase lente représente 35 % de l'amplitude totale et correspond à la transition $\text{S}_3\text{Tyr}_Z^\bullet \rightarrow \text{S}_0\text{Tyr}_Z$. Les 15 % d'amplitude restants sont attribués aux centres endommagés. L'échantillon reconstitué au Sr^{2+} a un $t_{1/2}$ de $\sim 900 \mu\text{s}$ pour la phase rapide et de 15 ms pour la phase lente. Un échantillon contrôle déplété en Ca^{2+} puis reconstitué en Ca^{2+} présente un $t_{1/2}$ de $\sim 300 \mu\text{s}$ et de 4 ms pour la phase lente. Dans l'échantillon au Sr^{2+} , il est observé une augmentation du signal car la transition $\text{S}_0\text{Tyr}_Z^\bullet \rightarrow \text{S}_1\text{Tyr}_Z$ est également en partie détectée du fait de son ralentissement. 2) Les cinétiques ont ensuite été déterminées séparément sur chacune des transitions $\text{S}_i\text{Tyr}_Z^\bullet \rightarrow \text{S}_{i+1}\text{Tyr}_Z$. Les cinétiques sont biphasiques dans tous les cas, la phase rapide étant attribuée au déclin de Tyr_Z^\bullet durant la transition $\text{S}_i\text{Tyr}_Z^\bullet \rightarrow \text{S}_{i+1}\text{Tyr}_Z$ et la phase lente à la réduction de Tyr_Z^\bullet dans les centres endommagés. Les valeurs des $t_{1/2}$ des phases rapides pour chaque transition sont indiquées dans le Tableau 13.

	Reconstitué en Ca^{2+}	Reconstitué en Sr^{2+}
$\text{S}_1\text{Tyr}_Z^\bullet \rightarrow \text{S}_2\text{Tyr}_Z$	$\sim 200 \mu\text{s}$	$\sim 900 \mu\text{s}$
$\text{S}_2\text{Tyr}_Z^\bullet \rightarrow \text{S}_3\text{Tyr}_Z$	$\sim 450 \mu\text{s}$	$\sim 1,3 \text{ ms}$
$\text{S}_3\text{Tyr}_Z^\bullet \rightarrow \text{S}_0\text{Tyr}_Z$	$\sim 5 \text{ ms}$	$\sim 18 \text{ ms}$

Tableau 13 : Valeurs des $t_{1/2}$ de la transition $\text{S}_i\text{Tyr}_Z^\bullet \rightarrow \text{S}_{i+1}\text{Tyr}_Z$ déterminées par RPE à température ambiante. Les échantillons ont été déplétés en Ca^{2+} par un traitement à forte concentration en sels, puis reconstitués soit en Ca^{2+} , soit en Sr^{2+} . Tiré de la référence 187.

On observe que toutes les transitions sont ralenties par la reconstitution en Sr^{2+} . Nous allons maintenant présenter les résultats que nous avons obtenus. Dans notre cas, on ne détecte que les espèces qui déclinent avec un $t_{1/2}$ supérieur à 1 ms. L'échantillon Ca/Cl n'a pas été mesuré car la réduction du radical Tyr_Z^\bullet ($t_{1/2}$ 1,1 ms) est trop rapide pour la résolution du spectromètre.

L'échantillon placé dans la cavité RPE est flashé par une série de 64 flashes à température ambiante et on enregistre la formation et le déclin du signal de la tyrosine Z après chaque flash. Les échantillons actifs sont flashés toutes les 640 ms. Pour l'échantillon déplété en Mn, le déclin est plus lent donc les flashes sont espacés de 960 ms pour ne pas tronquer l'amplitude du signal. Comme l'amplitude du signal de Tyr_D^\bullet ne varie pas dans le domaine de temps que nous considérons, on peut détecter le radical Tyr_Z sans aucune autre contribution.

L'amplitude du signal est maximale pour un échantillon sans Mn (après lavage au Tris) dont la formation et déclin du signal sont suffisamment lents pour être détectés à chaque flash. Le signal de l'échantillon lavé au Tris est donc considéré égal à 100 % du signal (courbe noire de la Figure 81).

Pour les autres échantillons, seule la transition $\text{S}_3\text{Tyr}_Z^\bullet$ à S_0Tyr_Z est suffisamment lente pour être détectée de façon certaine⁸¹. La transition $\text{S}_2\text{Tyr}_Z^\bullet$ à S_3Tyr_Z pourra également être détectée en partie. Puisque les cinétiques obtenues correspondent à une accumulation des traces individuelles obtenues sur une série de flash, ils sont une moyenne des cinétiques observées dans tous les états S_n . C'est pourquoi on s'attend à ce que l'amplitude du signal des échantillons actifs soit égale à environ 25% du signal maximum qui est obtenu pour l'échantillon sans Mn.

La formation et la réduction de la tyrosine Tyr_Z^\bullet ont été ensuite mesurées dans un échantillon de PSII Sr/Cl biosynthétique. Deux autres échantillons ont également été analysés : un échantillon Ca/I (dont la préparation est expliquée Figure 78) et un échantillon Sr/I (dans ce cas, un échantillon de PSII Sr/Cl biosynthétique a été lavé à trois reprises dans du tampon contenant de l'iodure et incubé au noir sur la glace durant 18h). Les résultats des cinétiques sont présentés Figure 81.

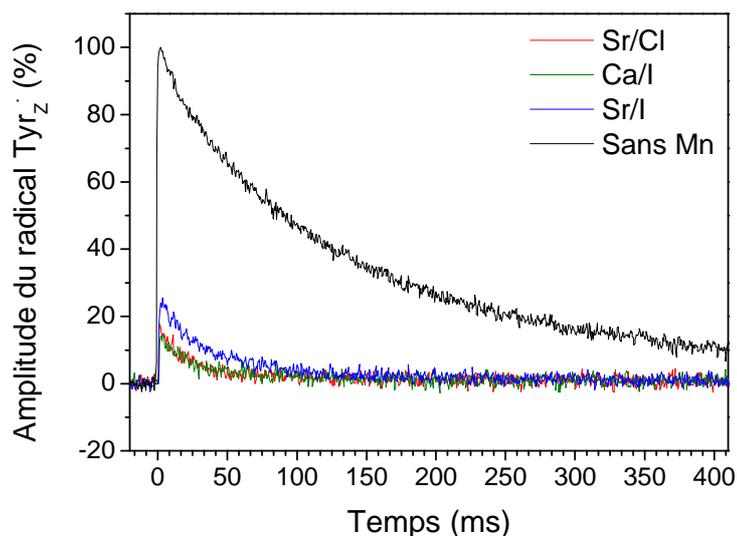


Figure 81 : Cinétiques de formation et de déclin à température ambiante du signal RPE Tyr_Z• enregistré à 3434 G (position à laquelle l'amplitude du signal de Tyr_Z• est maximale). Les échantillons sont soumis à une série de 64 flashes en présence de 0,5 mM de PPBQ. Les signaux enregistrés après chaque flash ont été moyennés. L'amplitude du signal pour l'échantillon sans Mn correspond arbitrairement à une échelle de 100%. Conditions expérimentales : puissance micro-ondes 20mW, amplitude de modulation 4 G, fréquence de modulation 100 kHz, fréquence micro-ondes 9,4 GHz, constante de temps 0,32 ms.

L'amplitude des cinétiques des échantillons modifiés varie entre 15 et 25% par rapport à l'amplitude de l'échantillon sans Mn. Cette valeur paraît un peu faible compte tenu des $t_{1/2}$ des transitions des échantillons modifiés. On s'attendrait à détecter la totalité de la transition $S_3\text{Tyr}_Z\bullet$ à $S_0\text{Tyr}_Z$ et une grande partie de $S_2\text{Tyr}_Z\bullet$ à $S_3\text{Tyr}_Z$. Dans une publication précédente¹¹⁰, une valeur de 40% avait d'ailleurs été rapportée pour un échantillon de PSII Sr/Cl biosynthétique. Cela peut être dû à l'existence de manques en nombre important.

Les cinétiques des échantillons Sr/Cl, Ca/I et Sr/I se décomposent en deux phases : une première phase rapide correspondant au déclin du radical Tyr_Z• dans les centres actifs, et une deuxième phase lente correspondant au déclin du radical dans les centres morts. Pour cette fraction de centres morts, le déclin de Tyr_Z• est identique à celui des centres sans Mn.

Pour la simulation, la cinétique de déclin de l'échantillon sans Mn a été enregistré dans les conditions des autres échantillons, à savoir les flashés espacés de 640 ms. Dans ce laps de temps, le déclin de la tyrosine Tyr_Z• n'est pas total. Cependant, nous avons été obligés de réaliser cette mesure pour nous placer dans les mêmes conditions que les échantillons actifs. Cette cinétique a été simulée selon une équation mono-exponentielle qui nous a donné une valeur pour le $t_{1/2}$ de 125 ms.

Les cinétiques des autres échantillons ont été simulées selon une équation bi-exponentielle. La phase de l'échantillon sans Mn a été imposée comme phase lente et nous avons ainsi pu déterminer les valeurs de la phase rapide pour chaque échantillon. Les résultats sont présentés dans le Tableau 14.

PSII	Phase lente		Phase rapide	
	amplitude	$t_{1/2}$ (ms)	amplitude	$t_{1/2}$ (ms)
Sr/Cl	21	125	79	11,1
Sr/I	23	125	77	18,6
Ca/I	25	125	75	11,6

Tableau 14 : Valeurs des paramètres déduits de la simulation des cinétiques de déclin de la tyrosine Z selon une équation biexponentielle. La valeur du $t_{1/2}$ de la phase lente a été imposée d'après la valeur calculée pour l'échantillon sans Mn.

La valeur du $t_{1/2}$ de la phase rapide pour Sr/Cl est relativement plus grande que celle déterminée auparavant à 292 nm, qui était de 4,8 ms. Cependant, ces résultats sont issus d'une étude préliminaire et demandent à être confirmés par d'autres mesures. On observe que la transition $S_3\text{Tyr}_Z^*$ à $S_0\text{Tyr}_Z$ est ralentie dans les échantillons contenant de l'iodure. Nous montrons ainsi que l'effet de l'iodure n'est pas lié à une réduction du cluster de Mn_4Ca mais au ralentissement d'au moins une des étapes du cycle catalytique.

Nous allons maintenant étudier cette transition du point de vue du dégagement en oxygène, par des mesures sur l'électrode résolue en temps.

3) Séquences de dégagement d'oxygène

Nous avons mesuré les séquences de dégagement d'oxygène d'échantillons Ca/I et Sr/I pour étudier l'effet de l'iodure sur la vitesse de dégagement d'oxygène en présence de calcium et de strontium.

Nous avons préparé les échantillons en centrifugeant à trois reprises des échantillons de thylakoides Ca/Cl et Sr/Cl dans du tampon contenant 60 mM d'iodure, puis en les incubant 5 heures sur la glace à l'obscurité.

Nous avons d'abord mesuré le dégagement d'oxygène sur une séquence de 19 flashes pour les échantillons Ca/Cl, Sr/Cl et Sr/I (Figure 82). Les échantillons de thylakoides proviennent de la souche de *T. elongatus* sauvage appelée 43H. Les trois gènes *psbA1*, *psbA2*

et *psbA3* sont présent et le gène *psbA1* est exprimé majoritairement. Nous avons choisi d'utiliser cette souche plutôt que $\Delta psbA1-\Delta psbA2$ car nous espérons améliorer les séquences d'oscillations (cf. chapitre III).

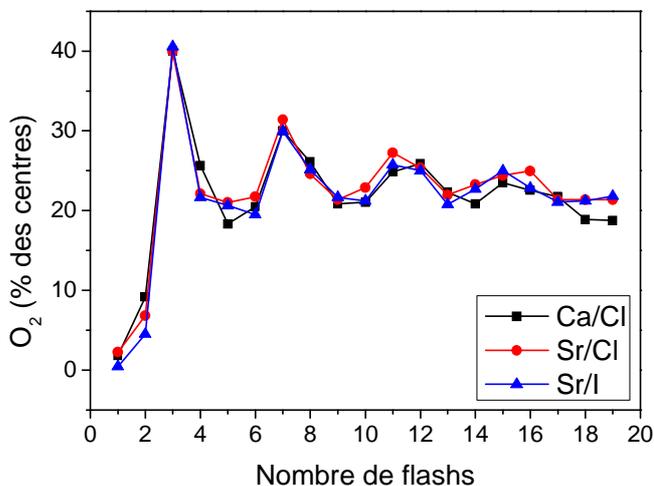


Figure 82 : Séquences de dégagement d'oxygène. Les échantillons de thylakoïdes ont été soumis à une série de 19 flashes séparés par 400 ms après adaptation à l'obscurité pendant une heure à température ambiante sur l'électrode de platine. L'amplitude du dégagement d'oxygène a été représentée de telle façon qu'elle correspond directement au pourcentage de centres qui produisent de l'O₂.

Nous observons sur la séquence des thylakoïdes Ca/Cl que les oscillations sont très amorties, comme dans le cas des thylakoïdes Ca/Cl provenant de la souche $\Delta psbA1-\Delta psbA2$ (Figure 54). Néanmoins, nous pouvons observer sur la figure 54, que les oscillations lorsqu'elles s'amortissent arrivent à un niveau moyen de 25%, ce qui est en accord avec la théorie. En effet, après un certain nombre de flashes, les centres se répartissent équitablement entre les quatre états S_n du fait des manques et doubles coups. Cette valeur de 25% n'était pas atteinte dans l'expérience précédente (Figure 54), ce qui laisse quand même penser que les cellules 43H ont des propriétés différentes des cellules $\Delta psbA1-\Delta psbA2$, notamment au niveau du pool de quinones. La deuxième observation que nous pouvons faire sur la Figure 82 concerne l'échange du Cl⁻ avec I⁻. Les séquences de dégagement d'oxygène sont identiques dans les trois échantillons. Globalement, la même quantité d'O₂ est émise dans tous les échantillons.

4) Cinétiques de dégagement d'oxygène

Nous avons ensuite mesuré les cinétiques de dégagement d'oxygène après le troisième flash sur les échantillons Ca/Cl, Ca/I, Sr/Cl et Sr/I (Figure 83).

Les courbes présentées Figure 83A correspondent aux courbes expérimentales de dégagement d'oxygène brutes.

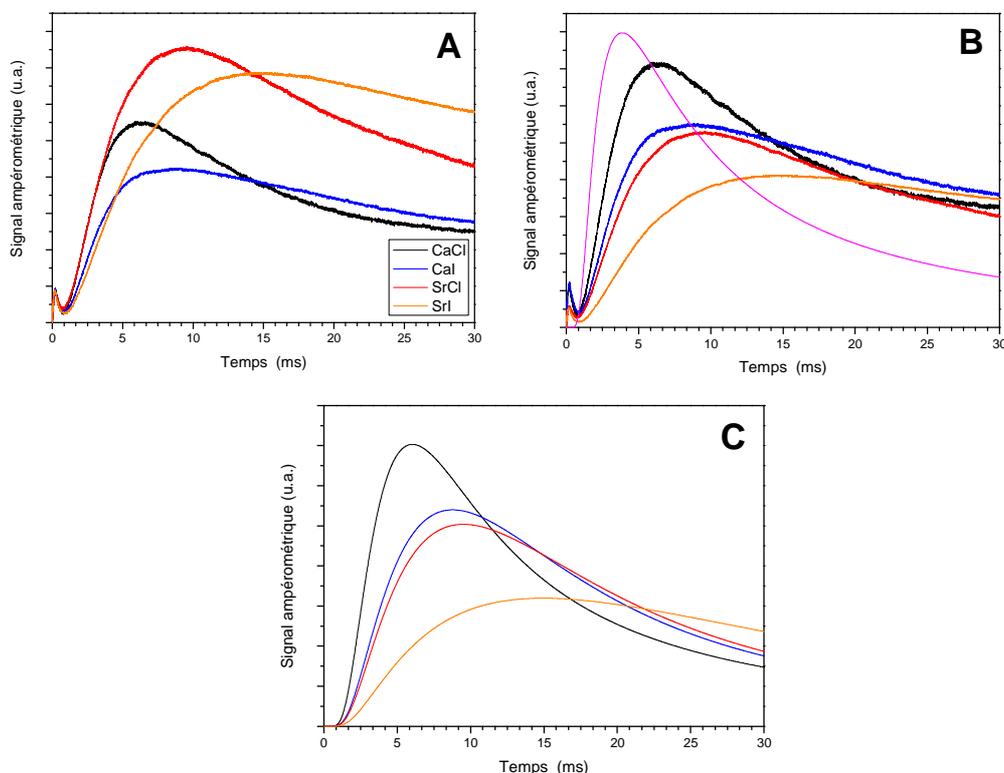


Figure 83 : Cinétiques de dégagement d'oxygène mesurées sur des échantillons de thylakoides adaptés à l'obscurité sur une électrode Pt/Ag/AgCl. A : courbes expérimentales brutes, B : courbes expérimentales normalisées en amplitude, C : courbes simulées.

On observe que l'amplitude des courbes des échantillons contenant du Ca^{2+} est très inférieure à celle des échantillons contenant du Sr^{2+} . Cela pourrait être dû à la variation du rapport PSII/PSI dans chaque échantillon de thylakoides. Comme nous nous intéressons ici à la vitesse du dégagement et que les données des échantillons Ca^{2+} d'un côté et Sr^{2+} de l'autre, sont en concordance entre elles, cette variation n'a pas d'importance sur nos conclusions.

Pour la simulation, nous avons procédé un peu différemment que précédemment, ne connaissant pas les valeurs des constantes de temps pour les échantillons contenant de l'iodure, pour la transition $\text{S}_3\text{Tyr}_Z \cdot \rightarrow \text{S}_0\text{Tyr}_Z$.

Pour pouvoir faire la simulation de ces courbes et en déduire les valeurs des constantes de vitesse pour chaque échantillon, nous avons en premier lieu déterminé la valeur de la constante de diffusion pour le système en considérant l'échantillon Ca/Cl. Cette constante a changé depuis la dernière expérience car le montage a été légèrement modifié. En utilisant la valeur de la constante de vitesse égale à 1,1 ms (déterminée auparavant à 292 nm) pour cette

échantillon, nous avons représenté la fonction S_i en faisant varier la valeur de t_d jusqu'à ce que courbe expérimentale et courbe théorique soient superposées. Nous avons ainsi trouvé une valeur pour la constante de diffusion égale à 5,8 ms.

Nous avons ensuite injecté cette valeur de t_d dans l'équation de la fonction S_i avec $S_i = k_{ox} \times inc \times \sum_{j=0}^i (\Phi_j \times \exp(-k_{ox} \times inc \times (i - j)))$. Le seul paramètre inconnu est le k_{ox} . Nous faisons ensuite varier k_{ox} jusqu'à ce que courbes théorique et expérimentale soient superposées. Les valeurs des constantes de temps ainsi déterminées sont présentées dans le Tableau 15. Nous obtenons ainsi les quatre courbes simulées Figure 83C.

La Figure 83B correspond aux courbes expérimentales normalisées en amplitude, de telle sorte qu'elles croisent la courbe $\Phi(t)$ théorique correspondant à un dégagement instantané d'oxygène, à leur maximum. Nous nous affranchissons ainsi de la variation du rapport PSII/PSI d'un échantillon à l'autre.

PSII	$t_{1/2}$ (ms)
Ca/I	3
Sr/Cl	3,6
Sr/I	9,9

Tableau 15 : Valeur des constantes de vitesses de dégagement d'oxygène pour les trois échantillons de thylakoides Ca/I, Sr/Cl et Sr/I. Elles ont été déduites par la procédure décrite dans le texte.

Pour l'échantillon Sr/Cl, nous obtenons une valeur pour le $t_{1/2}$ légèrement inférieure à la valeur utilisée pour la simulation précédente et déduites de la cinétique à 292 nm (4,8 ms). Une des raisons possible est que la vitesse de dégagement d'oxygène est très dépendante de la température¹⁸⁸, or nous n'utilisons pas de montage thermostaté.

Par nos mesures d'oxymétrie résolue en temps, nous montrons : 1) il n'y pas de centres inactifs dans les échantillons substitués à l'iodure, comme suggéré par la RPE ; 2) l'iodure ralentit la vitesse de dégagement d'oxygène du PSII.

5) Courbes d'émission de thermoluminescence

Pour savoir si les propriétés thermodynamiques du PSII en présence d'iodure sont modifiées, nous avons mesuré les courbes de thermoluminescence des échantillons de thylakoides Ca/I et Sr/I correspondant aux recombinaisons $S_2Q_B^-$ et $S_3Q_B^-$ (Figure 84). Les échantillons sont les mêmes que ceux utilisés pour les mesures de cinétiques de dégagement d'oxygène.

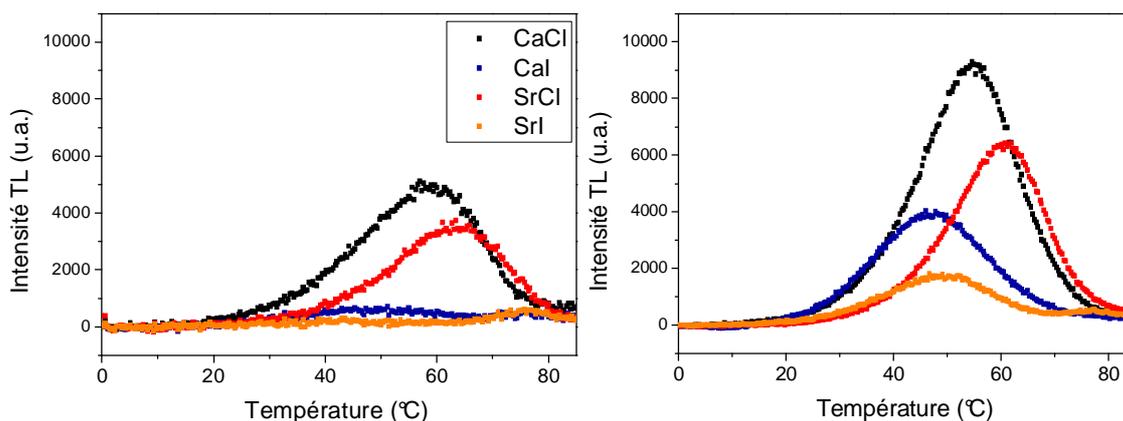


Figure 84 : Courbes d'émission de thermoluminescence provenant de la recombinaison $S_2Q_B^-$ après un flash et $S_3Q_B^-$ après deux flashes, d'échantillons de thylakoides. Les échantillons ont été préalablement adaptés à l'obscurité à température ambiante avant la mesure.

On peut dans un premier temps comparer les résultats obtenus ici pour l'échantillon de thylakoides Ca/Cl avec les résultats obtenus précédemment (Figure 59). On se rend compte que la température de recombinaison est légèrement plus élevée dans cette dernière expérience. Le maximum est atteint à 59°C et 55°C pour les recombinaisons $S_2Q_B^-$ et $S_3Q_B^-$ respectivement, alors que précédemment le maximum était atteint à 57°C et 53°C. Cette différence est difficile à expliquer. Nous nous sommes rendu compte au cours des manipulations, que la température de recombinaison pouvait varier légèrement d'un jour à l'autre. Nous avons pallié à ce problème en faisant toutes les mesures d'une même expérience dans une même journée et avec les mêmes milieux, pour ne pas introduire de différences artefactuelles. L'important réside dans le fait que la différence de température entre les deux recombinaisons soit toujours identique.

Pour la recombinaison $S_2Q_B^-$, la thermoluminescence est très faible en présence d'iodure. On observe pour la recombinaison $S_3Q_B^-$ que les pics de thermoluminescence baissent en amplitude (baisse de 50 à 60% par rapport aux contrôles) et sont décalées

d'environ 8°C vers les basses températures pour l'échantillon Ca/I par rapport à Ca/Cl, et d'environ 11°C pour l'échantillon Sr/I par rapport à Sr/Cl. On observe une petite bande supplémentaire vers les hautes températures (aux environs de 78°C). Cette bande peut être attribuée à une recombinaison $\text{Tyr}_D \cdot \text{Q}_A^{-153}$.

On peut comparer les résultats obtenus ici avec ceux présentés dans la Figure 75. Les thylakoides testés ici ont montré que l'échange du Cl^- par I^- avait été réalisé après 5 heures de lavage et d'incubation, alors que cela n'avait pas été le cas pour l'échange du Br^- par Cl^- , dans les mêmes conditions de lavage et d'incubation. On peut suggérer que le site de fixation aux halogénures a une plus grande affinité pour l'iodure que pour les autres halogénures.

Les résultats obtenus par thermoluminescence seront discutés et comparés à ceux décrits dans la littérature dans la conclusion de ce chapitre. Nous allons maintenant étudier les caractéristiques structurales des échantillons substitués biochimiquement, par RPE.

6) Caractérisation par Résonance Paramagnétique Electronique

a) Résultats des échantillons biochimiquement modifiés

Nous avons enregistré les spectres RPE de PSII dont la préparation a déjà été décrite auparavant (Figure 78). Nous avons cinq types d'échantillons : Ca/Cl, Ca/Br, Ca/I, Ca/F et sans halogénure. Les spectres des échantillons ont été enregistrés après adaptation à l'obscurité (sans procédure de préflash pour ne pas réaliser de traitement additionnel), puis après éclairage à 200 K pour observer les signaux dans l'état S_2 .

i. Eclairage à 200 K

i.i Echantillon Ca/Cl

Nous avons dans un premier temps enregistré les spectres de l'échantillon repris dans du tampon Cl^- pour contrôler que le fait d'éluer en absence d'halogénure ne modifie pas la structure du PSII, ou n'induit pas la présence de centres morts (Figure 85).

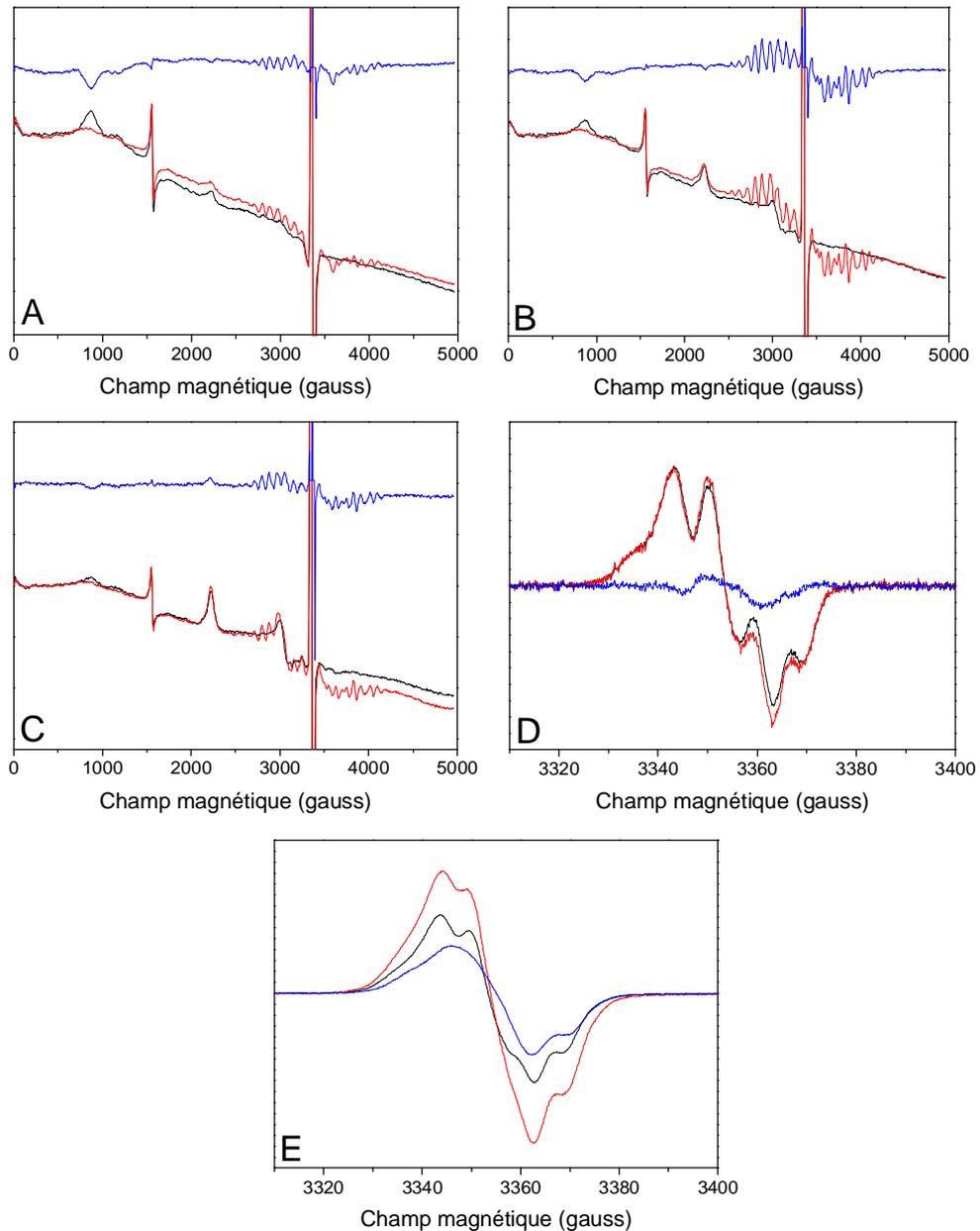


Figure 85 : Spectres RPE de l'échantillon contrôle Ca/Cl dans l'état S_2 enregistrés dans les conditions suivantes : A. 4K ; B. 8,5 K ; C.15K ; D. Spectre Tyr_D^* puissance 5 mW ; E. Spectre Tyr_D^* puissance 2 μW En noir, le spectre enregistré après adaptation à l'obscurité, en rouge le spectre enregistré après éclaircissement à 200K et en bleu, le spectre de différence. Les paramètres d'enregistrement sont les mêmes que ceux décrits auparavant.

On observe que le signal Fe^{II} diminue après éclaircissement, le rapport Q_B^-/Q_B est donc supérieur à 1, après adaptation à l'obscurité et avant addition de PPBQ.

Le spectre de Tyr_D^* enregistré avec une puissance de 5 mW (spectre D Figure 85) augmente après éclaircissement (variation de 100 %). Cette augmentation du signal traduit la

production d'un état relaxant qui est S_2^{189} (Figure 86). Ce spectre vient donc confirmer la formation de S_2 , après l'observation du signal multilignes à 8,5 K (spectre B Figure 85)).

Sur le spectre de Tyr_D^\bullet enregistré avec une puissance de 2 μW on n'observe pas d'apparition de radical chlorophylle ou caroténoïde, ce qui montre l'absence de centres morts dans l'échantillon. A cette puissance micro-ondes, l'effet de S_2 sur la vitesse de relaxation n'est pas visible car l'amplitude du signal en S_1 est trop faible (Figure 86).

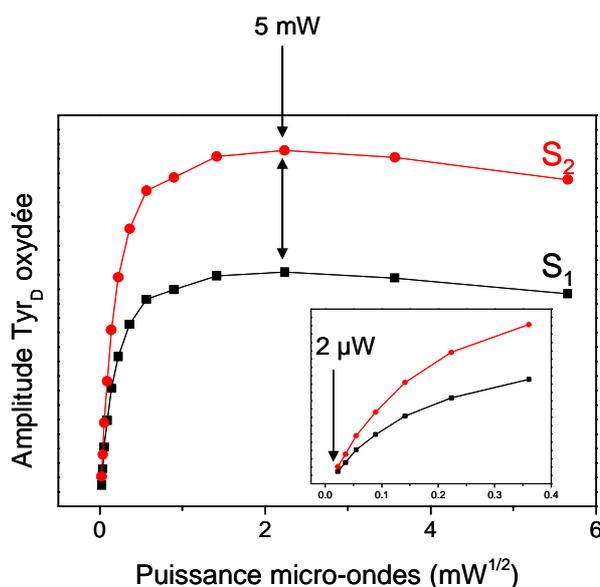


Figure 86 : Effet de la formation de S_2 sur l'intensité du signal de la tyrosine D oxydée. En abscisse, est représentée la racine carré de P , la puissance micro-ondes (en mW). Cette courbe peut être simulée par une équation de la forme : $Amplitude = k\sqrt{P(1+P/P_{1/2})}^{b/2}$ avec P la puissance micro-ondes en mW , k un facteur de normalisation, $P_{1/2}$ la puissance de demi-saturation et b le paramètre d'inhomogénéité.

Cet échantillon se comporte comme un échantillon Ca/Cl « normal ».

i.ii Echantillon Ca/F

On observe sur les spectres de l'échantillon Ca/F (Figure 87) plusieurs similitudes avec l'échantillon Ca/Cl :

- Le signal Fe^{II} diminue après éclaircissement comme pour le contrôle, d'où une plus grande proportion de centres dans l'état $Q_A Fe^{II} Q_B^-$ après adaptation à l'obscurité et avant addition de PPBQ.
- Le spectre de Tyr_D^\bullet enregistré avec une puissance de 5 mW (spectre D Figure 89) augmente en amplitude après éclaircissement (variation de 54 %).

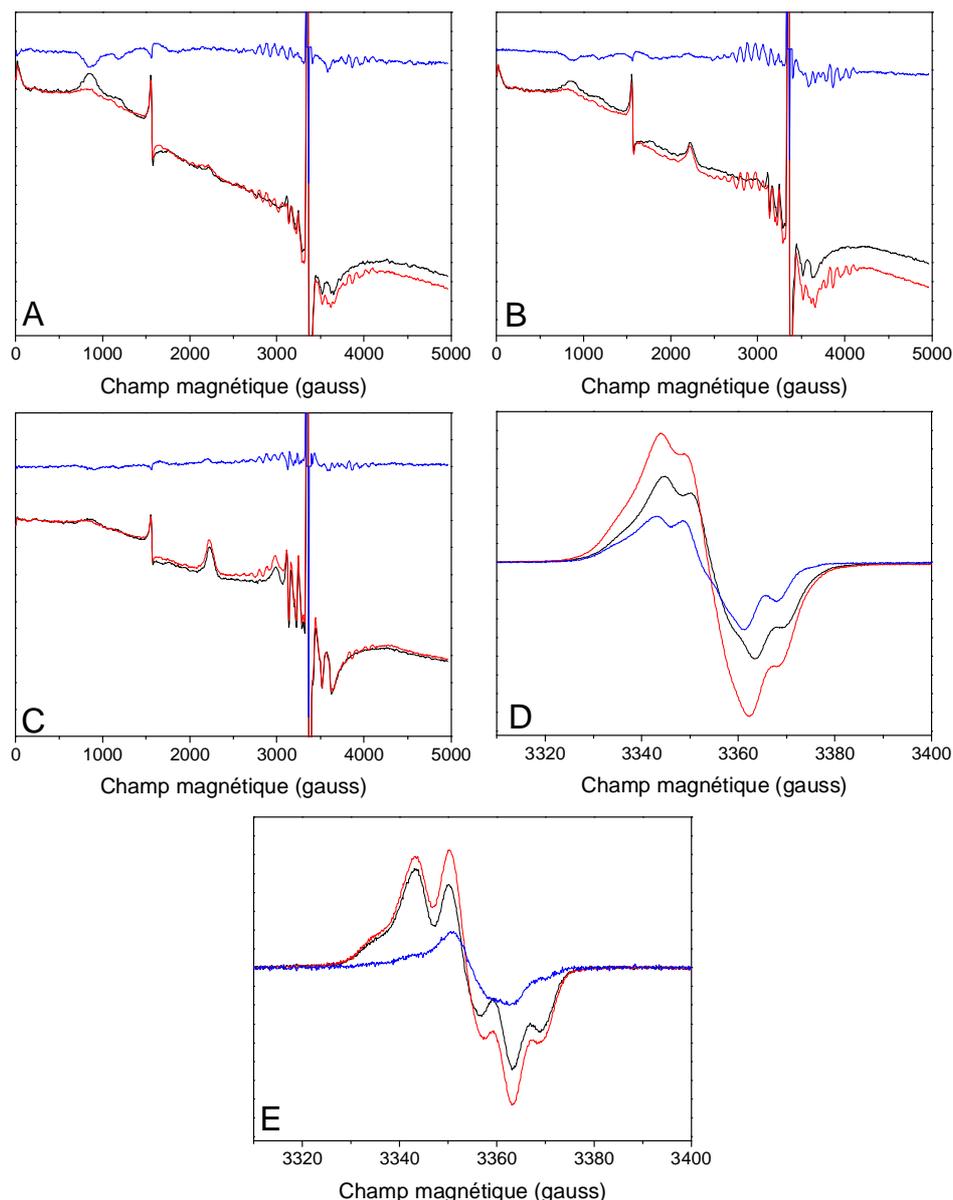


Figure 87 : Spectres RPE de l'échantillon Ca/F dans l'état S_2 enregistrés dans les conditions suivantes : A. 4K ; B. 8,5 K ; C.15K ; D. Spectre Tyr_D^\bullet puissance 5 mW; E. Spectre Tyr_D^\bullet puissance 2 μ W. En noir, le spectre enregistré après adaptation à l'obscurité, en rouge le spectre enregistré après éclaircissement à 200K et en bleu, le spectre de différence. Les paramètres d'enregistrement sont les mêmes que ceux décrits auparavant.

Un fait nouveau apparaît cependant sur le spectre enregistré à 15 K (spectre C) : la présence d'un signal composé de 6 raies à l'obscurité et à la lumière, qui correspond à la présence de Mn^{II} dans le milieu. Le fluor provoquerait « l'éclatement » du cluster de Mn_4Ca . On observe d'ailleurs sur le spectre Tyr_D^\bullet avec une puissance de 2 μ W (spectre E) l'apparition d'un radical dû à l'oxydation des chlorophylles et caroténoïdes de la voie secondaire de transfert d'électrons, ce qui confirme la présence de centres morts.

Nous n'observons pas de signal à $g \approx 4$, ce qui paraît étonnant car en contradiction avec la littérature rapportant un grand signal à $g \approx 4$ de membranes enrichies en PSII où le Cl⁻ a été substitué par du F⁻¹³⁴.

i.iii Sans halogénure

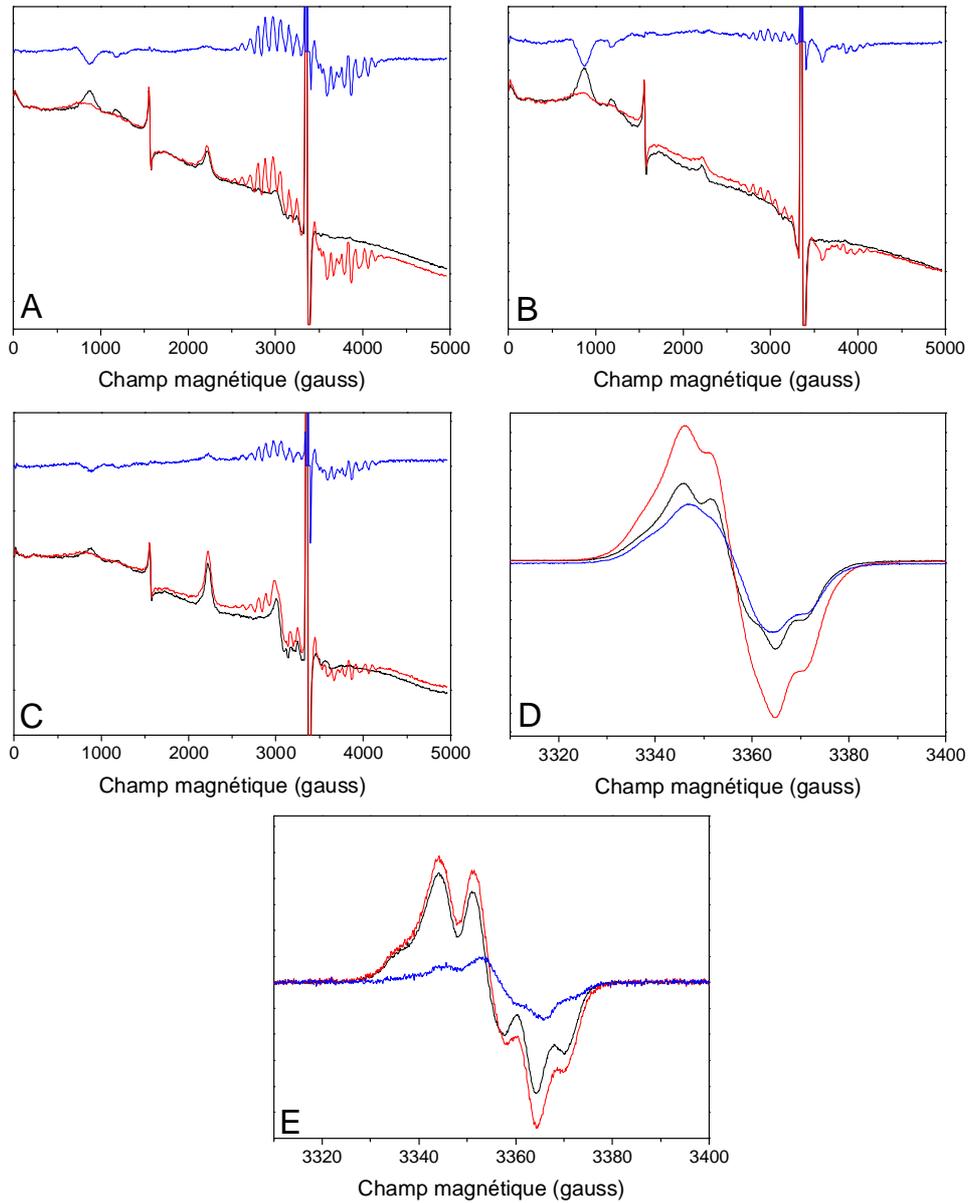


Figure 88 : Spectres RPE de l'échantillon « sans halogénure » dans l'état S_2 enregistrés dans les conditions suivantes : A. 4K ; B. 8,5 K ; C.15K ; D. Spectre Tyr_D^{\bullet} puissance $2 \mu W$; E. Spectre Tyr_D^{\bullet} puissance 5 mW. En noir, le spectre enregistré après adaptation à l'obscurité, en rouge le spectre enregistré après éclaircissement à 200K et en bleu, le spectre de différence. Les paramètres d'enregistrement sont les mêmes que ceux décrits auparavant.

Les spectres de l'échantillon sans halogénure sont similaires à ceux du contrôle Ca/Cl. La présence d'un grand signal multilignes (Spectre B) ainsi que la forte augmentation du signal Tyr_D^{\bullet} avec une puissance de 5 mW (Spectre D) suggère que l'état S_2 est formé de façon normale dans la majorité des centres. Ceci suggère deux hypothèses : 1) soit l'éluion sans halogénure n'a pas ôté tous les Cl^- présents dans les centres PSII ; 2) Soit l'absence de Cl^- n'empêche pas la formation du signal multilignes normal, ce qui pourrait paraître en contradiction avec la littérature. En effet, Ono et al. ont réalisé une étude sur du PSII de plantes déplété en Cl^- par un traitement au sulfate. Après éclaircissement à 200 K, ils ont observé l'absence de multilignes et la présence d'un large signal à $g \approx 4,1$. Dans l'échantillon contrôle, le signal à $g \approx 4$ est induit dans les mêmes proportions que dans l'échantillon déplété en Cl^- , en plus du signal multilignes. Le traitement biochimique sévère utilisé par Ono et al. explique sans doute la différence avec les résultats que nous avons obtenus.

i.iv Echantillon Ca/I

On observe sur les spectres de l'échantillon Ca/I plusieurs similitudes avec l'échantillon Ca/Cl (Figure 89):

- Le signal Fe^{II} diminue après éclaircissement comme pour le contrôle, d'où une plus grande proportion de centres dans l'état $\text{Q}_A\text{Fe}^{\text{II}}\text{Q}_B^-$ après adaptation à l'obscurité et avant addition de PPBQ.
- Le spectre de Tyr_D^{\bullet} enregistré avec une puissance de 5 mW (spectre D Figure 89) augmente en amplitude après éclaircissement (variation de 70 %). L'augmentation d'amplitude est moins importante que dans le cas du PSII Ca/Cl, suggérant la présence de moins de centres dans l'état S_2 , ce qui est d'ailleurs en accord avec l'observation de l'amplitude du signal multilignes à 8,5 K : l'amplitude du signal est plus faible que dans la Figure 85. L'échantillon Ca/I contiendrait donc plus de centres dans l'état S_0 après adaptation à l'obscurité.
- Il n'y a pas d'apparition de radical sur le spectre de Tyr_D^{\bullet} enregistré avec une puissance de 2 μW après éclaircissement, montrant l'absence de centres morts dans l'échantillon. Ce résultat vient confirmer celui précédemment obtenu par mesure des séquences de dégagement d'oxygène (chapitre III).

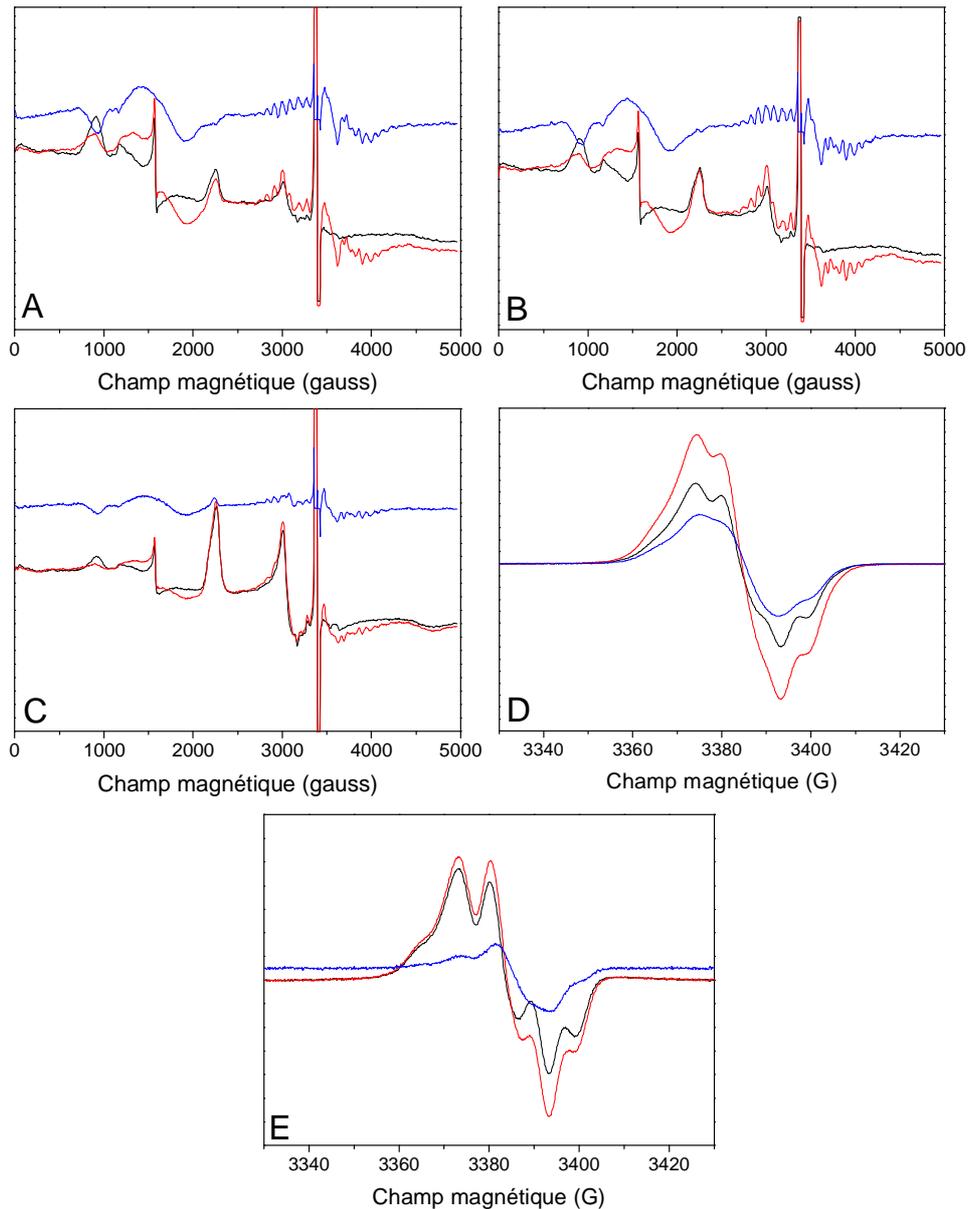


Figure 89 : Spectres RPE de l'échantillon Ca/I dans l'état S_2 enregistrés dans les conditions suivantes : A. 4K ; B. 8,5 K ; C.15K ; D. Spectre Tyr_D ' puissance 2 μW ; E. Spectre Tyr_D ' puissance 5 mW. En noir, le spectre enregistré après adaptation à l'obscurité, en rouge le spectre enregistré après éclaircissement à 200K et en bleu, le spectre de différence. Les paramètres d'enregistrement sont les mêmes que ceux décrits auparavant.

Deux faits notables apparaissent sur le spectre de l'échantillon Ca/I :

- La présence d'un grand signal aux environs de $g \approx 4,02$. Cette observation est à mettre en corrélation avec la faible amplitude du signal multilignes. Les centres dans l'état S_2 ne montrant pas un signal multilignes ne sont pas des centres morts, mais des centres se trouvant dans un état S_2 légèrement modifié qui donne lieu au signal à $g \approx 4,02$.

- L'amplitude du signal lié aux cytochromes est très grande, visible à $g_z = 2,97$, $g_y = 2,24$ et $g_x = 1,49$. On observe un épaulement à $g = 3,0$, ce qui montre l'oxydation du cytochrome *b559*, même à l'obscurité. Cela pourrait s'expliquer par la conversion de la forme haut potentiel du cytochrome (qui est normalement majoritaire) en forme bas potentiel, en présence d'iodure.

La présence d'un signal à $g \approx 4$ ¹³⁴ en présence d'iodure et la disparition quasi-totale du signal multilignes a déjà été décrite par Ono et al., mais dans des conditions assez différentes. Le Cl^- a été remplacé par de l' I^- dans des membranes de PSII et étudié par RPE après éclairage à 200 K. Il est observé un large signal à $g \approx 4$. Cependant, dans l'expérience de Ono et al., le signal à $g \approx 4$ est déjà observé dans l'échantillon contrôle où le PSII a été reconstitué avec du Cl^- . L'existence de ce signal à $g \approx 4$ est décrite dans des expériences réalisées sur des échantillons intacts éclairés à température ambiante ou à 200 K en présence de sucrose⁹¹, qui est connu pour favoriser le signal $g \approx 4$ au détriment du signal multilignes. On peut donc supposer que son observation par Ono et al. n'est pas à relier à la présence d'iodure.

Après quelques secondes de décongélation à température ambiante, nous avons remarqué que le signal à $g = 4,02$ disparaissait, et que le signal multilignes diminuait en amplitude, suggérant une instabilité du signal multilignes à température ambiante. Pour le vérifier, un nouvel échantillon a été flashé une fois à température ambiante, puis congelé immédiatement (en 1~2 s) pour piéger les centres qui sont stables en S_2 dans le domaine de temps étudié, puis éclairé à 200 K pour donner cette fois le maximum de signal multilignes (Figure 90). Ce protocole nous permet de sonder la proportion de centres qui déclinent de S_2 à S_1 dans le temps entre le flash et la décongélation.

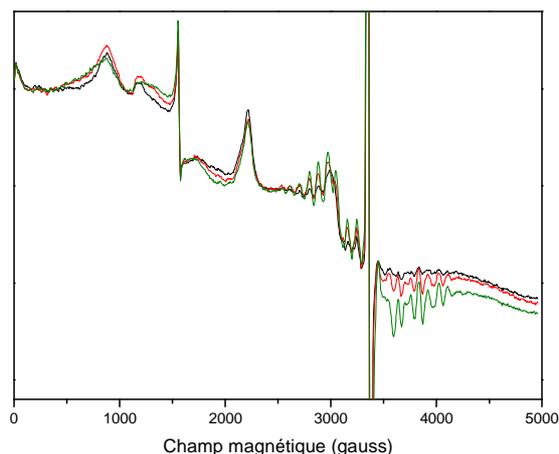


Figure 90 : Mise en évidence de l'instabilité de l'état S_2 en présence d'iodure. Un échantillon de PSII Ca/I a été adapté à l'obscurité pendant une heure à température ambiante (spectre noir). Après ajout de 0.05 mM de PPBQ dissous dans du DMSO, l'échantillon a été flashé une fois à température ambiante (spectre rouge), puis éclairé à 200K (spectre bleu). Paramètres : température : 8,5 K ; amplitude de modulation : 25 G ; puissance micro-ondes : 20 mW, fréquence micro-ondes : 9,4 GHz ; fréquence de modulation : 100 kHz.

On observe que le signal multilignes augmente après l'éclairement à 200 K, ce qui confirme l'hypothèse selon laquelle le signal multilignes de l'échantillon Ca/I est instable à température ambiante. L'état S_2 décline donc rapidement à température ambiante en présence d'iodure.

ii. Eclairement par flashes

Puisque nous arrivons quand même à détecter une certaine quantité de centres dans l'état S_2 , nous avons regardé l'effet de l'iodure après 1, 2, ou 3 flashes suivants sur des échantillons de PSII Ca/I préflashés. Les échantillons de PSII sont dans du tampon sans glycérol contrairement aux précédents, car il a été observé que la présence de glycérol diminue la résolution de certains signaux RPE. En particulier, la présence de glycérol qui est souvent utilisé comme cryoprotectant dans les préparations de PSII, empêche la formation du signal $g \approx 4$ et complémentaiement favorise l'intensité du signal multilignes^{141,190}.

ii.i Après un flash

Après un flash, (

Figure 91), on retrouve les caractéristiques des spectres que nous avons observées après éclairement à 200 K (Figure 89) :

- La présence d'un grand signal aux environs de $g \approx 4$ à mettre en corrélation avec la faible amplitude du signal multilignes. Les centres donnant ces deux types de signaux se trouvent dans l'état S_2 . C'est pourquoi on observe également une forte augmentation du signal tyrosine D oxydée à une puissance de 5 mW.
- Le signal lié aux cytochromes est très grand en amplitude, visible à $g = 3,02$, $g = 2,24$ et $g = 1,49$.

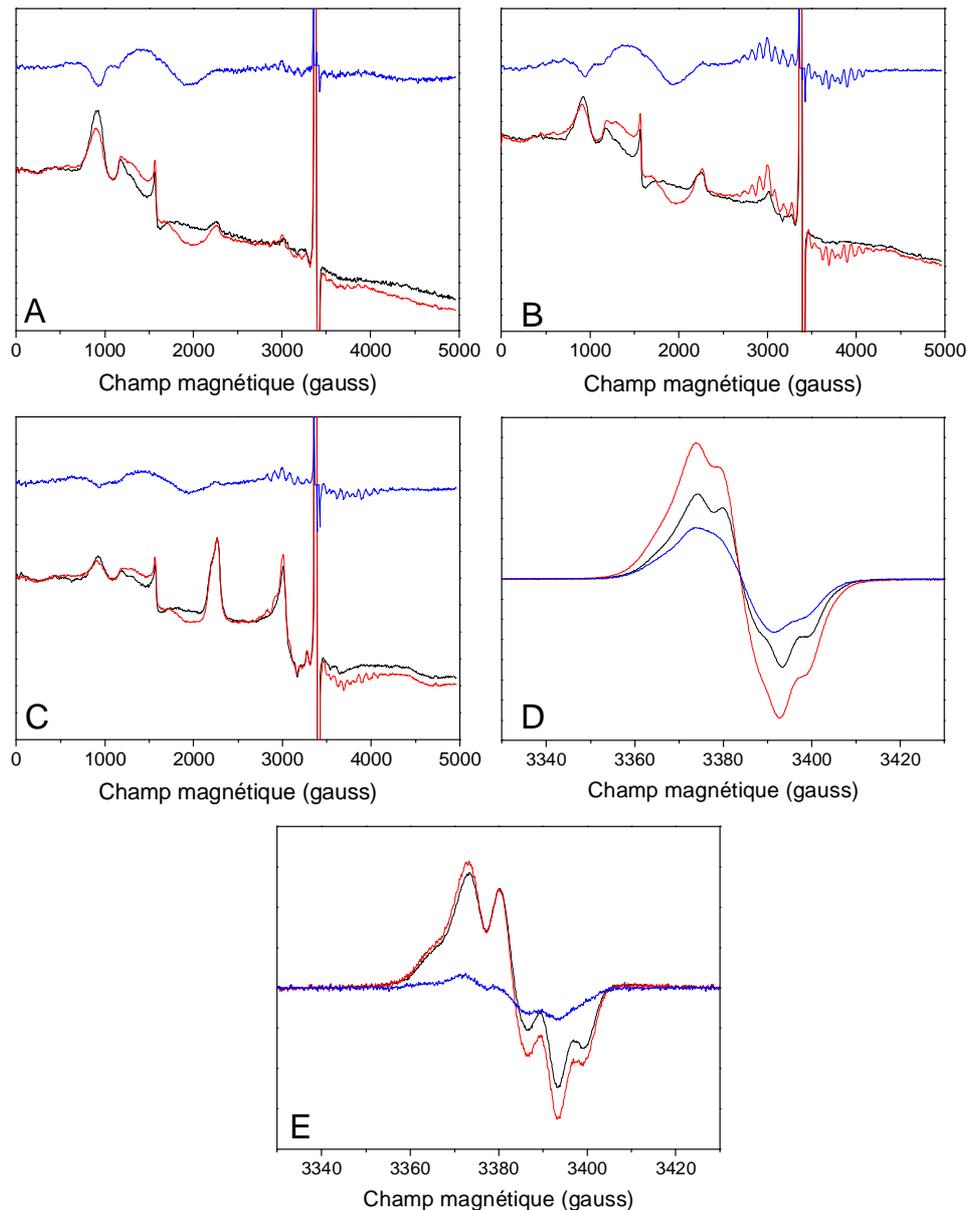


Figure 91 : Spectres RPE de l'échantillon de PSII Ca/I qui a reçu un flash à température ambiante, enregistrés dans les conditions suivantes : A. 4K ; B. 8,5 K ; C.15K ; D. Spectre Tyr_D' puissance 2 μ W ; E. Spectre Tyr_D' puissance 5 mW. En noir, le spectre enregistré après adaptation à l'obscurité, en rouge le spectre enregistré après éclaircissement à 200K et en bleu, le spectre de différence.

ii.ii Après deux flashes

Comme nous détectons malgré tout l'état S_2 en présence d'iodure, nous avons cherché à observer le signal S_3 (Figure 92). Il est possible que S_2 décline en S_1 dans le temps entre le premier et le deuxième flash et que les centres PSII ne puissent pas passer en S_3 .

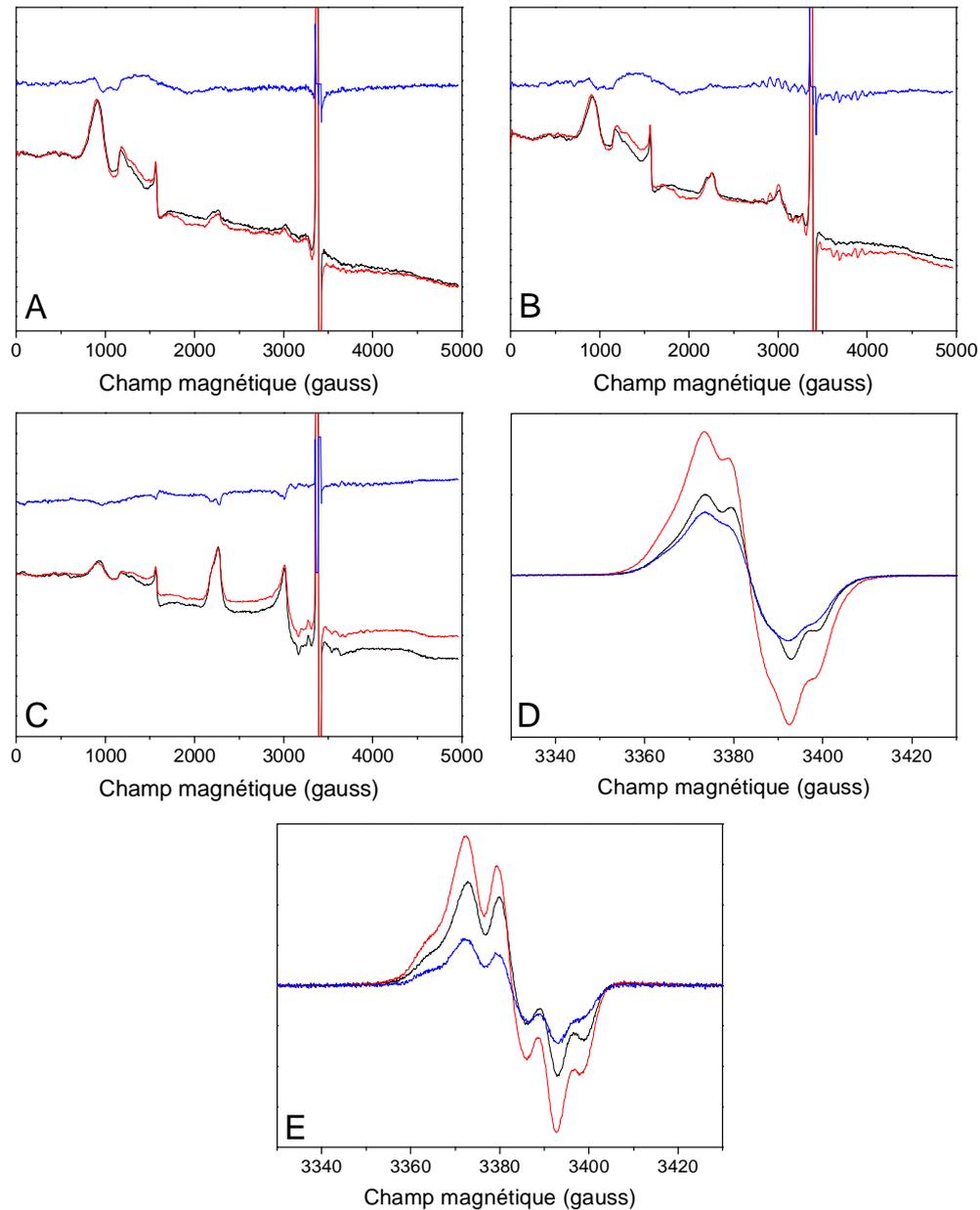


Figure 92 : Spectres RPE de l'échantillon de PSII Ca/I qui a reçu deux flashes à température ambiante, enregistrés dans les conditions suivantes : A. 4K ; B. 8,5 K ; C.15K ; D. Spectre Tyr_D' puissance $2 \mu W$; E. Spectre Tyr_D' puissance $5 mW$. En noir, le spectre enregistré après adaptation à l'obscurité, en rouge le spectre enregistré après éclaircissement deux flashes saturants et en bleu, le spectre de différence.

Après deux flashes, on observe moins de signal multilignes à 8,5 K (spectre B) et de signal $g = 4$ qu'après un flash, ce qui laisse supposer qu'une grande partie des centres sont quand même en S_3 .

Deux faits sont à remarquer sur ces spectres (Figure 92) :

- Sur le spectre à 15 K (spectre C), on observe l'apparition d'un petit épaulement sur le signal du cytochrome à $g = 3,0$. Cet épaulement est indicateur de l'oxydation du cytochrome *b559* qui donne un signal très légèrement décalé par rapport au signal du cytochrome *c550* oxydé.
- Le signal de la Tyr_D^\bullet obtenu avec une puissance de 2 μW augmente de manière très importante après deux flashes (60% environ), tout comme le signal obtenu avec une puissance de 5 mW (85%) Cette augmentation peut être due à plusieurs facteurs : 1) La présence de centres morts, mais nous avons montré que ce n'était pas le cas dans les paragraphes précédents ; 2) L'oxydation de la tyrosine D. Si l'iodure réduit la tyrosine D oxydée, alors on la réoxyderait en flashant l'échantillon. La question qui se pose maintenant est la suivante : pourquoi n'avons nous pas observé d'oxydation de la tyrosine D après éclaircissement à 200K et après un flash ? Cela pourrait être dû à l'accélération de la recombinaison $S_3Tyr_D \rightarrow S_2Tyr_D^\bullet$ en présence d'iodure, contrairement à la recombinaison $S_2Tyr_D \rightarrow S_1Tyr_D^\bullet$, le potentiel du couple S_3/S_2 étant attendu plus grand que celui du couple S_2/S_1 .

ii.iii Après 3 flashes

Après trois flashes (Figure 93), nous sommes sans doute en présence d'un mélange d'état S du fait du rapide déclin de l'état S_2 à température ambiante. Les flashes donnés à température ambiante sont espacés de 1 seconde. Nous avons montré dans les expériences d'oxymétrie résolue en temps dans lesquelles les flashes sont espacés de 400 ms que la quantité globale d' O_2 émise est similaire dans les échantillons Sr/Cl et Sr/I (Figure 82). Le déclin de S_2 dû à la présence d'iodure aurait donc lieu dans un temps supérieur à 400 ms. Le mélange d'états S est confirmé par le fait que nous n'observons pas ou très peu de signal multilignes S_0 après 3 flashes.

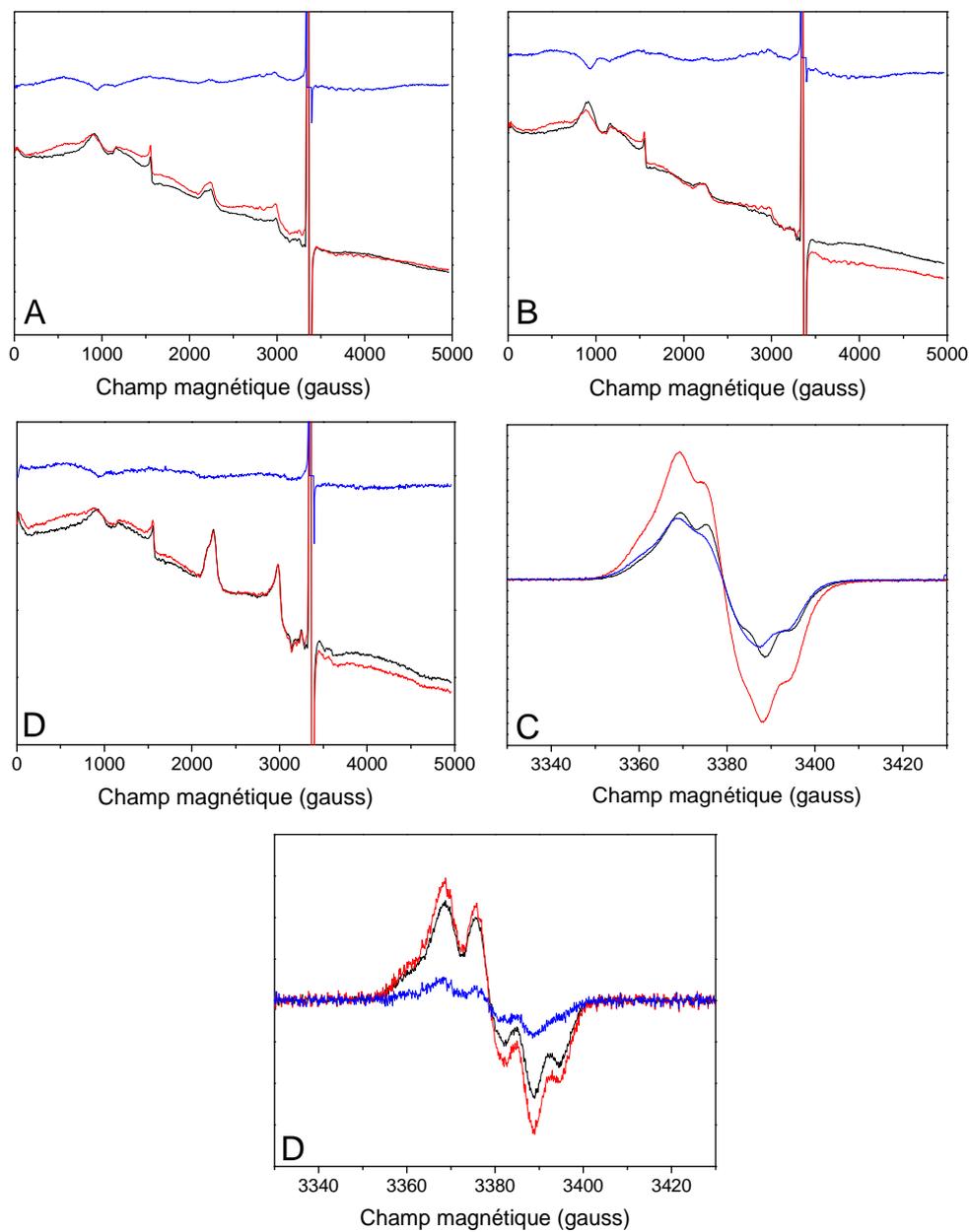


Figure 93 : Spectres RPE de l'échantillon de PSII Ca/I qui a reçu trois flashes à température ambiante, enregistrés dans les conditions suivantes : A. 4K ; B. 8,5 K ; C.15K ; D. Spectre Tyr_D' puissance 2 μW ; E. Spectre Tyr_D' puissance 5 mW. En noir, le spectre enregistré après adaptation à l'obscurité, en rouge le spectre enregistré après éclaircissement à 200K et en bleu, le spectre de différence.

7) Discussion

Nous allons maintenant comparer les résultats que nous avons obtenus dans nos échantillons lorsqu'on substitue le Cl^- par I^- avec ceux décrits dans la littérature.

Concernant l'activité, plusieurs résultats ont été présentés :

- Ono et al.¹³⁴ ont montré que des membranes de PSII qui ont été lavées dans un milieu sans Cl^- , puis remises en présence de I^- montrent un dégagement d'oxygène de 17% par rapport à une réactivation par du Cl^- . Ils ont expliqué leurs résultats par l'effet réducteur de l'iodure sur le PSII. Notre activité en présence d' I^- baisse moins que dans cette expérience (60% d'activité résiduelle), ce qui pourrait indiquer que la procédure d'échange n'a pas été suffisamment efficace. Les résultats cinétiques et thermodynamiques que nous avons obtenus montrent un clair phénotype en présence d'iodure et vont à l'encontre de cette hypothèse. Ono et al. ont montré l'irréversibilité de l'inhibition avec I^- , contrairement à nous. Une autre publication⁸⁵ rapporte une inhibition totale en présence d'iodure mais réversible. C'est donc un sujet extrêmement difficile à discuter, qui met en jeu des effets secondaires de la substitution à l'iodure.

- Ikeuchi et al.¹³⁵ ont réalisé des mesures sur des membranes de PSII déplétées en Cl^- par un traitement au NaCl (qui enlève également les protéines extrinsèques de 18 et 23 kDa), puis mises en présence de 10 mM de NaI. L'activité baisse immédiatement pour atteindre un niveau de 25% par rapport à un échantillon contrôle repris dans 10 mM de NaCl. L'inhibition est plus importante que dans notre cas, mais cela peut venir de l'absence des protéines extrinsèques qui protégerait le PSII de l'action inhibitrice de l'iodure.

- Homann¹³⁸ a déplété en Cl^- des membranes de PSII par un traitement à pH élevé qui permet de conserver les protéines extrinsèques. Après 30 min en présence de 20 mM d' I^- , le PSII a été lavé dans un milieu sans anion pour enlever l'iodure non lié. Ces expériences ont été réalisées en présence de bétaine pour favoriser la rétention des protéines extrinsèques. Dans ce cas, l'activité avec I^- est de 60% par rapport à un échantillon contrôle, ce qui est beaucoup plus proche de la valeur que nous avons déterminée. Il semblerait donc que la présence de bétaine et des protéines extrinsèques soit un facteur très important pour empêcher l'inhibition du dégagement d'oxygène par I^- .

- Bryson et al.¹⁹¹ ont également réalisé des mesures pour mettre en avant le rôle des protéines extrinsèques. D'un côté, du PSII a été déplété en Cl^- par un traitement au NaCl qui enlève aussi les protéines extrinsèques et de l'autre, du PSII a été dialysé contre un milieu sans chlorure, ce qui permet de conserver les protéines extrinsèques. L'activité sous

éclaircissement continu a été mesurée dans un milieu contenant une concentration croissante d'I⁻. Dans les deux cas, l'activité remonte lorsque la concentration atteint une certaine valeur (entre 2 et 3 mM), puis diminue. L'activité maximale obtenue à cette concentration est 4 fois plus grande en présence des protéines extrinsèques qu'en leur absence. Cependant, une autre différence qui nous interpelle dans ces résultats est le niveau d'activité avec 0 mM d'I⁻. Dans le cas du traitement au NaCl, l'activité est nulle, suggérant que tout le Cl⁻ a bien été enlevé. Par contre, l'activité après dialyse atteint 300 $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl}$ (activité de 50-60% par rapport au contrôle). Cette observation rejoint celle que nous avons faite sur le travail de Lindberg et al. en introduction. La procédure de dialyse utilisée dans les deux expériences est identique et vraisemblablement pas suffisamment efficace pour enlever tout le Cl⁻ du PSII. Quoiqu'il en soit, les auteurs en ont conclu que les protéines extrinsèques n'empêchaient pas l'accès de I⁻ au site de fixation, malgré le fait qu'il ait un diamètre plus grand que le Cl⁻ (4,40 Å contre 3,63 Å), conclusion qui reste valable. Ces résultats ont été interprétés comme l'existence de deux sites de fixation aux halogénures, un site à partir duquel le Cl⁻ ou I⁻ active le dégagement d'oxygène, et le second à partir duquel I⁻ inhibe directement ou indirectement par son effet sur le premier site. Il est suggéré que le premier site de fixation doit être rempli pour que l'inhibition suite au remplissage du deuxième site puisse avoir lieu. Cependant, nous pouvons relever une contradiction qui apparaît dans cette conclusion si l'observation que nous avons faite sur l'efficacité de la dialyse est correcte. Si les sites de haute affinité sont remplis de Cl⁻ au départ, alors l'ajout d'I⁻ même en très faible concentration devrait immédiatement avoir un effet inhibiteur sur l'activité, ce qui n'est pas le cas dans leur expérience. Cela ne signifie par pour autant que nous déclinons la possibilité d'existence d'un deuxième site de fixation. En effet, lorsque nous avons mesuré l'activité d'un échantillon de PSII Sr/Br biosynthétique dans du tampon contenant 60 mM de Cl⁻, nous avons observé qu'elle est 20% supérieure à celle mesurée dans du tampon contenant 60 mM de Br⁻. Cette observation est en accord avec l'existence d'un deuxième site de faible affinité dont le remplissage par du Cl⁻ stimulerait légèrement l'activité.

Sur les échantillons ayant incorporé de l'iodure à la place du chlorure, nous avons pu montrer par RPE que le déclin de la tyrosine Z oxydée est ralenti fortement, ce qui vient confirmer le ralentissement de la transition ($S_3\text{Tyr}_Z^{\bullet}$)' à $S_0\text{Tyr}_Z$ vu à 292 nm pour les échantillons biosynthétiques. Nous avons pu montrer par cette expérience également que la fraction de centres morts dans les échantillons Sr/I n'est pas plus grande que dans l'échantillon contrôle Sr/Cl. Ce résultat est en accord également avec les résultats RPE.

Plusieurs groupes ont également décrit des expériences de thermoluminescence sur du PSII de plantes déplété en Cl^- et réactivé par I^- .

- Ono et al.¹³⁴ ont mesuré la courbe de thermoluminescence provenant de la recombinaison $\text{S}_2\text{Q}_\text{B}^-$ de membranes de PSII qui ont été lavées dans un milieu sans Cl^- , puis remises en présence de I^- . Ils ont montré que la recombinaison avait lieu à la même température qu'en présence de Cl^- , mais que l'amplitude totale était diminuée. Ils ont expliqué ce résultat par la réduction du cluster de Mn_4Ca par l'iode.

- Ikeuchi et al.¹³⁵ ont réalisé des mesures sur des membranes de PSII déplétées en Cl^- par un traitement au NaCl (qui enlève également les protéines extrinsèques de 18 et 23 kDa), puis mises en présence de 10 mM de NaI . L'amplitude de la thermoluminescence suite à la recombinaison $\text{S}_2\text{Q}_\text{B}^-$ baisse de 50% à pH 7,5 par rapport à un échantillon contrôle et est quasiment nulle à pH 6,0. Ce résultat a été attribué à nouveau à la perte de charge positive de l'état S_2 par réduction d' I^- . La température de recombinaison est identique à celle d'un échantillon contrôle.

- Homann¹³⁸ a déplété en Cl^- des membranes de PSII par un traitement à pH élevé qui permet de conserver les protéines extrinsèques. Après 30 min en présence de 20 mM d' I^- , le PSII a été lavé dans un milieu sans anion pour enlever l'iode non lié. La recombinaison $\text{S}_2\text{Q}_\text{B}^-$ a lieu à une température plus élevée qu'un échantillon contrôle, ce qui a été interprété comme une baisse du potentiel d'oxydation de S_2 , qui a pour conséquence une conversion ralentie de S_2 en S_1 par incubation à l'obscurité.

Dans notre cas, nous avons réalisé des mesures de thermoluminescence sur les échantillons Ca/I et Sr/I . Pour la recombinaison de charges $\text{S}_2\text{Q}_\text{B}^-$, nous montrons que la thermoluminescence est quasiment nulle en présence d'iode, ce qui est en accord avec le résultat obtenu par Ikeuchi et al à pH 6,0. Cela peut être mis en corrélation avec l'instabilité de l'état S_2 que nous avons observé par RPE. Après un flash donné à l'échantillon de thylakoides préalablement adapté à l'obscurité, l'état S_2 est formé mais décline immédiatement vers l'état S_1 avant le début de la rampe de chauffe. Ce déclin peut s'expliquer par deux types de recombinaison :

1) L'absence de thermoluminescence provenant de la recombinaison $\text{S}_2\text{Q}_\text{B}^-$ impliquerait la possible réduction de l'état S_2 par I^- . En effet, l'iode est non seulement capable de prendre la place du chlorure, mais aussi de donner des électrons au côté donneur en absence de chlorure¹³⁵. Les centres en S_2 après le flash sont réduits rapidement par I^- avant le début de la rampe de chauffe. Ces centres ne peuvent donc plus émettre de luminescence. Cette voie est représentée en orange dans la Figure 94.

- 2) Une deuxième hypothèse serait que les voies non radiatives de recombinaison $S_2Q_B^-$ et S_2I^- deviendraient prépondérantes en présence d'iodure. Cette modification du rapport de la voie radiative par rapport aux voies non radiatives proviendrait d'une modification des équilibres entre les différents états intermédiaires qui se forment entre $S_2Q_B^-$ et S_1Q_A . En particulier, si la différence de niveaux d'énergie libre entre $S_1P_{680}^*Pheo$ et $S_1P_{680}^+Pheo^-$ (niveaux indiqués en rouge sur la Figure 94) augmente, alors les voies non radiatives seront favorisées par rapport à la voie radiative.

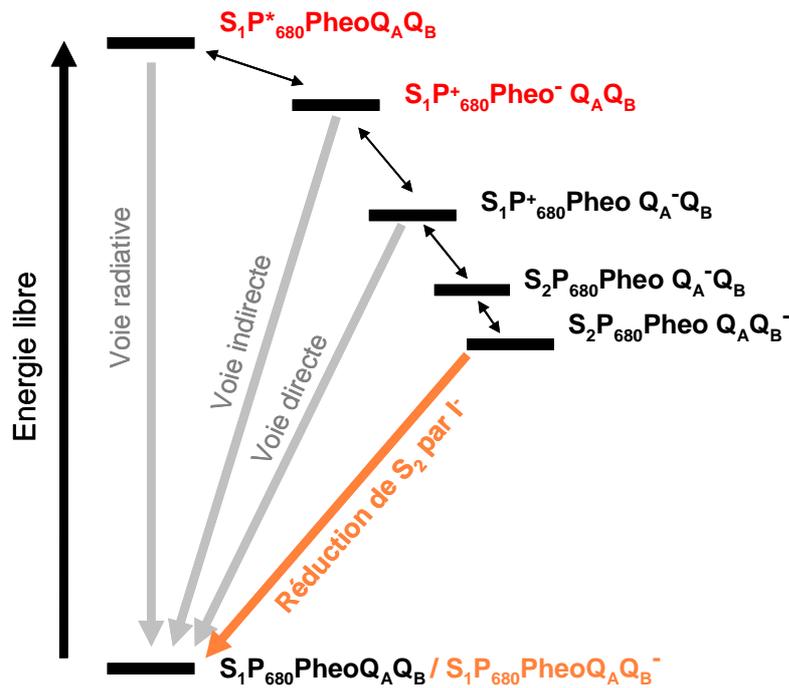


Figure 94 : La quasi-absence de thermoluminescence après 1 flash peut s'expliquer par deux phénomènes : 1) La réduction de S_2 par I^- ; 2) La prépondérance des voies non radiatives.

Pour la recombinaison de charges $S_3Q_B^-$, nous montrons que le pic de thermoluminescence est décalé de 8°C vers les basses températures, et que l'amplitude du pic est également diminuée. A nouveau, deux cas peuvent être considérés :

- 1) I^- réduit le cluster de Mn_4Ca dans l'état S_3 également. L'effet de l'iodure réducteur est dépendant de la température. Au début de la rampe de chauffe, la recombinaison $S_3Q_B^-$ débute, puis I^- commence à réduire S_3 et l'émission de thermoluminescence est stoppée, comme dans le cas de S_2 .
- 2) La fixation de I^- modifie les propriétés thermodynamiques intrinsèques du côté donneur ou accepteur. D'après la théorie de la thermoluminescence¹⁹², une baisse de la température de recombinaison accompagnée d'une baisse de l'amplitude signifie une augmentation du

potentiel redox de l'état S_3 , et donc une instabilité de cet état. Cette baisse de température pourrait également s'expliquer par une baisse du potentiel de Q_B qui devient plus réducteur. Dans ce cas, l'absence de thermoluminescence après un flash s'expliquerait seulement par le fait que l'amplitude d'émission est trop faible pour être détectée.

Nous pouvons proposer une expérience pour savoir si Γ est réducteur ou non du cluster de Mn_4Ca . Elle consisterait à mesurer le déclin du signal $S_2Q_A^-$ en présence de DCMU qui bloque le transfert d'électron entre Q_A et Q_B , par mesure des changements d'absorption à 320 nm. Le principe de la méthode est présenté Figure 95. A 320 nm, on mesure l'absorption lié à la quinone Q_A^- et aux Mn. Après un flash donné à un échantillon adapté à l'obscurité, on a formation de l'état $S_2Q_A^-$ dans 100% des centres. Si on suit les changements d'absorption après le flash à 320 nm, on va suivre le déclin d'absorption lié à la réduction de S_2 par Q_A^- (cas 1), ou par Γ (cas 2). Si Γ est non réducteur, le signal lié à S_2 et Q_A^- disparaît. Dans le cas contraire, une fraction des centres aura toujours Q_A^- présent à la fin de l'expérience et l'absorption ne sera pas nulle.

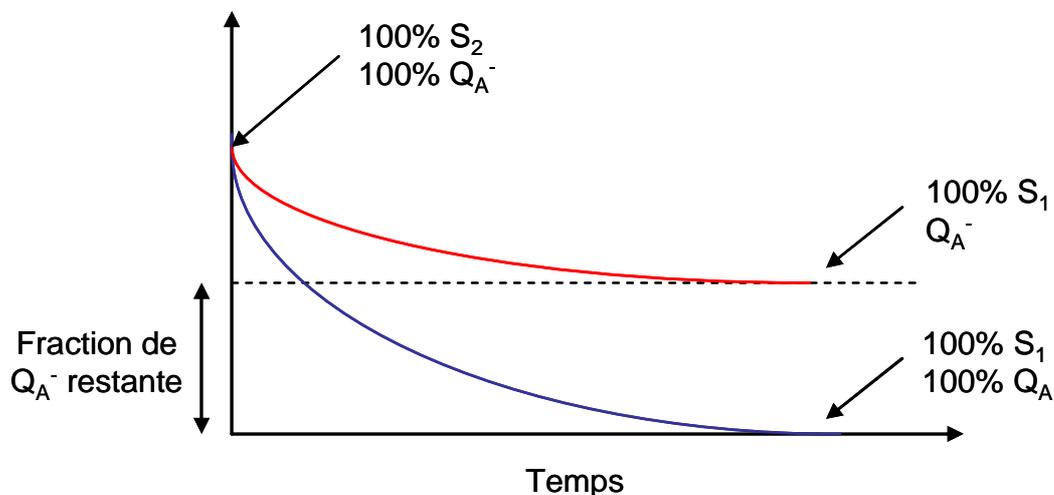


Figure 95 : Principe de la mesure du changement d'absorption à 320 nm d'un échantillon Ca/I pour savoir si Γ est réducteur de S_2 ou non. (1) résultat attendu si Γ n'est pas réducteur. (2) résultat attendu si Γ est réducteur. L'expérience serait réalisée avec DCMU pour former 100% de Q_A^- dans les centres.

Dans le cas de S_3 , il faudrait réaliser le même type d'expérience en ajoutant le DCMU entre le premier et le deuxième flash.

Chapitre V. STRUCTURE

I) Etude du blocage des états S_n en fonction de la température

1) Introduction

Nous avons montré dans le chapitre III qu'en abaissant la température, la transition $S_3 \rightarrow S_0$ était ralentie. Nous allons donc maintenant étudier l'effet de la température sur chacune des transitions du cycle des états S_n , en illuminant les échantillons de PSII par des flashes à diverses basses températures. La température de demi-inhibition, si elle est plus élevée ou plus basse dans les échantillons où les cofacteurs ont été substitués, et si cet effet varie en fonction de la transition, peut nous donner des informations sur le mécanisme impliqué dans la transition $S_i \rightarrow S_{i+1}$ et en les reliant aux données thermodynamiques de la réaction, et peut nous permettre de formuler des hypothèses concernant les mécanismes ayant lieu à chaque étape d'oxydation du cluster de Mn_4Ca . D'autre part nous espérons piéger des états intermédiaires dans le cas où nous pouvons atteindre des températures limites.

Dans la littérature, ce genre de caractérisation a déjà été réalisé soit par thermoluminescence, soit par spectroscopie RPE.

En thermoluminescence, la mesure repose sur la recombinaison de l'état S_2 et de l'état S_3 avec l'électron présent du côté accepteur. Dans les premiers travaux réalisés¹⁹³, la procédure complète d'illumination était réalisée à basse température, ce qui induisait des limitations provenant du côté accepteur en dessous de 230 K¹⁹⁴ pour toutes les transitions des états $S_i \rightarrow S_{i+1}$, exceptée celle de S_1 à S_2 (un seul électron peut être stocké à basse température du côté accepteur).

Les travaux suivants ont été réalisés avec des flashes donnés à basse température précédés de flashes à température ambiante pour éviter ce problème¹⁹⁵. Ils ont rapporté des valeurs de température de demi-inhibition de 178 K, 228 K et 250 K pour les transitions S_1 à S_2 , S_2 à S_3 et S_3 à S_0 respectivement. L'intérêt des mesures de thermoluminescence repose sur le fait que la bande B provient de la recombinaison de Q_B^- avec soit S_2 soit S_3 et que le décalage en température entre les deux types de recombinaison permet de quantifier la part de S_2 et de S_3 .

La deuxième méthode utilisable pour déterminer les valeurs des températures de demi-inhibition pour chaque transition est la spectroscopie RPE. Nous disposons d'une sonde

spectroscopique très facile à mesurer qui est le signal multilignes caractéristique de la formation de l'état S_2 . Nous pouvons également dans ce cas réaliser un préflash pour éviter les problèmes de synchronisation d'échantillon. Les valeurs déterminées par cette méthode sur des membranes enrichies en PSII sont de 220-225 K pour la transition S_0 à S_1 , 135-140 K pour la transition S_1 à S_2 , 230 K pour la transition S_2 à S_3 et 235 K pour la transition S_3 à S_0 ¹⁹⁶.

Nous avons choisi de mesurer la dépendance en température des transitions S_2 à S_3 et S_3 à S_0 par thermoluminescence, et celle des transitions S_1 à S_2 et S_0 à S_1 par spectroscopie RPE. Les échantillons sont soumis à des flashes saturants à température variable. Avec les montages dont nous disposons, la température en thermoluminescence ne peut pas être inférieure à 200 K, alors qu'en RPE, on peut refroidir l'échantillon jusqu'à une température de 100 K.

2) Méthodes de mesure

a) Transitions $S_1 \rightarrow S_2$ et $S_0 \rightarrow S_1$: Résonance Paramagnétique Electronique

Comme nous l'avons déjà dit, les mesures de dépendance en température par RPE sont fondées sur l'existence du signal multilignes caractéristiques des centres se trouvant dans l'état S_2 .

i. Protocole blocage S_1 à S_2

Les échantillons de PSII sont dilués à 1 mg de chlorophylle/mL puis introduits dans des tubes RPE. Après la procédure de préflash, 0,5 mM de PPBQ dilué dans du DMSO sont ajoutés dans chaque tube comme accepteur final d'électrons. Immédiatement après, les échantillons sont rapidement immergés dans un bain de carboglace-éthanol à 198 K, puis transférés dans l'azote liquide, toujours à l'obscurité.

Le tube est inséré dans un cryostat à l'obscurité. Le cryostat a été au préalable refroidi à la température désirée. Après 30 secondes nécessaires pour amener l'échantillon à la bonne température, l'échantillon est flashé. Immédiatement après le flash, le tube est replacé dans un bain à 198 K puis dans l'azote liquide avant d'être inséré dans la cavité RPE. Les spectres RPE sont enregistrés avant le flash pour connaître la ligne de base, puis après pour estimer la quantité de signal multilignes formé.

ii. Protocole blocage S_0 à S_1

Les échantillons de PSII sont dilués à 1 mg de chlorophylle/mL puis introduits dans des tubes RPE. Après la procédure de préflash, 0,5 mM de PPBQ dilué dans du DMSO sont ajoutés dans chaque tube comme accepteur final d'électrons. Les échantillons sont ensuite soumis à 3 flashes à température ambiante pour amener les centres dans l'état S_0 , puis immédiatement congelés par immersion dans un bain à 198 K durant quelques secondes, puis dans l'azote liquide.

Le tube est inséré dans un cryostat à l'obscurité. Le cryostat a été au préalable refroidi à la température désirée. Après 30 secondes nécessaires pour amener l'échantillon à la bonne température, l'échantillon est flashé. Après ce premier flash à basse température variable, le cryostat est réchauffé à température ambiante et l'échantillon est à nouveau flashé pour passer dans l'état S_2 . Nous pouvons ainsi mesurer la quantité de signal multilignes formé, qui est proportionnelle à la quantité de centres dans lesquels la transition $S_0 \rightarrow S_1$ a eu lieu. Immédiatement après ce dernier flash, le tube est replacé dans un bain à 198 K puis dans l'azote liquide avant d'être inséré dans la cavité RPE. Les spectres RPE sont enregistrés avant le flash dans l'état S_0 , puis après les deux flashes pour estimer la quantité de signal multilignes formé. Le protocole est résumé dans la Figure 96.

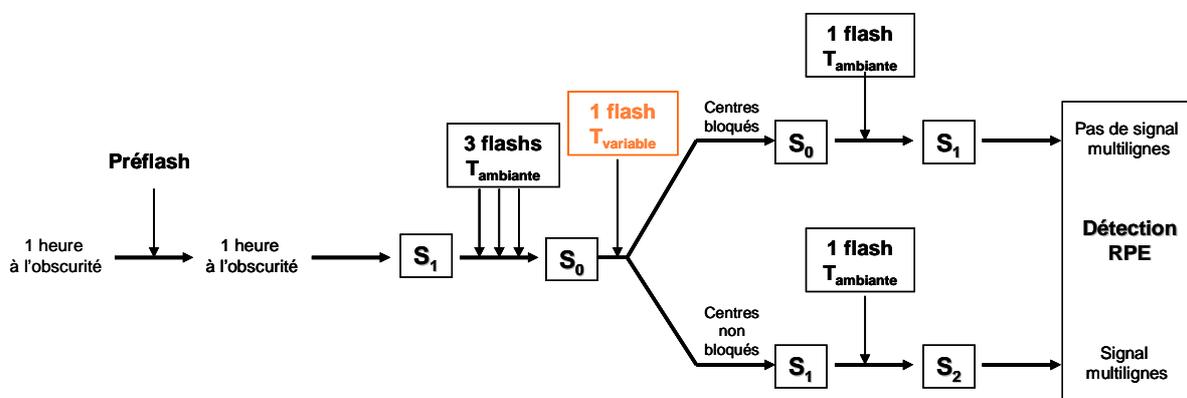


Figure 96 : Protocole d'étude de la dépendance en température de la transition $S_0 \rightarrow S_1$.

b) Transitions $S_2 \rightarrow S_3$ et $S_3 \rightarrow S_0$: Thermoluminescence

Par mesure de la bande B qui correspond aux recombinaisons $S_2Q_B^-$ et $S_3Q_B^-$, nous pouvons suivre la formation des états S_2 et S_3 d'un échantillon de PSII préalablement adapté à l'obscurité. Les échantillons de PSII sont préalablement dilués à une concentration de 5 μg de

chlorophylle/mL dans du TP1, puis adaptés à l'obscurité durant 1 heure à température ambiante. Le dépôt de l'échantillon dans la cellule de mesure se fait à l'obscurité totale.

Pour étudier la transition S_2 à S_3 , l'échantillon de PSII synchronisé majoritairement en S_1 reçoit un flash à température ambiante pour amener les centres en S_2 , puis l'échantillon est refroidi, flashé à la température désirée, puis après 10 secondes utiles pour ramener l'échantillon à la température de -10°C , une rampe de température de -10°C à 90°C est lancée, à la vitesse de $0,33^\circ\text{C/s}$, pour permettre la recombinaison. Plus la température du deuxième flash est basse, plus la transition S_2 à S_3 sera bloquée. Etant donné que les recombinaisons $S_3Q_B^-$ et $S_2Q_B^-$ ont des caractéristiques différentes, nous pouvons estimer la contribution respective de chaque recombinaison dans la courbe de thermoluminescence que nous mesurons à chaque température.

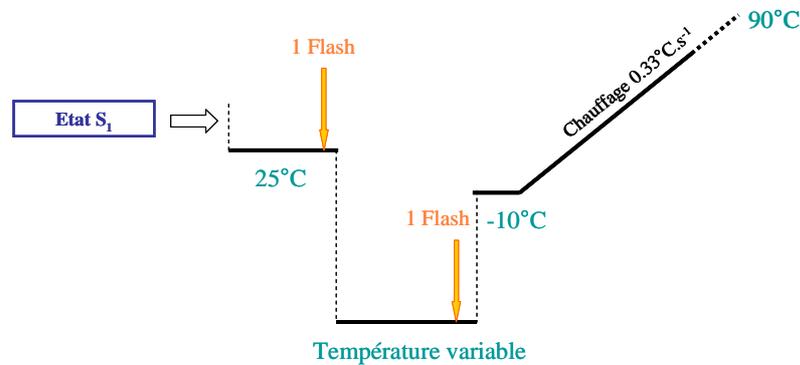


Figure 97 : Protocole utilisé en thermoluminescence pour l'étude de la transition $S_2 \rightarrow S_3$.

Pour étudier la transition S_3 à S_0 , l'échantillon de PSII reçoit deux flashes à température ambiante pour amener les centres dans l'état S_3 . Il est refroidi à la température désirée, et un troisième flash est donné à cette température. Après 10 secondes pour réchauffer l'échantillon à -10°C , la rampe de température est lancée. Selon la température du troisième flash, une certaine fraction des centres reste dans l'état S_3 et émet de la thermoluminescence par recombinaison avec Q_B^- . Les centres qui passent dans l'état S_0 ne peuvent pas émettre de thermoluminescence puisque S_0 est un état stable. Cependant, étant donné l'existence de manques et de doubles coups, une certaine fraction des centres se trouve encore dans l'état S_2 ou dans l'état S_3 après le troisième flash. Une petite émission de thermoluminescence est donc quand même mesurée, provenant des centres encore dans l'état S_2 ou S_3 lorsque le système n'est pas bloqué.

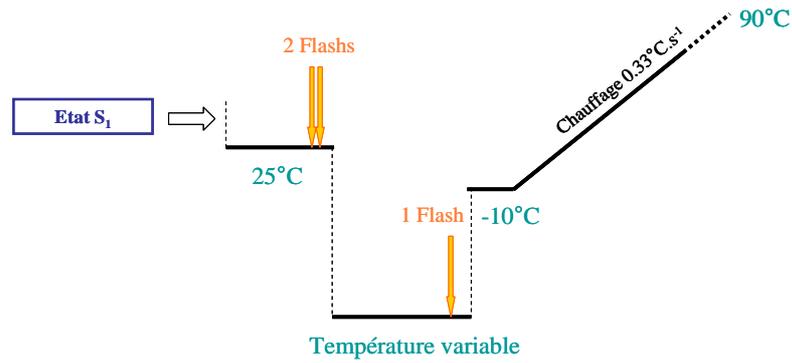


Figure 98 : Protocole utilisé en thermoluminescence pour l'étude de la transition $S_3 \rightarrow S_0$.

3) Résultats

a) Blocage $S_2 \rightarrow S_3$

i. Dépendance en température de la transition $S_2 \rightarrow S_3$ dans les thylakoides

Nous avons commencé par mesurer la température de blocage de la transition $S_2 \rightarrow S_3$, pour les quatre types d'échantillons Ca/Cl, Ca/Br, Sr/Cl et Sr/Br.

Nous mesurons d'abord l'émission de thermoluminescence des recombinaisons $S_2Q_B^-$ et $S_3Q_B^-$ après un flash et deux flashes à 0°C , qui nous serviront de contrôles pour déterminer par la suite la part de recombinaison $S_2Q_B^-$ et $S_3Q_B^-$ dans chaque pic de thermoluminescence enregistré après un flash à température ambiante suivi par un flash à basse température.

La Figure 99 présente les courbes d'émission de thermoluminescence mesurées sur l'échantillon Ca/Cl. La courbe en bleu foncé qui correspond à la recombinaison $S_3Q_B^-$ après deux flashes montre comme attendu l'aire sous la courbe la plus grande et une température de 50°C . La courbe en orange a été enregistrée après un flash à température ambiante, correspondant à la recombinaison $S_2Q_B^-$. L'aire sous la courbe est minimale dans ce cas et le maximum est atteint pour une température légèrement plus élevée égale à 52°C que pour la recombinaison $S_3Q_B^-$. Les autres courbes d'émission de thermoluminescence ont été enregistrées après un flash à température ambiante pour amener l'échantillon dans l'état S_2 , suivi par un flash à basse température, variant de -10°C à -70°C . A -10°C (courbe rose), on peut supposer que la transition S_2 à S_3 n'est pas du tout inhibée, c'est pourquoi on observe un pic de thermoluminescence identique à celui de la recombinaison $S_3Q_B^-$ en bleu foncé. Ensuite, plus l'échantillon est éclairé à basse température, plus l'aire sous la courbe de thermoluminescence est petite, et plus le pic se décale vers les hautes températures, pour

finale­ment arriver à très basse température à un pic de thermoluminescence presque identique à celui issu de la recombinaison contrôle $S_2Q_B^-$. Ceci signifie que la transition S_2 à S_3 est totalement bloquée à basse température.

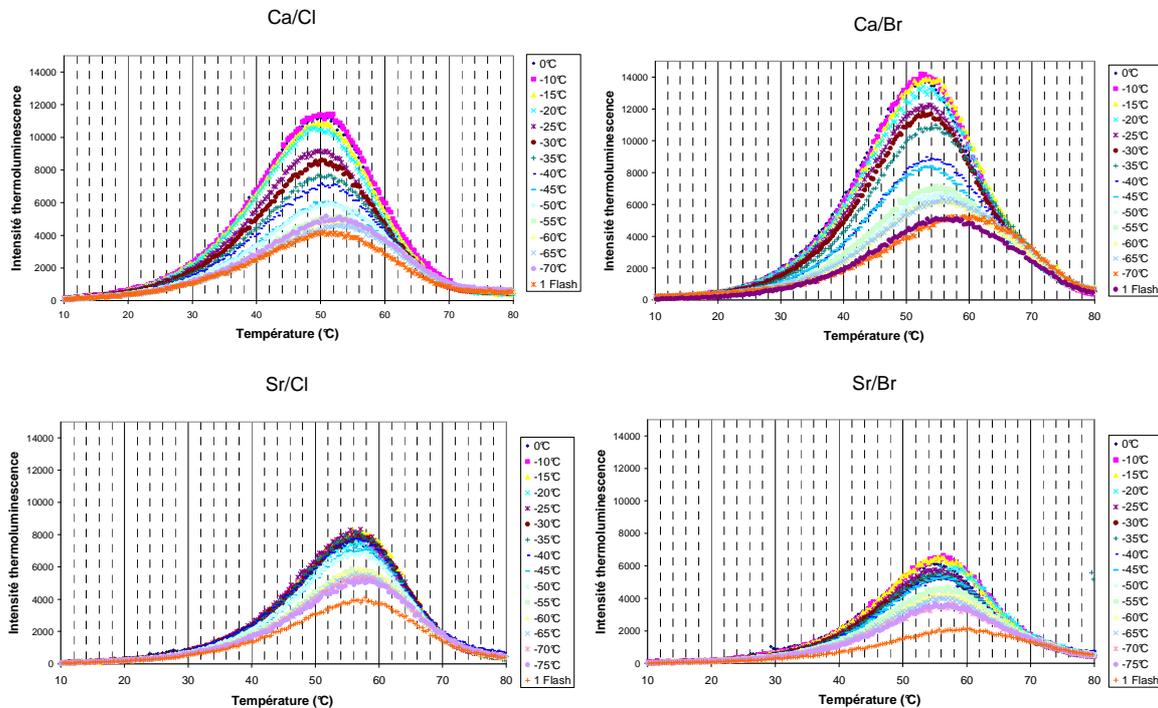


Figure 99 : Etude de la dépendance en température de la transition S_2 à S_3 dans les échantillons de thylakoides Ca/Cl, Ca/Br, Sr/Cl et Sr/Br (Chl = 50 $\mu\text{g/mL}$). Les courbes de thermoluminescence ont été enregistrées sur un échantillon qui a été adapté à l'obscurité, a reçu un flash à température ambiante, puis un flash à température variable (indiquée dans la colonne à droite de la figure).

Pour pouvoir déterminer les températures de demi-inhibition de chaque transition, les courbes présentées Figure 99 ont été enregistrées pour chaque échantillon. Pour chaque courbe de thermoluminescence obtenue à basse température, nous avons déterminé à l'aide du solveur Excel et des courbes des deux contrôles 1 flash et deux flashes à température ambiante, quelle part de luminescence est due à la recombinaison $S_2Q_B^-$ et quelle part est due à la recombinaison $S_3Q_B^-$. Nous avons pu ainsi représenter en fonction de la température du deuxième flash, le pourcentage de S_3 (qui est en fait le pourcentage de thermoluminescence identique à celle obtenue après 2 flashes à température ambiante) présent dans l'échantillon de thylakoides après un flash à température ambiante et un flash à basse température. Plus la température du flash est basse, plus la proportion de centres dans l'état S_3 est faible.

La Figure 100 montre les courbes de dépendance en température de chacun des échantillons pour la transition $S_2 \rightarrow S_3$.

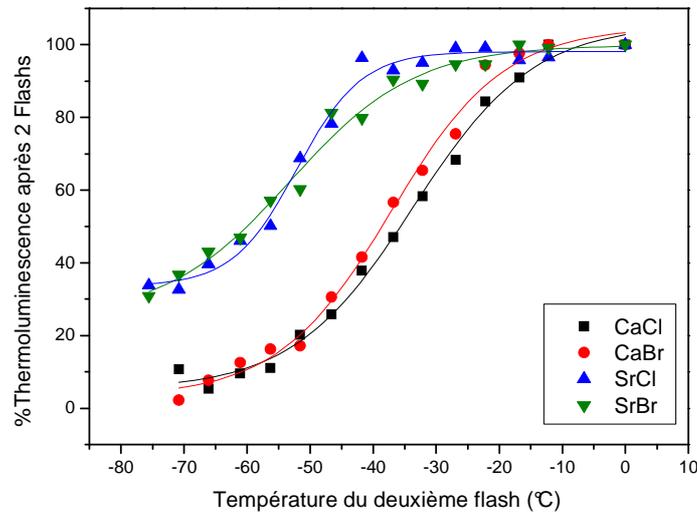


Figure 100 : Courbes de dépendance en température de la transition S_2 à S_3 pour les quatre types d'échantillons de thylakoïdes ($\text{Chl} = 50 \mu\text{g/mL}$). Le pourcentage de S_3 a été déterminé en estimant la part relative de recombinaison $S_2Q_B^-$ et $S_3Q_B^-$ dans chaque émission de thermoluminescence de la figure précédente.

On observe : 1) les courbes des échantillons Ca/Cl et Ca/Br sont superposées et les courbes des échantillons Sr/Cl et Sr/Br sont superposées. L'échange Cl^-/Br^- n'a donc pas d'effet sur les températures d'inhibition des transitions $S_2 \rightarrow S_3$, contrairement à l'échange $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$; 2) les courbes des échantillons contenant du Sr^{2+} à la place du Ca^{2+} sont déplacées vers les basses températures. La température de demi-inhibition des thylakoïdes Ca/Cl et Ca/Br est de -36°C environ, et celles des thylakoïdes Sr/Cl et Sr/Br est de -59°C .

Une autre remarque importante à faire sur la Figure 100 est qu'à basse température (-70°C), dans les échantillons contenant du Sr^{2+} , on n'atteint pas 0% de S_3 mais la courbe donne l'impression d'avoir atteint un palier aux environs de 30%. Nous avons voulu savoir si ces 30% correspondaient à des centres qui ne sont pas bloqués en S_2 lors de la transition à basse température. Un moyen pour répondre à cette question est une mesure de spectroscopie RPE en utilisant comme sonde le signal multilignes caractéristique de l'état S_2 . Un échantillon de PSII Sr/Cl a été adapté à l'obscurité, éclairé par un flash à température ambiante suivi d'un éclairage à 200 K ($\sim -75^\circ\text{C}$) (Figure 101). Son contrôle est un échantillon de PSII qui a reçu deux flashes à température ambiante. Nous n'avons pas utilisé de procédure de préflash pour nous placer dans les mêmes conditions que la mesure de thermoluminescence. Hormis la

différence d'échantillon PSII/thylakoides, l'autre différence entre les deux expériences est l'utilisation de PPBQ comme accepteur d'électrons pour la RPE.

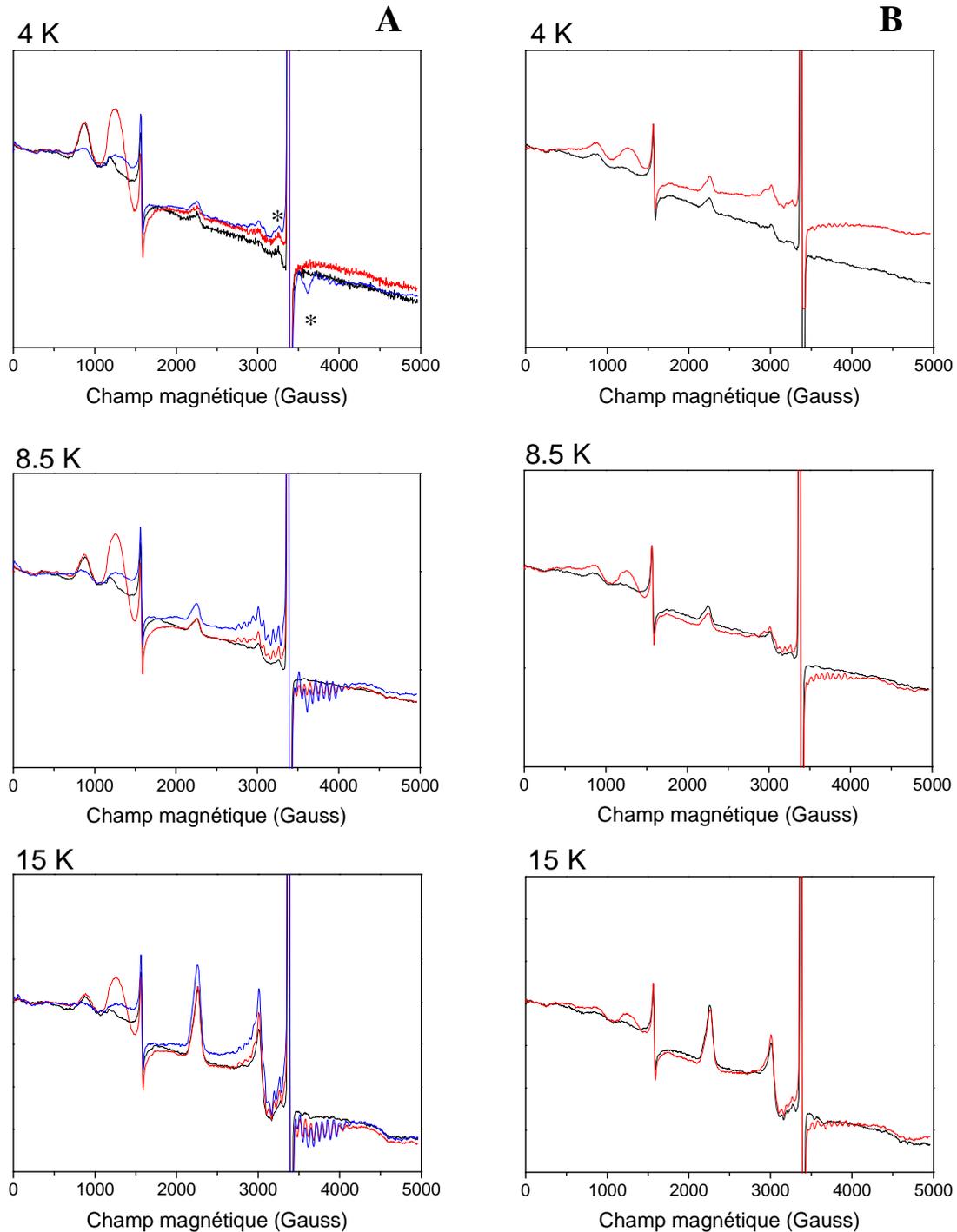


Figure 101 : Spectres RPE de l'échantillon de PSII Sr/Cl. Colonne A. Echantillon qui a été adapté à l'obscurité (en noir), puis a reçu 1 flash à température ambiante (en rouge), puis un éclaircissement à 200K (en bleu). Colonne B. Echantillon contrôle qui a été adapté à l'obscurité (en noir), puis a reçu 2 flashes à température ambiante (en rouge). 0,5mM de PPBQ dilué dans du DMSO a été ajouté dans le tube comme accepteur final d'électrons.

Nous observons qu'il y a augmentation de la taille des raies du signal multilignes après éclairage à 200 K. Cela signifie qu'il y a encore des centres en S_1 après un flash à température ambiante. Nous savons qu'après une heure d'adaptation à l'obscurité, il y a environ 75 % de centres dans l'état $S_1\text{Tyr}_D^\bullet$ et 25% de centres dans l'état $S_0\text{Tyr}_D^\bullet$ (ou $S_1\text{Tyr}_D$). Les centres $S_0\text{Tyr}_D^\bullet$ vont passer dans l'état $S_1\text{Tyr}_D^\bullet$ après le premier flash (état qui ne donne pas de signal multilignes), puis dans l'état $S_2\text{Tyr}_D^\bullet$ après l'éclairage à 200 K. C'est cette fraction de centres qui est à l'origine de l'augmentation du signal multilignes.

Nous pouvons maintenant relier cette observation aux résultats de thermoluminescence. Après un flash, la thermoluminescence provient de la recombinaison de 75 % des centres car 25 % des centres sont encore dans l'état S_1 . Après deux flashes, la thermoluminescence provient de la recombinaison de 75% des centres en S_3 (aux manques près) et de 25% de centres en S_2 (aux manques près). Après un flash à température ambiante suivi d'un flash à 200 K, tous les centres sont en S_2 (aux manques près), donc l'émission de thermoluminescence est plus importante qu'après un flash seul, même si la transition S_2 à S_3 est bloquée. Nous montrons ainsi que le rapport S_0/S_1 est plus grand dans les échantillons contenant du Sr^{2+} . C'est ce que nous avons détecté, au moins pour l'échantillon Sr/Br par analyse des oscillations à 292 nm.

On peut noter également sur le spectre à 4 K (Figure 101, colonne A) la présence d'un petit split signal après 1 flash à température ambiante puis un éclairage à 200K (pics positif et négatif indiqués par des astérisques). Ce split signal a déjà été observé chez *T.elongatus* et attribué à $S_2\text{Tyr}_Z^{\bullet 197}$.

ii. Dépendance en température de la transition $S_2 \rightarrow S_3$ dans le PSII

Les courbes précédentes ont été enregistrées sur des échantillons de thylakoides. Pour confirmer les résultats que nous venons de présenter, nous avons réalisé la même mesure sur des échantillons de PSII pour Ca/Cl et Sr/Cl uniquement puisque nous avons montré que l'échange Cl^-/Br^- n'a pas d'effet sur le blocage des transitions $S_i \rightarrow S_{i+1}$.

Nous observons Figure 102 que la température de demi-inhibition de l'échantillon de PSII Sr/Cl est plus basse que celle de l'échantillon Ca/Cl : -51°C pour Sr/Cl contre -37°C pour Ca/Cl. L'écart en température entre les échantillons de PSII contenant du Ca^{2+} et du Sr^{2+} est donc légèrement moins important que pour les échantillons de thylakoides, mais la différence reste tout de même tout à fait significative.

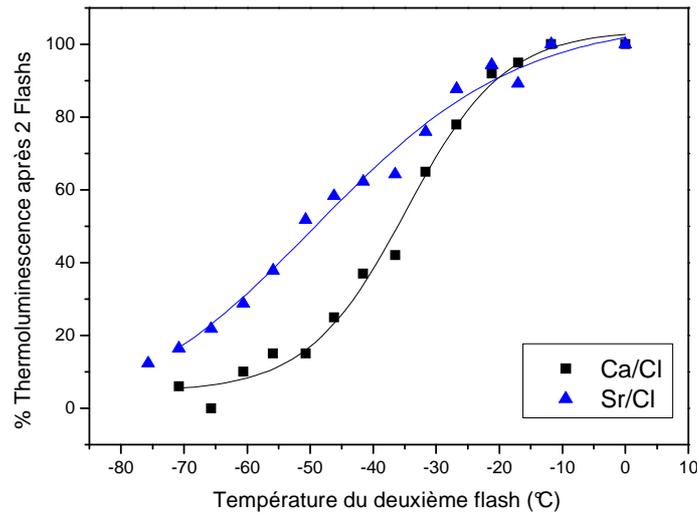


Figure 102 : Courbes de dépendance en température de la transition S_2 à S_3 pour les deux échantillons de PSII Ca/Cl et Sr/Cl. Le pourcentage de S_3 a été déterminé en estimant la part relative de recombinaison $S_2Q_B^-$ et $S_3Q_B^-$ dans chaque émission de thermoluminescence.

On remarque également qu'à la température la plus basse, 10% des centres de l'échantillon Sr/Cl ne sont pas bloqués alors que cette valeur était de 30% dans les thylakoides (Figure 100). Cela suggère que le rapport S_0/S_1 est modifié dans le PSII par rapport aux thylakoides.

iii. Effet du pH sur la dépendance en température de la transition $S_2 \rightarrow S_3$

Pour tenter d'expliquer cette différence dans la température d'inhibition de la transition S_2 à S_3 entre les échantillons Ca^{2+} et Sr^{2+} , nous avons réalisé des mesures de thermoluminescence à basse température à différents pH. En effet, comme nous l'avons noté dans l'introduction, le transfert de protons pourrait être impliqué dans le phénomène d'inhibition des transitions $S_i \rightarrow S_{i+1}$ à basse température. Comme montré dans la Figure 28, le pH n'a pas d'effet sur le relargage des protons dans le milieu au cours de la transition S_2 à S_3 , mais on peut envisager qu'il y ait un effet local du pH. En mettant en évidence un effet du pH sur la température d'inhibition de la transition, nous pourrions confirmer l'implication des protons dans la dépendance en température, et montrer que l'échange Ca^{2+}/Sr^{2+} induit des modifications qui ont des répercussions directes ou indirectes sur le transfert de protons au cours de la transition S_2 à S_3 .

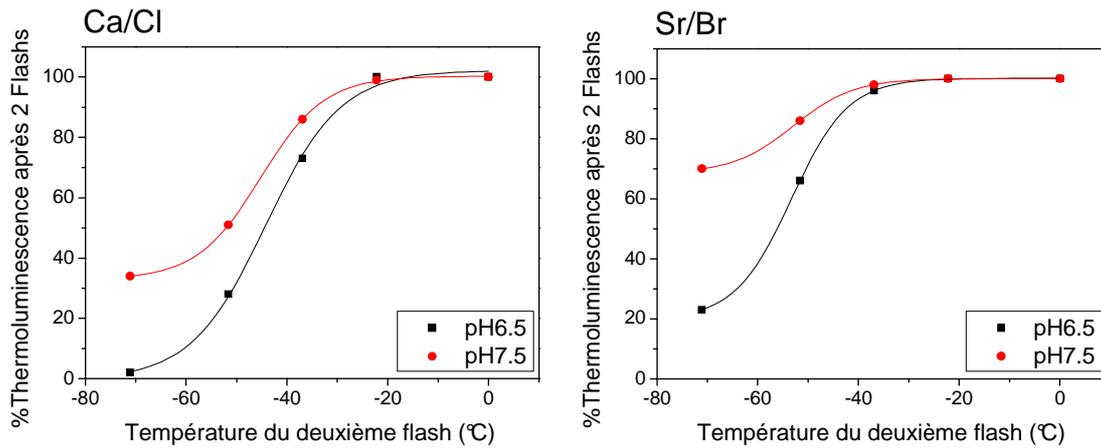


Figure 103 : Courbes de dépendance en température de la transition S_2 à S_3 pour les échantillons de thylakoides Ca/Cl (à gauche) et Sr/Br (à droite), à deux valeurs de pH. (Chl = 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) Le pourcentage de S_3 a été déterminé en estimant la part relative de recombinaison $S_2Q_B^-$ et $S_3Q_B^-$ dans chaque émission de thermoluminescence.

La Figure 103 montre le pourcentage de S_3 formé par un flash en fonction de la température à laquelle est éclairé l'échantillon dans l'état S_2 . Les échantillons ont été adaptés à l'obscurité à une concentration d'environ 2-3 mg Chl./mL dans du tampon à pH 6,5 (pH optimal pour l'activité du PSII), puis au moment de la mesure, ils ont été dilués dans une solution tampon de pH 6,5 ou 7,5. La dilution a été réalisée juste avant la mesure pour éviter que l'activité du PSII ne soit modifiée après une trop longue incubation dans une solution au pH inadapté.

Nous pouvons remarquer qu'à pH 7,5, l'inhibition n'est pas totale puisqu'il reste dans le cas de Ca/Cl, plus de 30% de centres dans l'état S_2 après un deuxième flash à -70°C , et dans le cas de Sr/Br, il y a encore 70% de centres en S_2 . Pour confirmer ce résultat, nous avons testé une plus large gamme de pH allant de 5,5 à 7,0, en flashant l'échantillon à -60°C . Cette température paraît adéquate car on peut voir que plus on descend en température, plus l'effet du pH est important. On ne choisit pas -70°C car c'est une valeur très difficile à atteindre avec notre montage. On obtient la Figure 104 qui représente le pourcentage de S_3 d'un échantillon de thylakoides Ca/Cl et Sr/Br qui a reçu un flash à température ambiante suivi d'un flash à -60°C , en fonction du pH de la solution dans laquelle a été dilué l'échantillon.

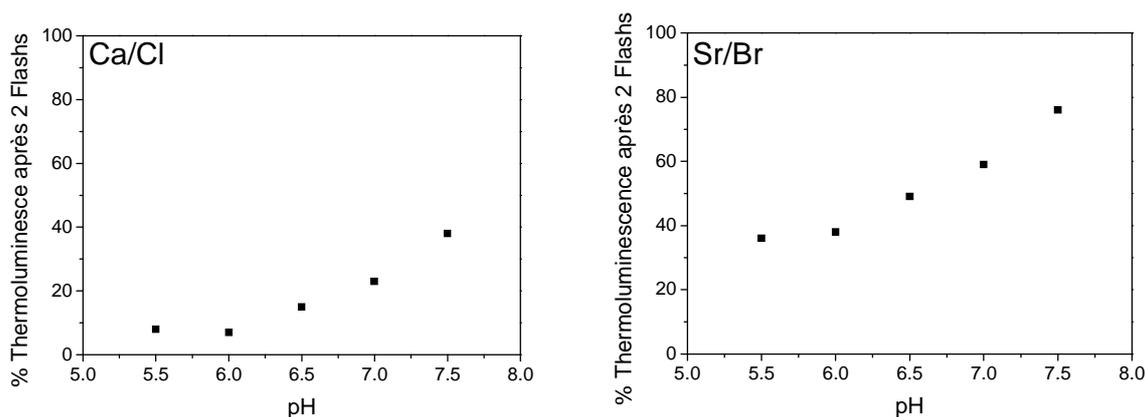


Figure 104 : Etude de la variation du pH sur le blocage de la transition S_2 à S_3 des échantillons de thylakoides Ca/Cl (à gauche) et Sr/Br (à droite). Les échantillons adaptés à l'obscurité (Chl = 50 $\mu\text{g/mL}$) ont reçu un flash à température ambiante, suivi d'un flash à -60°C .

On observe en premier lieu que le pourcentage de centres non bloqués a tendance à augmenter avec le pH pour les deux échantillons, à partir de pH 6,5. Si on suppose que le blocage fait intervenir le départ d'un proton qui va se fixer à un résidu A, à une valeur de pH supérieure au pK de ce groupe, le groupement A est déprotoné au départ et peut fixer le proton relargué au cours de la transition. Cette hypothèse est en accord avec l'absence d'effet du pH sur les protons relâchés dans le milieu au cours de la transition S_2 à S_3 .

On observe également que le pourcentage de S_3 est plus important pour Sr/Br que pour Ca/Cl à toutes les valeurs de pH. Cela est dû en partie à la plus grande proportion de centres dans l'état S_0 dans l'échantillon modifié après adaptation à l'obscurité. Une première remarque d'intérêt que nous pouvons faire est qu'il est possible d'obtenir 80% de S_3 dans un échantillon de PSII Sr/Br concentré. Il faudrait pour cela traiter l'échantillon pour avoir au départ les centres dans l'état $Q_A\text{Fe}^{\text{III}}Q_B$, puis l'illuminer par un éclairage continu à pH 7,5. C'est un protocole qui peut être utile pour des expériences ultérieures. La deuxième explication est que la valeur du pK du groupement A impliqué dans le blocage serait diminuée dans l'échantillon Sr/Br, permettant au groupement A d'être déprotoné plus facilement.

b) Blocage $S_3 \rightarrow S_0$

Nous avons procédé de manière identique pour étudier la dépendance en température de la transition S_3 à S_0 , en mesurant tout d'abord les deux courbes de thermoluminescence qui

nous serviront de contrôles : après 2 flashes à température ambiante pour la recombinaison $S_3Q_B^-$ (Figure 105, orange) et après 3 flashes à température ambiante. Après 3 flashes, l'état S_0 est formé et cet état ne donne pas de thermoluminescence. Malgré tout, du fait de l'adaptation à l'obscurité sans procédure de préflash et de l'existence de doubles coups et de manques, un certain nombre de centres se trouvent dans les états S_2 et S_3 après 3 flashes et sont capables d'émettre de la thermoluminescence. C'est pour cela que nous observons quand même une émission de thermoluminescence relativement importante après 3 flashes (Figure 105, courbe bleu foncée).

La Figure 105 montre également les courbes de thermoluminescence observées après 2 flashes à température ambiante suivis d'un flash à basse température, variant de -10°C à -60°C . Lorsque les centres PSII sont bloqués en S_3 à basse température, l'émission de thermoluminescence est importante car S_3 est l'état qui émet le maximum de thermoluminescence par recombinaison avec Q_B^- .

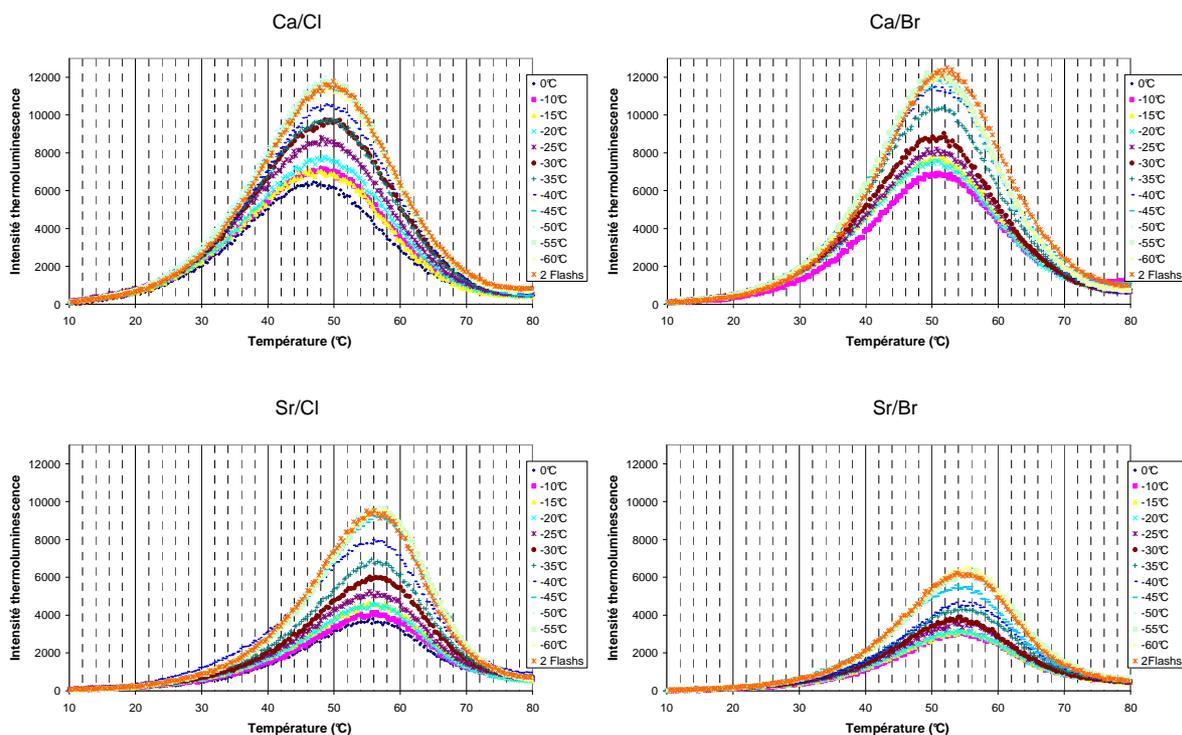


Figure 105 : Etude de la dépendance en température de la transition S_3 à S_0 de l'échantillon de thylakoides Ca/Cl (Chl = $50 \mu\text{g/mL}$). Les courbes de thermoluminescence ont été enregistrées sur un échantillon qui a été adapté à l'obscurité, a reçu 2 flash à température ambiante, puis 1 flash à température variable (indiquée dans la colonne à droite de la figure).

Pour pouvoir observer plus aisément la dépendance en température de la transition S_3 à S_0 , nous avons calculé le paramètre suivant pour chaque température du troisième flash :

$$\%S_3 = \frac{\text{Aire(temp)} - \text{Aire(3F)}}{\text{Aire(2F)} - \text{Aire(3F)}}$$

Avec Aire(temp) correspondant à l'aire sous la courbe après 2 flashes à température ambiante suivis d'un flash à température variable, Aire(3F) correspondant à l'aire sous la courbe après 3 Flashs à température ambiante et Aire(2F) l'aire sous la courbe après 2 Flashs à température ambiante.

Le paramètre « $\%S_3$ » qui reflète la proportion de centres dans l'état S_3 est égal à 1 lorsque tous les centres sont bloqués en S_3 et à 0 lorsque la transition S_3 à S_0 n'est pas inhibée. Nous l'avons représenté en fonction de la température du troisième flash (Figure 106).

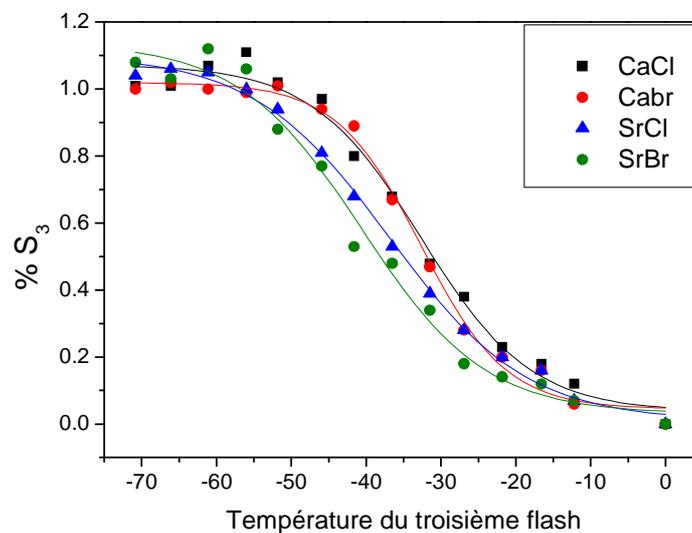


Figure 106 : Courbes de dépendance en température de la transition S_3 à S_0 des 4 types d'échantillons de thylakoïdes (Chl = 50 $\mu\text{g/mL}$). Les courbes de thermoluminescence ont été enregistrées sur un échantillon qui a été adapté à l'obscurité, a reçu 2 flashes à température ambiante, puis 1 flash à la température indiquée. Le pourcentage de S_3 a été estimé selon la méthode décrite dans le texte.

On observe à nouveau que les courbes correspondant aux échantillons Ca/Cl et Ca/Br sont superposées. La température de demi-inhibition de ces échantillons est d'environ $-31,5^\circ\text{C}$. Les échantillons où le calcium a été substitué par du strontium ont une température de demi-inhibition plus basse : -35°C pour Sr/Cl et -38°C pour Sr/Br.

De la même manière que pour la transition S_2 à S_3 , nous avons voulu étudier l'effet du pH sur la température d'inhibition de cette transition durant laquelle deux protons sont relâchés. Nous avons représenté le paramètre « $\%S_3$ » qui reflète le pourcentage d'inhibition de la transition S_3 à S_0 en fonction de la température du troisième flash, à trois pH différents :

5,5 en rouge, 6,5 en noir et 7,5 en bleu. La mesure a été réalisée pour les thylakoides Ca/Cl (Figure 107) et Sr/Br (Figure 108).

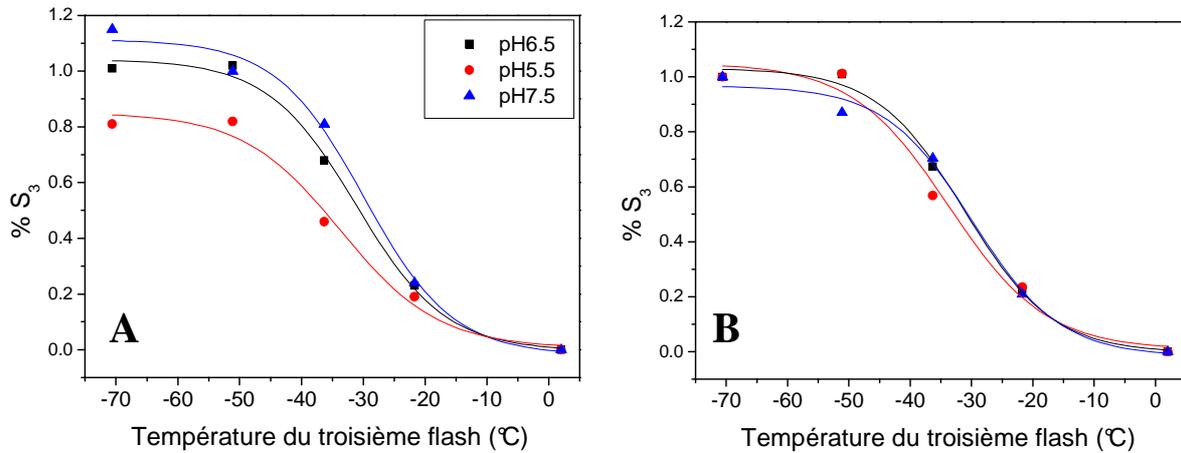


Figure 107 : Courbes de dépendance en température de la transition S_3 à S_0 pour les échantillons de thylakoides Ca/Cl, à trois valeurs de pH. Panneau A, la figure non normalisée et panneau B, la figure normalisée à 1 pour la température la plus froide. Les échantillons adaptés à l'obscurité (Chl = 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ont reçu deux flashes à température ambiante, suivi d'un flash à température variable.

Pour les thylakoides Ca/Cl (Figure 107A), on remarque qu'à très basse température (-70°C), à pH 6,5 on atteint bien une valeur de 1 pour le paramètre « % S_3 », comme attendu lorsque la transition est complètement bloquée. Par contre, pour les pH 5,5 et 7,5, on n'atteint pas une valeur de 1, mais soit supérieure à 1 pour le pH 7,5 soit inférieure à 1 pour le pH 5,5. Pour pouvoir comparer avec plus de justesse les températures de demi-inhibition, nous avons normalisé le dernier point de la mesure (-70°C) à une valeur de 1 pour les 3 pH.

Après normalisation (Figure 107B), les 3 courbes correspondant au trois pH sont superposées. La demi-inhibition de la transition S_3 à S_0 est atteinte à la température de -31°C quel que soit le pH. On montre quand même un effet du pH : à bas pH, il semblerait que tous les centres ne soient pas bloqués car on atteint seulement 80% de S_3 à basse température. On peut expliquer cet effet par deux hypothèses : soit la modification du pH induit une modification de la structure, soit l'acidification du milieu entraîne la protonation d'un groupe qui empêche le blocage de la transition. Dans ce dernier cas, cette expérience est à réitérer avec beaucoup plus de valeurs de pH, pour déterminer le pK du groupe impliqué.

Pour les thylakoides Sr/Br, les données ont-elles aussi été normalisées à la valeur de 1 à -70°C (Figure 108).

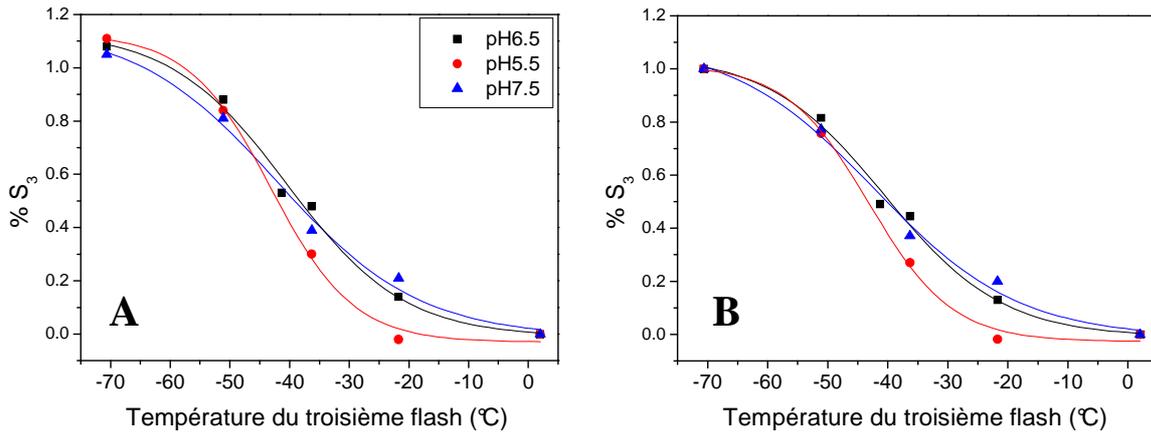


Figure 108 : Courbes de dépendance en température de la transition S_3 à S_0 pour les échantillons de thylakoides Sr/Br, à trois valeurs de pH. A gauche, la figure non normalisée et à droite, la figure normalisée à 1 pour la température la plus froide. Les échantillons adaptés à l'obscurité (Chl = 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ont reçu deux flashes à température ambiante, suivi d'un flash à température variable.

Les courbes correspondant aux pH 6,5 et 7,5 sont superposées. Pour la courbe correspondant au pH 5,5, elle est légèrement décalée vers les basses températures entre 0°C et -40°C, c'est-à-dire que l'inhibition est moins grande à température comprise entre 0°C et -40°C. Cependant, la température de demi-inhibition reste inchangée et a une valeur de -41°C quel que soit le pH.

Dans le cas de l'échantillon Sr/Br, on n'observe plus d'effet du pH. Une hypothèse est que le groupement protonable dont nous avons mis en évidence l'implication lors du blocage de la transition $S_3 \rightarrow S_0$ dans Ca/Cl, a un pK plus haut en présence de Sr^{2+} . Le groupement serait donc toujours protoné dans la gamme de pH étudiée et n'implique pas de blocage à bas pH. Il faudrait à nouveau réaliser cette expérience sur une plus large gamme de pH pour voir si on arrive à empêcher le blocage à une certaine valeur de pH.

c) Blocage $S_1 \rightarrow S_2$

La mesure de la température de demi-inhibition de la transition S_1 à S_2 a été réalisée par RPE, en utilisant la sonde qui représente le signal multilignes dans l'état S_2 . Des échantillons de PSII ont été adaptés à l'obscurité, puis flashés une fois à différentes températures, variant de 100 K à 200 K. La taille du signal multilignes varie en fonction de la température du flash. Le signal multilignes est d'autant plus petit que la transition est inhibée.

Les spectres RPE sont enregistrés avant le flash, sur l'échantillon adapté à l'obscurité pour connaître la ligne de base, puis après le flash pour mesurer le signal multilignes qui est apparu. Pour estimer la quantité de signal multilignes qui reflète la proportion de centres présents dans l'état S_2 après le flash, nous avons soustrait au spectre mesuré après éclaircissement la ligne de base enregistrée à l'obscurité. La taille du signal multilignes est estimée en mesurant la hauteur des plus grandes raies du signal. La référence est le signal multilignes mesuré après un flash à 200 K qui représente 100% de centres dans l'état S_2 . Le pourcentage de centres dans l'état S_2 après un flash à basse température est représenté par le pourcentage de la taille du signal multilignes par rapport à la référence.

La Figure 109 représente le pourcentage de signal multilignes en fonction de la température du flash. Les données sont d'abord représentées séparément pour chacun des échantillons, puis les courbes obtenues suite à une simulation sigmoïdale sont toutes figurées sur le même graphe pour faciliter la comparaison.

On observe que les courbes des échantillons Ca/Cl, Ca/Br et Sr/Cl sont superposées. La température de demi-inhibition, à laquelle le signal multilignes a une taille égale à 50% de sa taille maximale, est de 142 K. L'échantillon Sr/Br présente une courbe d'allure légèrement différente. La transition S_1 à S_2 n'est pas inhibée jusqu'à une température de 165 K, puis la taille du signal multilignes décline rapidement jusqu'à atteindre son niveau minimal (25%) dès la température de 130 K. Bien que l'allure soit différente, la température de demi-inhibition est très similaire à celle des autres échantillons et égale à 143 K.

La substitution des cofacteurs Ca^{2+} et Cl^- n'entraîne donc pas de modification sur la dépendance en température de la transition S_1 à S_2 , en accord avec l'absence de libération de protons au cours de la transition à pH 6,5. Il faudrait réitérer cette expérience à pH 7,5 car à cette valeur de pH, la quantité de protons relâchés dans le milieu augmente (Figure 28).

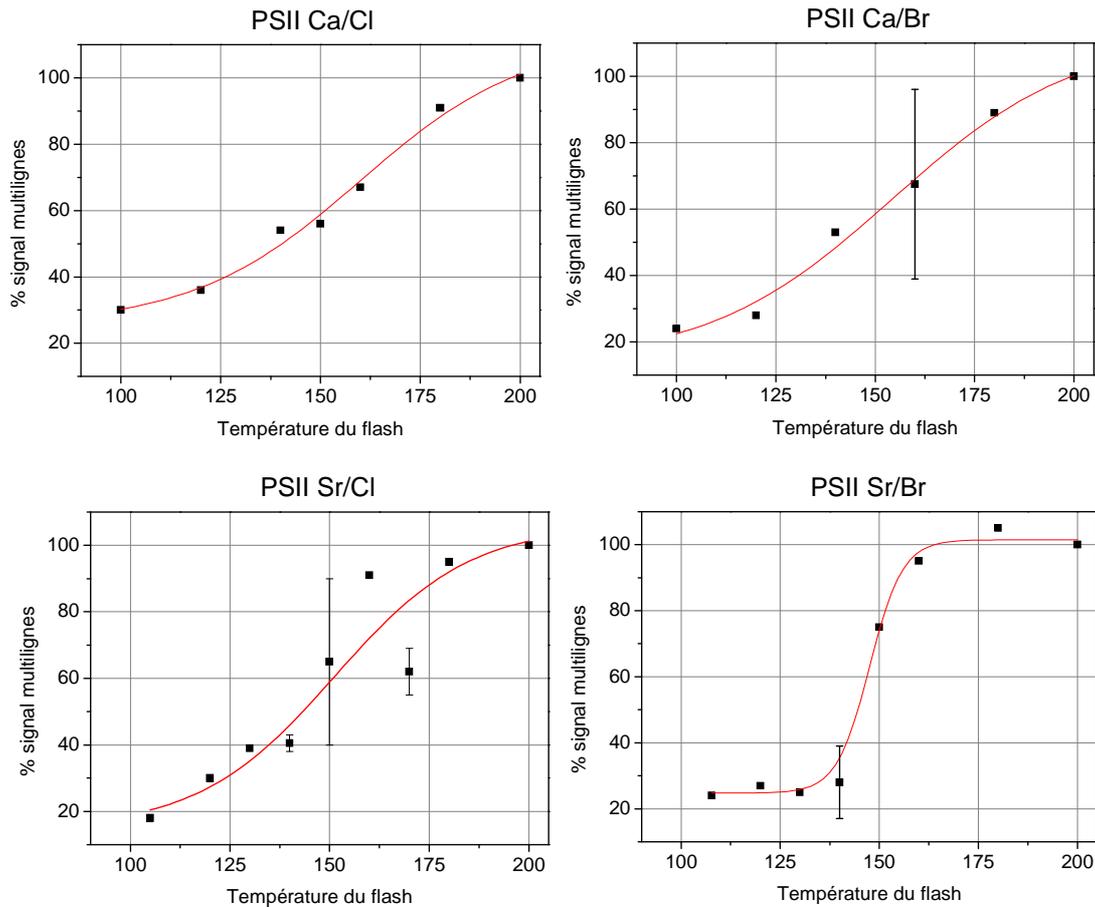


Figure 109 : Courbes de dépendance en température de la transition S_1 à S_2 pour les quatre types d'échantillons de thylakoïdes. Certains points ont été mesurés plusieurs fois. Ils sont indiqués par une barre correspondant à l'écart type. Le pourcentage de signal multilignes a été estimé par rapport à un échantillon qui a reçu un flash à température ambiante. L'amplitude du signal est mesurée manuellement sur un certain nombre de raies déterminées et indiquées Figure 30 par une étoile rouge.

d) Blocage $S_0 \rightarrow S_1$

Nous étudions maintenant la transition S_0 à S_1 , dont la mesure est légèrement plus compliquée que les autres du fait que ces deux états ne donnent pas de signal caractéristique facilement quantifiable, ni en thermoluminescence, ni en RPE. La méthode la plus simple consiste à mesurer par RPE le signal multilignes en éclairant l'échantillon après la formation de l'état S_1 par un flash supplémentaire pour former l'état S_2 qui lui est quantifiable. Les échantillons de PSII préflashés sont donc adaptés à l'obscurité, puis reçoivent 3 flashes à température ambiante pour amener la majorité des centres dans l'état S_0 . Ensuite l'échantillon est flashé à une température variable comprise entre 295 K et 100 K, puis flashé à température ambiante. Suite au flash à basse température, une certaine fraction des centres passent dans

l'état S_1 , puis après le flash à température ambiante, dans l'état S_2 . On mesure la taille du signal multilignes de ces centres présents dans l'état S_2 , qui reflète la fraction des centres dans l'état S_1 avant le dernier flash. Comme pour la transition S_1 à S_2 , on représente le pourcentage de signal multilignes par rapport à la référence qui est la taille du signal multilignes d'un échantillon de PSII qui a reçu 5 flashes à température ambiante (Figure 110).

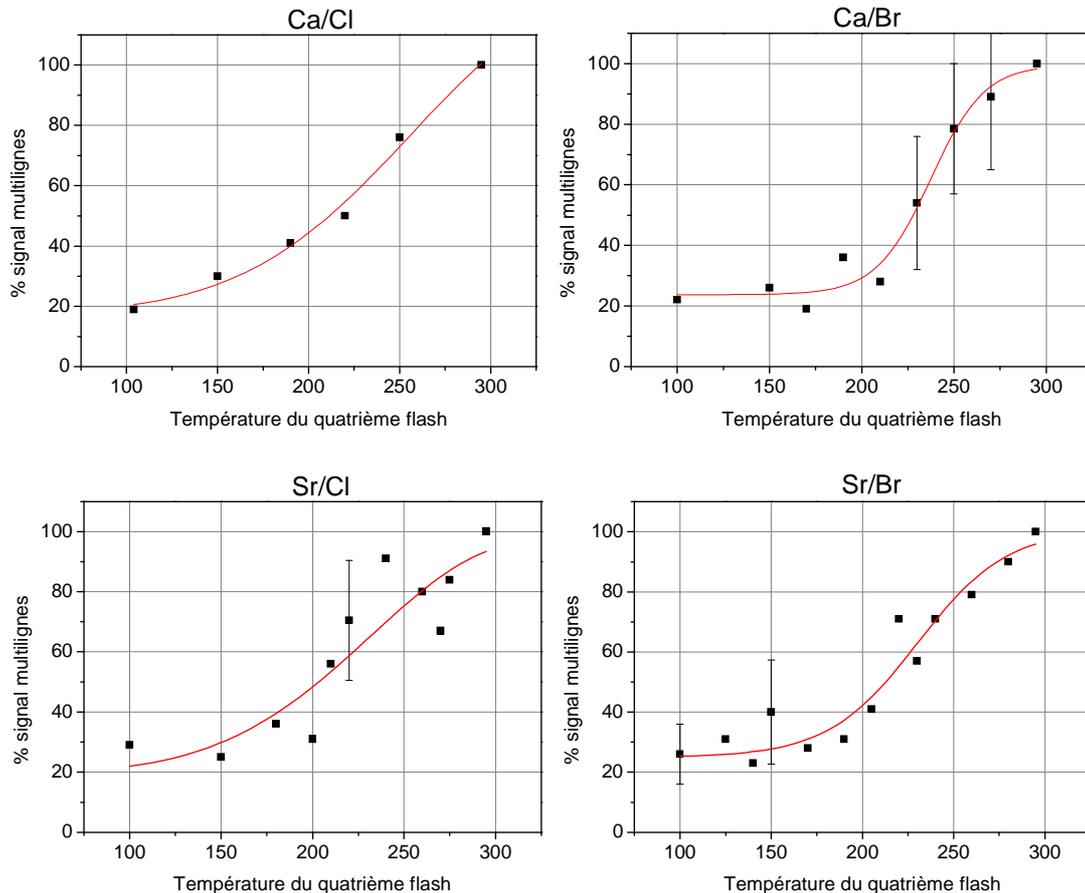


Figure 110 : Courbes de dépendance en température de la transition S_0 à S_1 pour les quatre types d'échantillons de thylakoides. Le pourcentage de signal multilignes a été estimé par rapport à un échantillon qui a reçu 4 flashes à température ambiante. L'amplitude du signal est mesurée manuellement sur un certain nombre de raies déterminées et indiquées Figure 30 par une étoile rouge.

On observe que les courbes des échantillons Ca/Cl, Ca/Br et Sr/Cl sont superposées dans la limite de la précision expérimentale, avec un temps de demi-inhibition d'environ 205 K. Le pourcentage de signal multilignes diminue immédiatement dès que le flash est donné à une température inférieure à 295 K.

La courbe de l'échantillon Sr/Br a une allure légèrement différente. Elle semble atteindre un palier à basse température dès 170 K, où l'inhibition est de 77 % environ. La

température de demi-inhibition est légèrement plus élevée que dans les autres échantillons et égale à 230 K.

e) Mise en évidence d'un « split » signal par RPE dans le PSII Sr/Br

Dans les expériences précédentes, nous avons pu étudier la température d'inhibition de chacune des transitions $S_i \rightarrow S_{i+1}$ sous éclairage par flashes. Nous avons ensuite cherché à piéger un état intermédiaire sous éclairage continu à basse température. Nous avons pu mettre en évidence par RPE un signal caractéristique des échantillons PSII Sr/Br. Ce signal apparaît suite à l'éclairage à la température de -10°C d'un échantillon de PSII préalablement adapté à l'obscurité. Il est absent des échantillons PSII Sr/Cl, comme montré sur la Figure 111.

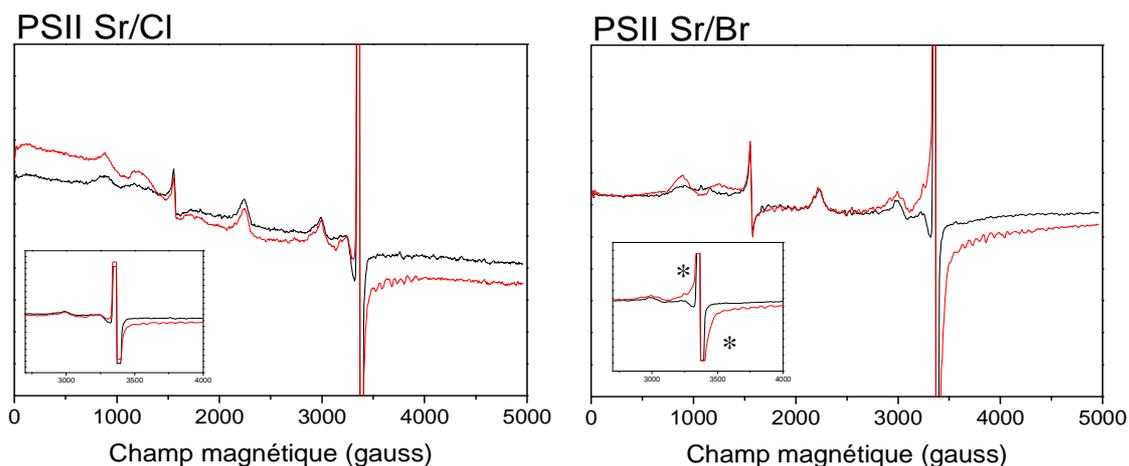


Figure 111 : Observation d'un “split signal” d'un échantillon de PSII Sr/Br adapté à l'obscurité, après éclairage à -10°C (indiqué par des étoiles). En noir le signal avant éclairage et en rouge après éclairage. L'échantillon Sr/Cl est montré pour comparaison. Paramètres : température : $8,5\text{ K}$; amplitude de modulation : 25 G ; puissance micro-ondes : 20 mW ; fréquence micro-ondes : $9,4\text{ GHz}$; fréquence de modulation : 100 kHz .

Le split signal est obtenu après éclairage à -10°C . Ce signal peut être attribué soit à des centres qui sont inhibés à cause de la basse température mais cela semble être improbable car nous sommes très éloignés de la température de demi-inhibition de la transition S_1 à S_2 , soit à un ralentissement d'une des transitions du cycle des états S en présence de strontium et de bromure. En effet, les mesures de changements d'absorption à température ambiante ont montré des modifications des phases μs quand les cofacteurs sont substitués. Ainsi le

piégeage du split signal pourrait être dû à un ralentissement des phases de relaxation lors de la transition $S_2\text{Tyr}_Z \rightarrow S_3\text{Tyr}_Z$ associées à l'oxydation de la tyrosine Z.

4) Discussion

Les valeurs des températures de demi-inhibition que nous avons pu déterminer sont rappelées dans le Tableau 16. On rappelle également les valeurs trouvées dans la littérature, obtenues sur du PSII de plante¹⁹⁶.

	$S_0 \rightarrow S_1$	$S_1 \rightarrow S_2$	$S_2 \rightarrow S_3$	$S_3 \rightarrow S_0$
Ca/Cl	205	142	237	241,5
Ca/Br				
Sr/Cl			230	214
Sr/Br	235			
Plante Ca/Cl ¹⁹⁶	220-225	135-140	230	235

Tableau 16 : Valeurs de température de demi-inhibition déterminées pour chacune des transitions par thermoluminescence et par RPE.

Nous trouvons donc des valeurs en accord avec celles de la littérature dans les plantes pour l'échantillon Ca/Cl, ce qui nous indique que la thermophilie n'a pas d'effet sur les températures de blocage. La température de blocage est donc un phénomène intrinsèque au mécanisme et pas un phénomène lié aux protéines à caractère thermophile.

Les substitutions $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ et Cl^-/Br^- aboutissent à des résultats différents à chaque transition entre états S_n . On peut noter que l'échange Cl^-/Br^- en présence de Ca^{2+} n'entraîne pas de modification sur le blocage des transitions S_n . Par contre, pour les transitions S_0 à S_1 , S_2 à S_3 et S_3 à S_0 , des différences sont bien observées suite à l'échange Cl^-/Br^- en présence de Sr^{2+} . Pour la transition S_0 à S_1 , seul l'échantillon doublement substitué Sr/Br a une température de demi-inhibition plus basse. Pour la transition S_2 à S_3 , la température de blocage est inférieure de 23 K pour les échantillons Sr/Cl et Sr/Br. Enfin, pour la transition S_3 à S_0 , les échantillons contenant du Sr^{2+} sont bloqués à une température légèrement plus basse que les échantillons au Ca^{2+} .

La transition $S_1 \rightarrow S_2$ est celle qui a lieu à la température la plus basse. Ce fait a été mis en relation auparavant avec le schéma de libération de protons qui suit la stœchiométrie 1-0-1-2 pour les transitions de S_0 à S_3 : c'est la seule transition durant laquelle aucun proton n'est relâché dans le milieu à pH 6,5. Aux autres transitions, la libération des protons étant

probablement couplée à un changement de conformation important ne peut pas avoir lieu à des températures inférieures à 200 K, aussi bien dans l'échantillon contrôle que dans les échantillons substitués. Si cette hypothèse est vraie, l'échange biosynthétique des cofacteurs n'induirait pas de modification au niveau de la stœchiométrie de libération de H^+ , au moins durant la transition S_1 à S_2 . Il serait toujours vrai qu'aucun proton n'est relâché durant cette transition.

Par contre, les autres transitions qui impliquent bien des départs de protons, sont sujettes à des différences de température d'inhibition après substitution du ou des cofacteurs. Une variation de pH pourrait donc modifier ces températures dans le cas où elles sont liées au transfert de protons. Nous avons donc réalisé des mesures en fonction du pH pour les transitions S_2 à S_3 et S_3 à S_0 . Nous n'avons pas pu réaliser cette étude pour les deux autres transitions car elle très longue et très consommatrice en matériel, devant être réalisée par RPE.

Cependant, ces mesures ont déjà été réalisées par IRTF sur du PSII isolé de la souche sauvage de *T. elongatus*⁷⁷. Il a été montré dans cette étude que la transition $S_1 \rightarrow S_2$ est indépendante du pH dans une région de pH allant de 3,5 à 9,5 tandis que les probabilités de transition de $S_2 \rightarrow S_3$, $S_3 \rightarrow S_0$ et $S_0 \rightarrow S_1$ diminuent à pH acide. Une étude plus ancienne réalisée par RPE¹⁹⁸ avait montré que la transition $S_1 \rightarrow S_2$ est indépendante du pH entre 4,1 et 8,4. Les autres transitions seraient bloquées à bas pH. Dans la région acide, les pK d'inhibition des transitions $S_2 \rightarrow S_3$, $S_3 \rightarrow S_0$ et $S_0 \rightarrow S_1$ sont respectivement de 4,0, 4,5 et 4,7. Dans la région basique, la transition $S_3 \rightarrow S_0$ est clairement bloquée avec un pK aux environ de 8,0. L'inhibition dans le domaine basique a été expliquée par la modification du potentiel redox de Tyr_Z^*/Tyr_Z . A pH élevée, le potentiel d'oxydation de Tyr_Z^*/Tyr_Z devient plus bas que celui de S_2/S_1 et S_3/S_2 . L'inhibition à bas pH a été expliquée par une protonation de groupements impliqués dans la voie de transfert de H^+ ¹⁹⁸.

Nous montrons que la température de blocage de la transition $S_3 \rightarrow S_0$ n'est pas dépendante du pH, aussi bien pour l'échantillon contrôle Ca/Cl que pour l'échantillon doublement substitué Sr/Br, mais cela serait dû au fait que nous n'avons pas testé une gamme de pH assez large. Le pK de l'inhibition à pH acide de la transition S_3 à S_0 a été estimé à 4,2. Or le pH le plus acide auquel nous avons mesuré l'inhibition de la transition est de 5,5. Au vu de cette valeur ainsi que de l'incertitude de notre mesure, nous pouvons penser que nous n'avons pas détecté d'inhibition à pH 5,5 car ce pH est encore trop élevé pour affecter l'efficacité de la transition considérée. Nous avons observé qu'à pH 5,5, l'échantillon Ca/Cl

était moins bloqué qu'à des valeurs de pH plus élevées, mettant en évidence la protonation d'un groupe qui empêche le blocage de la transition. Cet effet n'existe pas dans l'échantillon Sr/Br : dans ce cas, le pK du groupe serait plus élevé.

Pour la transition S_2 à S_3 , nous avons également observé un effet du pH sur le pourcentage de centres non bloqués à basse température. Ce pourcentage est plus élevé à haut pH pour les échantillons Ca/Cl et Sr/Br, mettant en évidence l'existence d'un groupe dont la protonation à bas pH serait à l'origine du blocage. Son pK serait inférieur dans l'échantillon Sr/Br par rapport à Ca/Cl.

Pour la transition $S_3 \rightarrow S_0$, la présence de Sr^{2+} à la place de Ca^{2+} entraîne une petite baisse de la température d'inhibition. Dans le modèle proposé par Suzuki et al.¹⁷, une des molécules d'eau substrat est liée au Ca^{2+} et se déprotonne au cours de la transition. Lorsque le Sr^{2+} se trouve à la place du Ca^{2+} , la déprotonation de H_2O serait donc facilitée. Cet effet est en concordance avec les valeurs d'électronégativité des deux cations. Le strontium est moins électronégatif que le calcium, ce qui peut expliquer la plus grande facilité qu'à la molécule d'eau à relâcher son proton.

On peut mettre en corrélation les effets observés ici des substitutions des cofacteurs sur la température d'inhibition des transitions $S_i \rightarrow S_{i+1}$ et les valeurs des énergies d'activation pour expliquer la transition $S_3 \rightarrow S_0$. Pour résumer grossièrement, on observe une baisse des énergies d'activation après substitution des cofacteurs, accompagnée d'une baisse de la température d'inhibition des transitions $S_i \rightarrow S_{i+1}$. Si le changement de conformation est moins important durant la transition $S_3 \rightarrow S_0$, l'énergie demandée sera moins grande donc le système sera d'autant plus apte à le réaliser à basse température.

II) Etude de la fixation des molécules d'eau substrat

1) Introduction

Les techniques d'EXAFS combinées à la spectroscopie RPE ont permis de grandes avancées sur la connaissance des structures géométrique et électronique du cluster de Mn_4Ca . Cependant, aucune information précise n'est à ce jour disponible concernant les sites de fixation et les modes de fixation des deux molécules d'eau substrat, dans chacun des états S_n . La liaison des molécules d'eau au complexe d'oxydation a été étudiée par différentes techniques telle que la RPE^{199, 200, 201} et l'IRTF^{202, 203}. Ces expériences révèlent des informations sur le mode de fixation des molécules d'eau sur le cluster de Mn_4Ca . Cependant, un problème commun à toutes ces techniques est qu'elles ne distinguent pas les molécules d'eau substrat de celles présentes dans le milieu. Ce problème a été résolu grâce à l'utilisation de la spectrométrie de masse. Elle permet de déterminer les vitesses d'échange des molécules d'eau substrat. Par un préflash des échantillons pour les amener dans l'état d'oxydation désiré dans de l'eau non marquée, suivi immédiatement d'un enrichissement avec de l'eau marquée $H_2^{18}O$ à un temps variable avant une séquence de flashes qui mène à l'oxydation de l'eau et au dégagement d'oxygène. La spectrométrie de masse permet la détection en temps réel des différentes espèces contenant de l'oxygène ($^{16}O^{16}O$, $^{16}O^{18}O$ et $^{18}O^{18}O$) en fonction du temps de mélange de $H_2^{18}O$ avec l'échantillon de thylakoides. Grâce au suivi du produit de la réaction (O_2), les vitesses d'échange obtenues reflètent directement les propriétés d'échange et de liaison des deux molécules d'eau substrat.

L'application de la technique en temps résolu a fourni diverses informations sur la fixation des molécules d'eau en fonction des états S_n . Les premières mesures étaient limitées par la résolution, de 30-60 s^{204,205,206}. Il a cependant pu être conclu que dans le domaine de temps observé, il n'y a pas de molécule d'eau liée non échangeable en dessous de l'état S_4 . Une grande amélioration a été apportée à la résolution de la technique par Messinger et al. (<30 ms)²⁰⁹, grâce à la construction d'une cuve de mesure qui permet un mélange rapide de l' $H_2^{18}O$ ajoutée. Il est apparu qu'il y a deux sites de fixation du substrat ayant des propriétés différentes, une des molécules d'eau s'échangeant lentement ($t_{1/2} \approx 500$ ms à 10°C) dans l'état S_3 , et l'autre s'échangeant plus rapidement ($t_{1/2} < 25$ ms à 10°C). L'échange lent est couplé à une énergie d'activation d'environ 75 kJ/mol et a été discuté en termes d'un ligand terminal manganèse oxo, tandis que la molécule d'eau s'échangeant rapidement représenterait une

molécule d'eau fixée dans l'environnement du cluster de Mn_4Ca . Plusieurs améliorations ultérieures apportées à la technique^{210,66,211} ont permis de mesurer les cinétiques d'échange dans tous les états S_n pour le site d'échange lent, à savoir S_0 ($k_1 \approx 10 \text{ s}^{-1}$, soit $t_{1/2} \approx 70 \text{ ms}$), S_1 ($k_1 \approx 0,02 \text{ s}^{-1}$, soit $t_{1/2} \approx 35 \text{ s}$), S_2 ($k_1 \approx 2,0 \text{ s}^{-1}$, soit $t_{1/2} \approx 350 \text{ ms}$) et S_3 ($k_1 \approx 2,0 \text{ s}^{-1}$, soit $t_{1/2} \approx 350 \text{ ms}$) et dans S_2 ($k_2 \approx 120 \text{ s}^{-1}$, soit $t_{1/2} \approx 6 \text{ ms}$) et S_3 ($k_2 \approx 40 \text{ s}^{-1}$, soit $t_{1/2} \approx 17 \text{ ms}$) pour le site d'échange rapide.

La vitesse d'échange lent est ralentie d'un facteur ~ 500 durant la transition $S_0 \rightarrow S_1$. Par comparaison avec d'autres complexes de métaux hydratés^{207,208}, la vitesse d'échange dans l'état S_0 correspondrait plutôt à une molécule d'eau liée à un Mn^{III} . Cette étape pourrait correspondre à l'oxydation du site de fixation du substrat, ou à la déprotonation du substrat suite à un changement de pK causé par l'oxydation du cluster de Mn_4Ca . Au contraire, la deuxième étape $S_1 \rightarrow S_2$ montre une augmentation par un facteur ~ 100 . Il apparaît très clairement que le site auquel est fixée la molécule d'eau qui s'échange lentement ne peut pas être l'ion Mn qui subit une oxydation durant cette transition. L'accélération pourrait être due à une déprotonation d'un ligand du Mn , ou à l'échange ou la fixation d'un ligand au Mn . Le dernier cas paraît le plus probable pour respecter le schéma de libération des protons. Durant la transition $S_2 \rightarrow S_3$, il n'y a pas de changement supplémentaire au niveau de ce site de fixation car la vitesse d'échange est inchangée. La nature du site de fixation de l'eau doit être identique dans les états S_2 et S_3 , pour la molécule d'eau qui s'échange lentement.

Pour le site d'échange rapide, ses vitesses ne sont résolues que dans les états S_2 et S_3 ²¹¹. Comme l'échange dans l'état S_1 est trop rapide pour être mesurable, ceci nous révèle qu'il y a un ralentissement significatif de la transition $S_1 \rightarrow S_2$ et un autre petit ralentissement durant la transition $S_2 \rightarrow S_3$. Le ralentissement durant de $S_1 \rightarrow S_2$ peut être associé à l'oxydation du Mn au site de fixation du substrat. Cependant, le ralentissement de $S_2 \rightarrow S_3$ est trop faible par rapport à ce qu'on attend en cas de changement d'état d'oxydation du Mn . Les changements durant la transition $S_2 \rightarrow S_3$ peuvent résulter de l'oxydation d'un site voisin.

Ceci a mené à la conclusion que l'eau se fixe en S_0 sur le site lent et au moins en S_2 sur le site rapide et aux remarques suivantes :

- Les deux sites ne sont pas équivalents au cours du cycle des états S_n en termes de vitesse d'échange, d'énergie d'activation et d'entropie.
- La molécule d'eau du site d'échange rapide est séquentiellement de plus en plus liée après les transitions $S_1 \rightarrow S_2 \rightarrow S_3$.

- La molécule d'eau du site d'échange lent est liée moins fortement après la transition $S_1 \rightarrow S_2$, mais son affinité reste inchangée durant la transition $S_2 \rightarrow S_3$.
- Le site d'échange lent fixe l'eau avec une affinité similaire dans les états S_0 et S_3 .

Concernant le rôle du cofacteur Ca^{2+} , des expériences de spectrométrie de masse ont montré que suite à l'échange biochimique du Ca^{2+} par Sr^{2+} , la phase rapide est très peu affectée par la reconstitution au Sr^{2+} dans l'état S_3 . Dans les états S_1 et S_2 , le $t_{1/2}$ de la phase d'échange rapide est trop petit pour le déterminer. La vitesse de la phase d'échange lente est augmentée d'un facteur d'environ 3~4 dans les états S_1 , S_2 et S_3 . Il en a été conclu que la molécule d'eau qui s'échange lentement⁶² se lie au site de fixation du Ca^{2+} .

2) Matériel et méthode

a) Principe

Ce travail a été réalisé en collaboration avec K. Beckmann et J. Messinger (Max Planck Institut) qui a réalisé le montage dont le principe est résumé Figure 112.

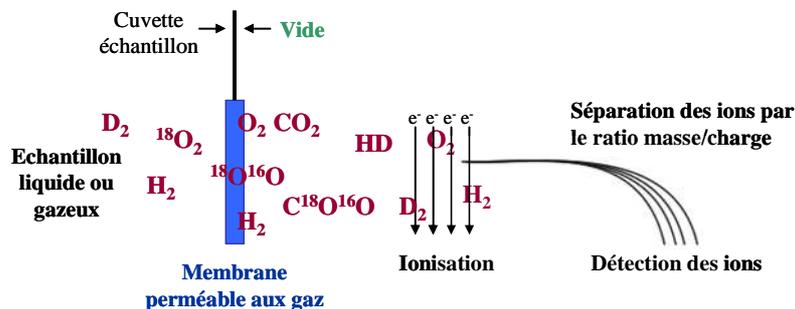


Figure 112 : Schéma de principe du montage de spectrométrie de masse appliquée à l'étude des vitesses d'échange des molécules d'eau substrat. Les gaz issus de la photosynthèse traversent la membrane et pénètrent dans le vide. Ils sont ensuite ionisés par impact électronique. Les ions produits sont ensuite analysés par un détecteur à cages de Faraday.

Lors des mesures, l'état S_3 est induit par 2 flashes puis de l'eau $H_2^{18}O$ est injectée. A des temps variables après cette injection, un troisième flash est donné pour induire la transition $S_3 \rightarrow S_4 \rightarrow S_0 + O_2$ et le pourcentage de $^{16}O^{18}O$ et $^{18}O_2$ dans le dioxygène émis est suivi en fonction du temps séparant l'injection de $H_2^{18}O$ et le troisième flash. Ce protocole est schématisé Figure 113.

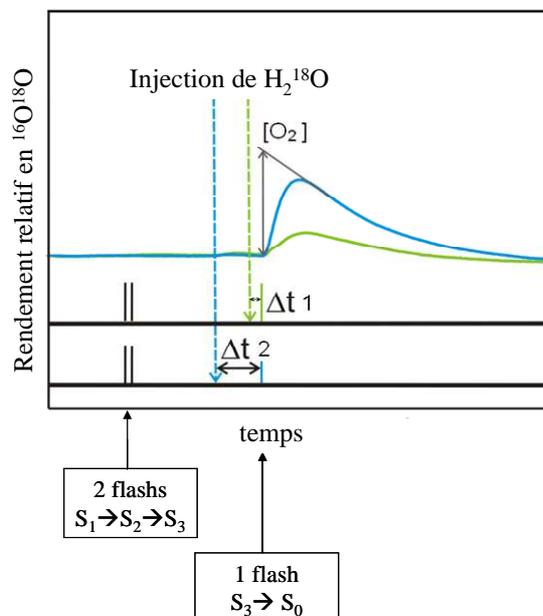


Figure 113 : Protocole utilisé pour la mesure des vitesses d'échange. En vert, un premier échantillon et en bleu un deuxième échantillon. Le temps Δt entre l'injection de H_2^{18}O et le troisième flash varie en fonction de l'échantillon, laissant plus ou moins de temps aux molécules d'eau pour s'échanger.

Nous avons ainsi pu déterminer les cinétiques d'échange des molécules d'eau dans l'état S_3 pour les quatre types d'échantillons : Ca/Cl, Ca/Br, Sr/Cl, Sr/Br, et en déduire des informations sur les affinités de liaison et sur la nature des sites de fixation des molécules substrat.

b) Matériel

La pièce centrale de ce type d'appareil est une membrane semi-perméable, qui sépare la cuvette porte-échantillon du vide, et permet aux gaz mais non aux liquides de pénétrer à l'intérieur du spectromètre de masse^{209,210}.

Le spectromètre de masse à ratio isotopique (Thermo Finnigan, Delta^{plus}XP) est équipé d'une source d'ionisation électronique et de sept cages de Faraday qui détectent simultanément $^{16}\text{O}_2$ ($m/z = 32$), $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ ($m/z = 34$), $^{18}\text{O}_2$ ($m/z = 36$) et $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$ ($m/z = 44$), $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ ($m/z = 46$), $^{12}\text{C}^{18}\text{O}_2$ ($m/z = 48$). A $m/z = 36$, deux espèces différentes sont détectées, $^{18}\text{O}_2$ et un isotope de l'Argon, ^{36}Ar . A $m/z = 40$ le pic Argon principal est détecté simultanément.

Les mesures peuvent être réalisées indépendamment sur PSII ou thylakoides, nous avons choisi les thylakoides qui sont plus faciles à purifier.

Les échantillons de thylakoides sont dilués à une concentration de $0,2 \text{ mg Chl.mL}^{-1}$ (pour que le flash soit saturant) dans du TP1. Ils sont préflashés avec un flash saturant au Xénon pour synchroniser les centres en S_1 , dans des tubes en verre (3 mm de diamètre), puis incubés 45 minutes à température ambiante. L'échantillon de thylakoides ainsi préparé est ensuite injecté dans la cuvette porte-échantillon du spectromètre de masse. La température au niveau de la cuvette est maintenue constante à 10°C . La seringue utilisée pour injecter l' H_2^{18}O est remplie d' H_2^{18}O (enrichie à 98%) à laquelle on a préalablement ajouté un mélange d'enzyme (voir plus bas). Pour avoir une ligne de base stable, l'échantillon est dégazé dans la cuvette pendant environ 20 minutes avant de faire l'injection et de lancer la mesure.

Pour réduire le bruit de fond dû à l' $^{18}\text{O}_2$ présent naturellement dans l'échantillon ($\sim 0.2\%$ dans l'eau), de petits aliquots d'un mélange de glucose/glucose oxydase/catalase sont ajoutés. La glucose oxydase ($181,000 \text{ unités/g solide}$, sigma aldrich) catalyse la réaction de O_2 et du $\beta\text{-D-(+)-Glucose}$ (sigma aldrich) en H_2O_2 , tandis que l' H_2O_2 oxydoréductase (ou catalase, $1,927 \text{ unités/mg de solide}$, sigma aldrich) oxyde deux molécules de peroxyde d'hydrogène en deux molécules d'eau et une molécule de dioxygène. On convertit ainsi le dioxygène en eau. La quantité de glucose et les concentrations des enzymes ont été optimisées pour enlever pratiquement totalement le dioxygène dissout de l' H_2^{18}O avant l'injection, sans avoir d'effet sur la quantité d' O_2 émise par le PSII.

Après dégazage, les échantillons sont illuminés par deux flashes saturants au xénon (durée de $5\mu\text{s}$, flashes espacés de 500 ms) pour que les centres PSII soient dans l'état S_3 . A 10°C , les réactions inverses de S_3 à S_2 et S_1 sont lentes. De cette manière, les centres restent dans l'état S_3 pendant les 15 secondes séparant le deuxième flash du troisième, qui induit la formation du dioxygène. L'enrichissement final en ^{18}O dans l'eau dans la cellule du spectromètre est de 21,5%. Après injection de l' H_2^{18}O , l' O_2 émis suite au troisième flash est détecté et enregistré pendant 3 minutes. Puis, une série de 8 flashes au xénon est donnée. Le signal de dioxygène ainsi généré est utilisé pour normaliser le rendement en O_2 induit par le troisième flash. En effet, l'amplitude du signal peut être perturbée par des changements de perméabilité de la membrane et surtout par des variations de concentrations durant la série de mesures. L'intégration du signal obtenu sur ces 8 flashes est une mesure de la quantité de centres réactionnels dans l'échantillon.

La vitesse d'échange des molécules d'eau peut être mesurée dans tous les états S_n , mais nous n'avons étudié que S_3 car la mesure des autres états S_n est beaucoup plus compliquée. Il faut flasher plusieurs fois l'échantillon après l'injection d' H_2^{18}O pour amener les centres PSII jusqu'à la transition S_3 à S_0 durant laquelle l'oxygène est émis. Cela

nécessite l'utilisation de plusieurs laser Nd:Yag pour avoir des flashes suffisamment rapprochés et éviter des échanges parasites durant ces flashes supplémentaires.

c) Analyse des résultats

Le rendement en O₂ par flash est déterminé en extrapolant au temps du flash (Figure 113).

L'amplitude du signal obtenu (Y_M) représente essentiellement la production de dioxygène dans la cellule au moment du troisième flash. Trois corrections doivent cependant être apportées : 1) Il faut soustraire au signal un artefact hautement reproductible dû à l'injection de l'H₂¹⁸O (Y_{Inj}). A m/z = 34, cet artefact est dû à une petite fraction de ³⁴O₂ présent dans l'air qui est dissous dans H₂¹⁸O, tandis qu'à m/z = 36 on observe un isotope de l'Argon, ³⁶Ar. Y_{Inj} peut être déterminé par une série de mesures sur des injections seules sans flash puis soustrait à Y_M. 2) Pour permettre la comparaison entre les différents échantillons, les valeurs Y_C ont été normalisées au rendement en dioxygène obtenu aux temps longs, Δt, quand la réaction d'échange est terminée (cf. paragraphe précédent). 3) Pour les temps courts, une correction supplémentaire est apportée car l'injection de H₂¹⁸O réduit à la fois la concentration de l'échantillon (ΔChl), et augmente la fraction de H₂¹⁸O dans la cellule (k_{Inj} = 97 s⁻¹ sur ce montage^{16,211}).

$$Y_c(t) = \frac{Y_M - Y_{Inj}}{Y_{8\ flashs}} \times \frac{1}{[(1 - \exp(-k_{Inj}t))(1 + \Delta Chl \exp(-k_{Inj}t))]}$$

Les rendements en ¹⁶O¹⁸O et ¹⁸O¹⁸O corrigés obtenus sont représentés en fonction du temps entre l'injection et le troisième flash (c'est-à-dire le temps d'échange).

Les données à m/z = 34 (correspondant aux molécules ¹⁶O¹⁸O) montrent un comportement biphasique, avec deux phases distinctes : une phase rapide et une phase lente, correspondant à deux sites de fixation aux propriétés d'échange différentes. Avec un enrichissement en ¹⁸O de 21,5%, la distribution isotopique est 78,5 : 21,5 : 0 pour m/z 32 : 34 : 36 aux temps courts. Aux temps plus longs quand la deuxième molécule d'eau a fini de s'échanger, la distribution à l'équilibre devient 61,6 : 33,8 : 4,6 pour m/z 32 : 34 : 36, calculée d'après l'équation (ε = enrichissement en ¹⁸O) :

$$^{16}\text{O}_2 : ^{16}\text{O}^{18}\text{O} : ^{18}\text{O}_2 = (1 - \varepsilon)^2 : 2(1 - \varepsilon)\varepsilon : \varepsilon^2$$

Ainsi, les contributions relatives des deux phases ne sont pas égales : la phase rapide représente environ 64% (21,5/33,8) de l'amplitude totale et la phase lente environ 36%.

Les cinétiques d'échange pour les données à $m/z = 34$ peuvent être simulées par la somme de deux fonctions exponentiels de premier ordre :

$$^{34}\text{Y}_C(t) = 0,64[1 - \exp(-k_f t)] + 0,36[1 - \exp(-k_s t)]$$

A $m/z=36$, les deux molécules d'eau substrat doivent être échangées contre de l'eau marquée. La vitesse d'échange est donc limitée par la vitesse de l'échange lent. Les données montrent un comportement monophasique et sont simulées au mieux avec une fonction exponentielle de premier ordre :

$$^{36}\text{Y}_C = [1 - \exp(-k_s t)]$$

3) Résultats

Les vitesses d'échange des molécules d'eau substrat dans l'état S_3 du PSII ont été mesurées dans nos échantillons, pour étudier les effets de la substitution des cofacteurs Ca^{2+} et Cl^- par Sr^{2+} et Br^- . Malheureusement, pour une raison que nous expliquerons par la suite, seuls les résultats concernant l'échange $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ sont exploitables pour l'instant.

Nous commencerons donc par observer les données concernant les échantillons de thylakoides Ca/Cl et Sr/Cl . La Figure 114 montre les rendements en O_2 normalisés en fonction du temps entre l'injection de H_2^{18}O et le troisième flash. Seuls les résultats concernant le ratio $m/z = 34$ correspondant à la formation du dioxygène $^{16}\text{O}^{18}$ sont présentés. Lors des expériences, la solution de H_2^{18}O a été malencontreusement maintenue sous Argon, qui contient naturellement une petite fraction de l'isotope ^{36}Ar . Celui-ci a augmenté le bruit de fond présent à $m/z = 36$ à un point tel que le signal provenant du dioxygène $^{36}\text{O}_2$ représente un très petit pourcentage par rapport au bruit de fond. Une possibilité pour corriger cette erreur est d'utiliser le signal Argon enregistré à $m/z = 40$, mais les résultats resteraient peu fiables.

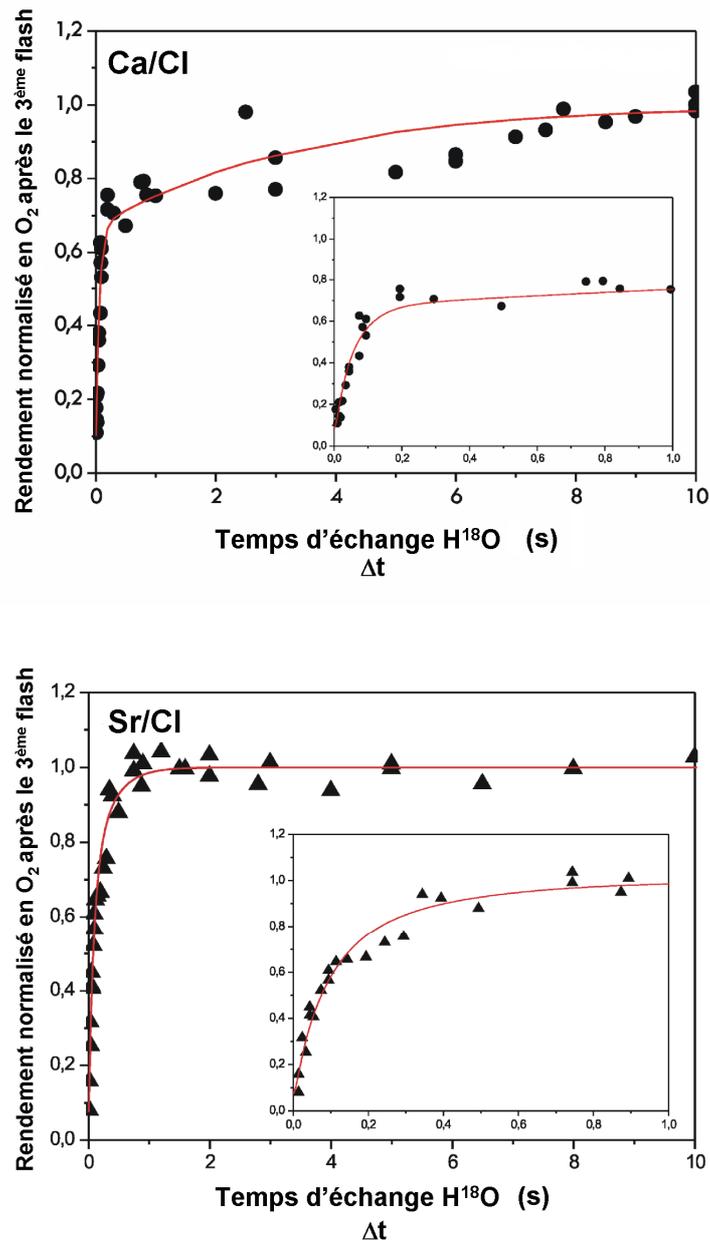


Figure 114 : Mesures de spectrométrie de masse de l'échange des molécules d'eau substrat $\text{H}_2^{16}\text{O}/\text{H}_2^{18}\text{O}$ dans des thylakoides Ca/Cl et Sr/Cl. Les rendements en oxygène corrigés correspondant à $m/z = 34$ ($^{16}\text{O}^{18}\text{O}$) sont représentés en fonction du temps d'échange. Les lignes représentent les courbes simulées selon les paramètres de vitesse présentés dans le Tableau 17. Les encarts présentent les phases rapides. Conditions expérimentales : 10°C , pH 6,5, enrichissement final en H_2^{18}O après injection 21,5%.

Pour les deux échantillons, on observe les cinétiques biphasiques caractéristiques, qui reflètent le comportement d'échange différent des deux molécules d'eau substrat. Une simulation de ces données nous donne les valeurs des constantes de vitesse d'échange pour chacune des phases (Tableau 17).

Cinétiques de vitesse d'échange des molécules d'eau (m/z = 34)				
Echantillon thylakoides	$^{34}k_{\text{fast}} (\text{s}^{-1})$	$t_{1/2 \text{ fast}}$	$^{34}k_{\text{slow}} (\text{s}^{-1})$	$t_{1/2 \text{ slow}}$
Ca/Cl	$16,5 \pm 0,7$	42 ms	$0,3 \pm 0,1$	2,3 s
Sr/Cl	$10,7 \pm 1,1$	65 ms	$3,2 \pm 0,5$	0,22 s

Tableau 17 : Constantes de vitesse et $t_{1/2}$ déduits de la simulation des données à m/z = 34, obtenues à 10°C sur des échantillons de thylakoides. La concentration en chlorophylle était de 0,2 mg/mL.

Les vitesses déduites de la simulation pour la phase rapide ($k_f = 16,5 \text{ s}^{-1}$) et pour la phase lente ($k_s = 0,2 \text{ s}^{-1}$) sont proches des valeurs déterminées sur du PSII isolé de *T. elongatus*²¹² ($k_f = 34,6 \text{ s}^{-1}$ et $k_s = 0,5 \text{ s}^{-1}$). Mais elles sont plus lentes que celles déterminées précédemment dans des thylakoides d'épinards et des fragments de membranes enrichies en PSII ($30\text{-}38 \text{ s}^{-1}$ pour la phase rapide et $1,8\text{-}2,5 \text{ s}^{-1}$ pour la phase lente^{209,210,62,212}).

La Figure 114 montre l'effet de l'échange biosynthétique $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ dans des thylakoides *T. elongatus*. La phase rapide est légèrement ralentie ($k_f = 10,7 \text{ s}^{-1}$) par rapport à l'échantillon de thylakoides Ca/Cl et la phase lente est accélérée très nettement d'un facteur 10 ($k_s = 3,2 \text{ s}^{-1}$). L'effet de la substitution $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ est identique à celle déterminée auparavant sur des membranes de PSII d'épinards dans lesquelles le Ca^{2+} a été substitué de manière biochimique par du Sr^{2+} ⁶². Cependant l'effet observé sur la phase lente est nettement plus important dans le cas de notre mesure sur les thylakoides Sr/Cl biosynthétiques. Dans notre cas, la phase lente est accélérée d'un facteur 10, alors que dans la littérature, la valeur du facteur rapportée pour du PSII Sr/Cl d'épinards est de 3-4⁶².

Les résultats concernant l'échange Cl/Br sont maintenant présentés pour information, mais les mesures vont être réalisées de nouveau prochainement, car un rapport signal/bruit trop important réside dans les résultats pour permettre de dire si une différence ou non existe entre les échantillons Cl⁻ et Br⁻. Cependant, au vu de ces résultats et des valeurs déterminées par la simulation à m/z = 34, nous pouvons émettre l'hypothèse provisoire que l'échange Cl/Br n'induit pas de différence sur les vitesses d'échange des molécules d'eau substrat.

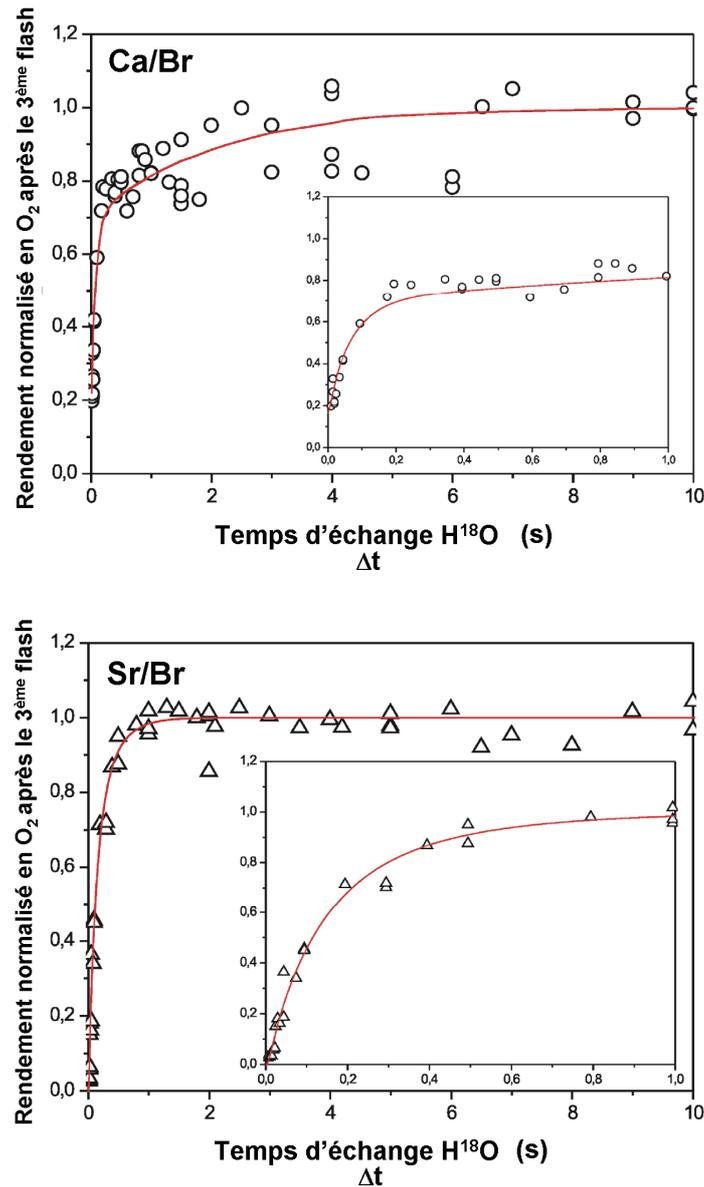


Figure 115 : Mesures de spectrométrie de masse de l'échange des molécules d'eau substrat $\text{H}_2^{16}\text{O}/\text{H}_2^{18}\text{O}$ dans des thylakoides Sr/Cl et Sr/Br. Les rendements en oxygène corrigés correspondant à $m/z = 34$ ($^{16}\text{O}^{18}\text{O}$) sont représentés en fonction du temps d'échange. Les lignes représentent les courbes simulées selon les paramètres de vitesse présentés dans le Tableau 17. Les encarts présentent les phases rapides. Conditions expérimentales : 10°C, pH 6,5, enrichissement final en H_2^{18}O après injection 21,5%.

4) Discussion

La comparaison des vitesses d'échanges mesurées dans les thylakoides avec les vitesses d'échange de molécules d'eau avec des complexes inorganiques peut fournir des informations d'intérêt pour expliquer le mécanisme de notre système. La vitesse d'échange d'un complexe dépend de plusieurs propriétés du métal : 1) la nature du métal ; 2) la charge

cationique ; 3) le champ du ligand. Ces paramètres sont également modulés dans un contexte biologique par : 1) les barrières d'activation qui sont couplées aux réseaux de protons ; 2) la modulation de la charge par l'environnement du site catalytique ; 3) l'échange avec le solvant et l'entrée dans la protéine. D'autres contraintes proviennent de la nature même du substrat du photosystème II : $\text{Mn-OH}_2 > \text{Mn-OH} > \text{Mn-}\mu\text{oxo-Mn}$ en termes de vitesses d'échange.

Les prédictions de vitesses d'échange sont donc des tâches extrêmement difficiles, d'autant plus que peu de complexe modèles sont à notre disposition²¹³. D'une manière générale, on peut dire que l'oxydation du Mn ainsi que la déprotonation mènent à un ralentissement des vitesses d'échange de l'eau.

Deux situations peuvent être envisagées :

- Soit la molécule d'eau qui s'échange lentement est liée directement au Ca^{2+} . Ceci est cependant étonnant pour deux raisons : 1) En solution, l'échange de l'eau liée au Ca^{2+} est beaucoup plus rapide que l'échange de l'eau liée à des ligands de Mn^{III} or Mn^{IV} , qui sont les états d'oxydation des Mn présents dans l'état S_3 du PSII. Pour expliquer cette apparente contradiction, il a été émis l'hypothèse que la molécule d'eau qui s'échange lentement pouvait être un pont oxo ou hydroxo entre le Ca et le Mn. Cette hypothèse permet également d'expliquer la dépendance des vitesses d'échange en fonction des états S_n . 2) La vitesse d'échange de complexes de Ca^{2+} liées à l'eau est extrêmement rapide, dû à une densité de charge à la surface basse qui correspond au grand rayon ionique du Ca. La vitesse d'échange avec l'eau pour $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ a été estimée à $6-9 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$, ce qui est beaucoup plus rapide que les vitesses d'échange lent dans le PSII. Le Sr^{2+} a un rayon ionique plus grand que le Ca^{2+} (1,12 et 0,99 Å respectivement), ce qui est en accord avec l'accélération de la phase lente en présence de Sr^{2+} . D'après la relation de Eyring entre les constantes de vitesse et la différence de valeurs de pK des ions Sr^{2+} et Ca^{2+} dans l'eau ($\log(k/k') \sim \Delta\text{pK}$), sachant que $\Delta\text{pK} \sim 0.4$, la vitesse d'échange du complexe $\text{H}_2\text{O-Sr}^{2+}$ devrait être ~ 3 fois plus rapide que pour le Ca^{2+} . Nous trouvons dans notre étude un facteur d'accélération plus grand, environ égal à 10. Si l'eau substrat est vraiment liée au Ca^{2+} , d'autres facteurs doivent ralentir les vitesses d'échange, comme la charge positive du cluster de Mn_4Ca .

- Soit le Ca^{2+} n'est pas directement impliqué dans la liaison de la molécule d'eau substrat. Il est possible que le Ca^{2+} affecte l'échange des molécules d'eau de manière indirecte, en affectant le réseau de protons, en contrôlant l'accès du substrat au site d'échange lent ou en modifiant la géométrie des ligands du Mn.

III) Structure par cristallographie aux rayons X

1) Introduction

Comme nous l'avons déjà expliqué, l'une des raisons pour lesquelles nous avons mis au point l'échange biosynthétique Cl/Br est que nous voulions éclaircir la situation concernant le rôle et l'implication du Cl⁻ dans le mécanisme d'oxydation de l'eau. Pour nous y aider, nous pouvons également nous attacher à déterminer la localisation précise du chlorure au sein du site d'oxydation de l'eau. Elle est en effet encore incertaine, certains auteurs favorisent un Cl⁻ directement lié à un des atomes de Mn du cluster²¹⁴ ou au Ca^{2+58,63}, et d'autres préfèrent localiser le Cl⁻ en-dehors de la sphère de première coordination du cluster^{215,216,217}. Les structures à ce jour n'ont en effet pas pu assigner une densité électronique au chlorure, au vu des résolutions des structures cristallographiques. En 2006, une étude d'absorption aux rayons X (XAS), utilisant du PSII contenant du bromure²¹⁷ a mis en évidence la présence possible d'un Br⁻ à une distance d'environ 5 Å d'un métal (probablement Ca ou Mn), mais cette distance est trop grande pour être celle d'un ligand direct.

Nous avons travaillé en collaboration avec J. Barber et J.W. Murray de l'Imperial College London, pour obtenir une structure cristallographique de PSII contenant du bromure à la place du chlorure. Le chlorure n'a qu'un seuil d'absorption difficilement accessible, alors que le bromure en a un à 13.47 keV.

2) Publication

Ces résultats ont été publiés dans l'article suivant : J. W. Murray, K. Maghlaoui, J. Kargul, N. Ishida, T.-L. Lai, A. W. Rutherford, M. Sugiura, A. Boussac and J. Barber, X-ray crystallography identifies two chloride binding sites in the oxygen evolving centre of Photosystem II, *Energy Environ. Sci.*, **2008**, 1, 161–166.

X-ray crystallography identifies two chloride binding sites in the oxygen evolving centre of Photosystem II

James W. Murray,^a Karim Maghlaoui,^a Joanna Kargul,^a Naoko Ishida,^b Thanh-Lan Lai,^b A. William Rutherford,^b Miwa Sugiura,^c Alain Boussac^b and James Barber^{*a}

Received 13th June 2008, Accepted 18th June 2008

First published as an Advance Article on the web 2nd July 2008

DOI: 10.1039/b810067p

Bromide anomalous X-ray diffraction analyses have been used to locate chloride binding sites in the vicinity of the water splitting/oxygen evolving centre (OEC) of Photosystem II. Three-dimensional crystals of PSII from *Thermosynechococcus elongatus* were grown from (i) isolated PSII crystals infiltrated with bromide or (ii) PSII obtained from cells cultured in a medium in which the chloride content was totally replaced by bromide. In either case, the anomalous diffraction yielded the same result, the existence of two bromide binding sites in the vicinity of the OEC. Neither are in the first coordination sphere of the Mn and Ca ions which form the catalytic centre of the OEC, being about 6 to 7 Å from the metal-cluster. Site 1 is located close to the side chain nitrogen of D2-K317 and the backbone nitrogen of D1-Glu333 while Site 2 is adjacent to backbone nitrogens of CP43-Glu354 and D1-Asn338. Their positioning close to postulated hydrophilic channels may suggest a role in proton removal from, or substrate access to, the OEC.

Introduction

In the region of 3 billion years ago biology developed the capacity to efficiently capture solar energy and use it to power the synthesis of organic molecules. This photosynthetic process set into motion an unprecedented explosion in biological activity allowing life to prosper on an enormous scale as witnessed by the fossil records and by the extent and diversity of living organisms on our planet today. Indeed, it was the process of photosynthesis over eons of time which has provided us with the oil, gas and coal needed to power our technologies, heat our homes and produce the wide range of chemicals and materials that support everyday life.

Today, it is estimated that photosynthesis produces more than 100 billion tons of dry biomass annually, which would be equivalent to a hundred times the weight of the total human population on our planet at the present time and equal to a mean storage rate of about 100 TW. The success of this energy generating and storage system stems from the fact that the raw materials and energy needed to drive the synthesis of biomass are available in almost unlimited amounts; sunlight, water and carbon dioxide. At the heart of the reaction is the splitting of water by sunlight into dioxygen and reducing equivalents. Prior to the evolution of the water splitting reaction, photosynthetic organisms had relied on hydrogen/electron donors such as H₂S, NH₃, organic acids and Fe²⁺, which were in limited supply compared with the vast quantities of water available on our planet.

The appearance of the water splitting reaction of photosynthesis had dramatic consequences, converting the atmosphere of Earth from anoxygenic to oxygenic and at the same time allowing the ozone layer to be established. With oxygen available, the efficiency of metabolism increased significantly since aerobic respiration provides in the region of twenty times more cellular energy than anaerobic respiration. It was probably this substantial improvement in cellular efficiency, due to aerobic metabolism, which drove the subsequent evolution of eukaryotic cells and multicellular organisms. The establishment of the ozone layer provided a shield against harmful UV radiation allowing organisms to explore new habitats and especially to exploit the terrestrial environment.

The photosynthetic enzyme that uses light energy to split water is known as Photosystem II (PSII). It is a multiprotein complex contained within the thylakoid membranes of all types of plants, algae and cyanobacteria.¹ In contrast to chemical and electrochemical water splitting, which are thermodynamically highly demanding, the PSII-catalyzed biological water-splitting mechanism is truly remarkable since it proceeds with very little over-potential.^{2–4} The processes underpinning this reaction are initiated by the absorption of visible light by chlorophyll (Chl) and other pigments that act as an antenna system for the reaction centre (RC) where energy is initially stored by charge transfer. The primary electron donor consisting of Chl_a is located within the RC, composed of the D1 and D2 proteins, and is called P680. Excited P680 (P680*) donates an electron to the primary electron acceptor, pheophytin (Pheo) *a*. The formation of a radical pair P680⁺Pheo⁻ takes place in a few picoseconds and occurs across the membrane. Stabilisation of the charge transfer state is accomplished by electron transfer from Pheo⁻ to a plastoquinone acceptor Q_B in the microsecond to millisecond time domain according to the redox state of Q_B. This electron transfer is aided by an intermediate plastoquinone molecule Q_A. Unlike Q_B, Q_A

^aDivision of Molecular Biosciences, Imperial College London, London, UK SW7 2AZ. E-mail: j.barber@imperial.ac.uk; Fax: +44 20 759 45267; Tel: +44 20 759 45266

^biBiTec-S, URA CNRS 2096, CEA Saclay, 91191 Gif sur Yvette, France
^cCell-Free Science and Technology Research Center, Ehime University, Bunkyo-cho, Matsuyama Ehime, 790-8577, Japan

plastoquinone is tightly bound within the RC, functions as a single electron acceptor and does not undergo protonation. The Q_B plastoquinone, however, accepts two electrons and is fully protonated prior to its departure from the RC *via* the hydrophobic lipid phase of the membrane. In this way reducing equivalents leave PSII and with the aid of a second light reaction occurring in Photosystem I (PSI) are used to reduce NADP⁺ and ultimately CO₂.

On the oxidising side of the PSII RC, which is localised towards the luminal surface of the thylakoid membrane, P680⁺ is used to split water. Four oxidising equivalents are needed to form dioxygen. Since each water splitting reaction occurs at a single catalytic centre, the formation of dioxygen requires four photochemical turnovers of the PSII RC and the storage of four oxidising equivalents. This storage of oxidising potential is driven by electron transfer to P680⁺ *via* a redox active tyrosine Y_Z and occurs in a catalytic centre containing four Mn ions and a Ca²⁺. The S-state cycle of Joliet and Kok^{5,6} provides a framework for describing the chemical intermediates of the catalytic cycle, where the energy of each photon absorbed by PSII drives the conversion from S₀ to S₁, S₁ to S₂, S₂ to S₃ and S₃ to S₄, where the S₄ to S₀ transition is a dark reaction giving rise to the formation of dioxygen. In this cycle the S₁-state is stable in the dark so that maximum oxygen emission occurs from dark-adapted cells on the third, single turnover, flash followed by a subsequent period of four. The details of the S-state cycle and the chemistry of the water splitting reaction have been emerging over many years through the application of a wide range of techniques (see various articles in ref. 7 and 8) being particularly spurred by the recent structural analyses of PSII by X-ray absorption spectroscopy^{9–12} and X-ray crystallography.^{13–17} These studies, coupled with quantum mechanical analyses have provided detailed schemes for the water splitting chemistry leading to O–O bond formation^{18–20} and refinement of the structure of the oxygen evolving centre (OEC).^{21,22} However, one factor which has been difficult to consider is the apparent involvement of chloride in the chemistry of the water splitting reaction.

The recognition that chloride is required as a cofactor for photosynthetic oxygen evolution stems from the pioneering studies of Arnon and Whatley,²³ Bove *et al.*²⁴ and Izawa *et al.*²⁵ Since then this requirement has been investigated in great depth as detailed in the recent review of van Gorkom and Yocum.²⁶ However the role and function of Cl[−] within the S-state cycle is not understood and remains the subject of a good deal of debate.^{26–28} In plant PSII, spectroscopic and enzymological studies have led to proposed models with either a single Cl[−]-site with two different binding affinities²⁹ or two independent binding sites (ref 30–32, see also ref. 33 for a recent discussion).

The location of the Cl[−]-binding site (or sites) is also uncertain, with some authors favouring a Cl[−] directly liganded to one of the Mn ions of the cluster³⁴ or to Ca²⁺,^{35,36} and others preferring the Cl[−] to be outside the first coordination sphere of the metal cluster.^{37–39} To date the resolutions of the crystal structures available are insufficient to assign electron density to this anion. Bromide is known to substitute for chloride in the OEC and give almost complete enzyme function.⁴⁰ Indeed, a recent X-ray absorption study, using Br[−]-containing PSII,³⁹ has provided what the authors describe as “tentative evidence” for a Br[−] (and

hence Cl[−]) at a distance of ≈ 5 Å from a metal (presumably Ca or Mn): too far to be a direct ligand.

X-Ray anomalous dispersion, a specific and sensitive method to detect heavy atoms within crystals,⁴¹ has been successfully used, even at low resolution, to confirm the localisation of the Sr ion in the Mn₄Sr cluster of the OEC after a biosynthetic Ca²⁺/Sr²⁺ exchange.⁴² Chloride has no accessible absorption edges, but bromide does at 13.47 keV, a near-optimal wavelength for many synchrotron beam lines and therefore ideal for X-ray anomalous diffraction studies.

In the present work we have prepared two kinds of 3-dimensional crystals of PSII isolated from *Thermosynechococcus elongatus*: (i) standard PSII crystals infiltrated with bromide and (ii) PSII crystals obtained from cells grown in a culture medium in which the chloride content was replaced by bromide. In both cases, anomalous X-ray diffraction analyses were conducted to detect bromide binding sites at or close to the OEC. We find similar results in both types of sample: the presence of two bromide binding sites close to the Mn₄Ca cluster but too far to be ligands to the metals.

Material and methods

Culturing of cells

For the bromide-infiltration experiments, PSII was isolated from *Thermosynechococcus elongatus* wild type (WT) cells, while for the experiments involving cells grown in bromide-containing media³³ a strain was used which had a His₆-tag on the CP43 subunit⁴³ with only the *psbA₃* gene (WT*).⁴⁴

For the bromide-infiltration experiments, small cultures of WT *Thermosynechococcus elongatus* (100 mL and 1 L) were grown in Cl[−]-containing DTN-medium. Cell suspensions were incrementally sub-cultured from 100 mL to 1 L before inoculating a 20 L culture. These 20 L cultures were grown at 57 °C while bubbling continuously with 5% CO₂-enriched air and illuminating with white light (Growlux, Sylvania) of increasing intensity (50–250 μmoles photons m^{−2} s^{−1}) according to cell density. Cells were harvested in the log phase after 8 days at a final OD₆₈₅ ~ 1.8. For the Cl/Br physiologically exchange experiments, the WT* cells were grown as previously reported.³³

Isolation of thylakoids and PSII

Br[−] containing PSII from WT* cells was purified exactly as reported previously.³³ Chloride was substituted with bromide in all buffers. PSII from WT cells were isolated as described previously,⁴⁵ with the following modifications. WT cells were disrupted with two passes in a French press at 6000 psi and thylakoids resuspended at a Chl concentration of 1.6 mg mL^{−1} in 20 mM MES pH 6.5, 25% (v/v) glycerol, 20 mM CaCl₂, 10mM MgCl₂ prior to solubilisation with 0.5% (w/w) β-DDM (Biomol, Germany). Core complexes were isolated after 2 successive anion exchange chromatography steps as described by Kern *et al.*,⁴⁶ yielding only dimeric PSII. The sample was washed with 40 mM MES–NaOH, pH 6.0, 20 mM CaBr₂, 0.02% (w/w) β-DDM, 5% (w/w) glycerol to remove traces of chloride and concentrated in a Millipore ultra-free centrifugation device (100 KD MWCO) at 6000g.

Crystallisation

For the bromide-infiltration experiments (Br-infiltrated), PSII core complexes purified from WT cells grown in the presence of chloride were incubated on ice for 30 minutes in 40 mM MES–NaOH, pH 6.0, 100 mM CaBr₂, 0.02% (w/w) β-DDM, 5% (w/w) glycerol and spun for 30 minutes at 18 000g in a microfuge at 4 °C. The Chl concentration was adjusted to 1.75 mg mL⁻¹ and no chloride was present in the crystallisation solutions. PSII core complexes were mixed 1 : 1 with a solution twice as concentrated as the reservoir solution, consisting of 100 mM Hepes pH 7.5, 100 mM (NH₄)₂SO₄ 20% glycerol, 10–16% PEG-4000 (Fluka), 1 mM of methyl mercurial chloride (Hampton Research), 0.11 mM polyoxyethylene lauryl ether (C₁₂E₈) (Hampton Research), as described in Ferreira *et al.*¹⁵ Crystals were grown at 17 °C using the hanging drop vapour diffusion method.

PSII core complexes purified from WT* cells grown in the presence of bromide (Br-physiologically substituted) were washed with 40 mM MES–NaOH, pH 6.0, 20 mM CaBr₂, 0.02% (w/w) β-DDM, 5% (w/w) glycerol and concentrated in a Millipore ultra-free centrifugation device (100 KD MWCO) at 6000g. The sample was spun at 18 000g in a microfuge at 4 °C and crystallisation trials performed as described above.

Crystals obtained in both experiments reached maximum dimensions of 400–500 microns in the longest dimension and were harvested after 3–5 days. Crystals were cryo-protected by stepwise addition of mother liquor with glycerol replacing water to a final concentration of 25% (v/v) and flash frozen in liquid nitrogen. Crystals were viewed with SZX-12 Olympus Stereo-microscope coupled to a DP12 digital camera.

X-Ray data collection and analysis

X-ray data sets were collected using the undulator MAD beamline X06SA at the Swiss Light Source from crystals derived from PSII soaked with 100mM CaBr₂ (Br-infiltrated) as well as from crystals obtained from WT* in which chloride had been physiologically replaced by bromide (Br-physiological substituted). Datasets were integrated and scaled using XDS and XSCALE,⁴⁷ and further processed using programs of the CCP4

Table 1 Data collection and processing statistics for the crystals with Br-infiltrated and Br-physiologically substituted crystals. *R*_{meas} is the multiplicity independent merging *R* as defined by Diederichs and Karplus.⁶¹ Values in brackets refer to the outer resolution shell

	Br-infiltrated [ca. 450 xtal]	Br-physiologically substituted [806 xtal]
Detector	MarCCD	PILATUS 6M
wavelength/Å (energy/keV)	0.90500 (13.6999)	0.9150 (13.55018)
Cell	<i>a</i> = 131.73 Å <i>b</i> = 226.68 Å <i>c</i> = 306.71 Å	<i>a</i> = 133.42 Å <i>b</i> = 226.82 Å <i>c</i> = 309.52 Å
Resolution/Å	10–4.45 (4.8–4.45)	10–4.21 (4.3–4.2)
Observations	223 263 (27 217)	914 340 (64 387)
Unique observations	100 620 (15 188)	132 169 (9076)
Multiplicity	2.21 (1.79)	6.92 (7.09)
Completeness (%)	92.3 (68.2)	99.9 (99.8)
<I/sigI>	5.68 (2.41)	13.45 (2.12)
R _{meas}	0.116 (0.702)	0.096 (1.08)

suite (CCP4, 1994).⁴⁸ Molecular replacement was performed using the PSII model 2AXT¹⁶ with PHASER,⁴⁹ which was also used to calculate phases. Phased anomalous difference maps were calculated in COOT⁵⁰ and subjected to 2-fold non-crystallographic averaging (see Table 1 for the crystallographic data). These maps were searched for peaks which could be identified as bromide sites. Figures were prepared using the PyMol molecular graphics system.⁵¹

Results and discussion

For the Br-infiltrated crystals, two peaks in the phased anomalous difference map not attributable to sulfur atoms or other known PSII anomalous ions such as Ca and Fe, were identified within a radius of 10 Å of the OEC; Site 1 at 13.6σ and Site 2 at 12.1σ which are very close to the OEC (see Fig. 1A). These peaks are interpreted as bromide sites as they are not present in equivalent anomalous diffraction maps calculated from crystals of PSII containing no bromide. The 9.7σ peak at the OEC is due to the anomalous Mn signal. Site 1 is close to the terminal nitrogen of D2-Lys 317 and the backbone nitrogen of D1-Glu 333, while Site 2 is in the vicinity of the backbone nitrogens of D1-Asn 338 and of CP43-Glu 354, where CP43 is a light harvesting Chl-binding protein of PSII. However, their distance from the closest Mn ion, no matter which model for the cluster is used,^{10,15,16} indicates that under the conditions of the experiment, the identified halide binding sites are not in ligating distance to Mn or to the Ca²⁺ within the OEC.

The results presented in Fig. 1A show potential chloride binding sites in PSII which are readily exchangeable with bromide and are close to the OEC. However, there is a possibility that a high affinity chloride-binding site exists within the OEC which does not readily exchange during the 100 mM CaBr₂ treatment of isolated PSII sample prior to crystallisation. For this reason we cultured *T. elongatus* in a medium in which its chloride content was replaced entirely by bromide following the procedure of Ishida *et al.*³³ The resulting anomalous difference map derived from Br-physiologically substituted PSII is shown in Fig. 1B where it can be seen that the three main peaks in the anomalous difference map are similar to those shown in Fig. 1A and that there are no other visible strong peaks, indicative of additional bromide-binding sites within 10 Å of the OEC. In this case the sigma values for Site 1 and Site 2 were 1.6 and 2.5, respectively, while the anomalous Mn signal at the OEC was at 5.15σ. Site 1 in the Br-physiologically substituted crystal was 4.3 Å from the side chain nitrogen of D2-K317 and 3.4 Å from the backbone nitrogen of D1-Glu333. Site 2 is 3.5 Å from both the backbone nitrogens of CP43-Glu354 and D1-Asn338 which agree, within the resolution of the data, with the results obtained with the Br-infiltrated PSII crystals.

Agreement between the two sets of data also applies for the distances between the OEC and the two bromide sites. Note that the contouring levels between the two data sets shown in Fig. 1 differ. This is due to different levels of signal, with the physiologically substituted being better because the quality of the crystals used for data collection were poorer for Br-infiltrated PSII.

Coordinates for the two sites, either from the Br-infiltrated or Br-physiologically substituted are given in Table 2.

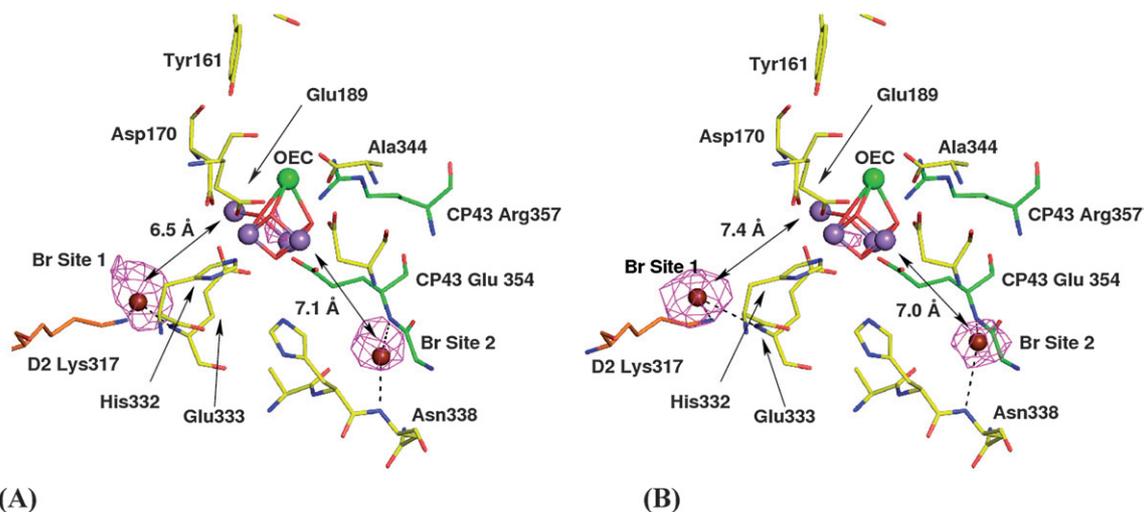


Fig. 1 The bromide sites identified at the OEC in context of the Ferreira *et al.*¹⁵ structure (1S5L). Amino acids belonging to the D1 protein are in yellow, those of D2 protein are in orange and those of CP43 are in green, with selected residues labelled. 2-Fold averaged phased anomalous difference maps are shown. Panel (A) shows data from a crystal from Br-infiltrated PSII contoured at 3σ . (B) Shows data from a crystal grown with Br-physiologically replacing chloride contoured at 9σ . The distances shown are between the peak of anomalous Br diffraction for site 1 and site 2 and the closest Mn of the Ferreira *et al.*¹⁵ model.

Table 2 The coordinates (in x, y, z triples of orthogonal Å), of the two sites, in both crystals measured in the context of the 3.5 Å (1S5L) and 3.0 Å (2AXT) refined crystal structures

PDB	Br-infiltrated	Br-physiologically substituted
1S5L (site 1)	24.882, 34.256, 64.135	23.572, 34.771, 63.300
2AXT (site 1)	24.707, 32.614, 63.526	23.419, 33.141, 62.669
1S5L (site 2)	28.402, 35.568, 75.946	29.306, 35.990, 75.957
2AXT (site 2)	27.994, 33.862, 75.410	28.901, 34.273, 75.445

Under the experimental conditions used, our data show that neither of the two Br⁻-binding sites is close enough to form direct ligands to Mn or Ca²⁺. Indeed, several studies suggest that Cl⁻ is not a direct ligand to the OEC metal-cluster.^{38,39,52} For example, in the recent extended X-ray absorption fine structure (EXAFS) work on PSII (isolated from spinach) which had been biochemically infiltrated with bromide, Haumann *et al.*³⁹ concluded that a bromide ion is bound at ≈ 5 Å from Mn or Ca. This distance differs from those reported here, but this difference is probably within the limitation imposed by the resolution of the X-ray diffraction. It is worth pointing out that Haumann *et al.*³⁹ only saw the ≈ 5 Å back-scattering peak at low Br⁻ concentrations. This peak was lost as the Br⁻ concentration was increased with an apparent concentration dependence that matched the Br⁻-induced recovery of enzyme activity. In the present work, X-ray data was collected from crystals exposed to variable levels of Br⁻ (Br-infiltrated, Br⁻ ≈ 50 mM; Br-physiologically substituted, Br⁻ ≈ 10 mM or less) without any significant change in the data.

The demonstration here of the existence of two halide-binding sites does not eliminate the earlier one-site two-state model,²⁹ since no correlation has been made with activity. However, the presence of the two halides in the crystallographic data is clearly

more consistent with a two-site model (ref. 30–32; see also ref. 38).

Site 1 is close to D2-Lys317, which is believed to form part of a proton channel leading from the OEC to the lumen.^{15,53} The bound Cl⁻ may help to maintain a proton-relay in this proposed channel, a suggestion previously made in the absence of structural information.^{37,38} Site 2 is close to the backbone nitrogen of D1-Asn 338 and CP43-Glu 354 where the latter is a residue contained within a conserved 3_{10} -helix of the large extrinsic luminal loop of CP43 and almost certainly acts as a ligand for a Mn ion within the OEC.¹⁵ It has also been suggested that CP43-Glu354 is a component of a second water/proton channel linking the OEC with the lumen,⁵³ and again the Cl⁻ bound at site 2 could facilitate proton transfer. The proximity of the Cl⁻ to a direct ligand of a Mn ion could be consistent with perturbations of the Mn EPR signal seen when Cl⁻ is removed.^{32,54}

Since our analysis relates to the S₁-state or a modification of it, it does not rule out Cl⁻-binding to the Mn or Ca²⁺ in other S-states, where it may have a more direct role in water oxidation catalysis.^{33,55} Indeed, there is evidence from studies with synthetic binuclear Mn-compounds that Cl⁻ will form direct ligands when Mn is in its high oxidative state, apparently playing a role in charge neutralisation and redox potential control.^{56,57} However, since both binding sites are located in regions postulated to be hydrophobic channels, then the suggestion that chloride facilitates substrate access^{35,58} and proton release^{37,38} to and from the OEC would be consistent with the proposal that one of the two halides is not absolutely required for the water splitting reaction and that removal of Cl⁻ slows the kinetics of the S-state cycle but does not inhibit O₂-evolution completely.^{29,32}

Although it is possible that during the collection of the X-ray data the oxidation state of the Mn ions within the OEC may have changed due to the generation of free electrons in the crystal,^{59,60} it is unlikely that any associated conformational changes would be sufficiently large to affect the interpretation of the diffraction

data presented here given its intermediate resolution. It is possible, however, that X-ray induced reduction of the Mn-cluster by the X-ray beam could bring about a change in the chloride binding. Given this proviso, our results indicate two bromide (and by analogy chloride) binding sites within the vicinity of the OEC but not sufficiently close to the metal-cluster to form direct ligands to it.

Abbreviations

Chl, chlorophyll; RC, reaction centre; β -DDM, dodecyl- β -D-maltoside; C₁₂E₈, polyoxyethylene lauryl ether; EXAFS, extended X-ray absorption fine structure; OEC, oxygen evolving complex; MAD, multiple-wavelength anomalous diffraction; MES, 2(N-morpholino)ethanesulphonic acid; P680, primary electron donor of photosystem II; Pheo, pheophytin; PSII, photosystem II; PSI, photosystem I; Q_A, Q_B, fixed and mobile plastoquinones of PSII; WT, wild type;

Acknowledgements

We acknowledge financial support for this work from the Biotechnology and Biological Science Research Council (BBSRC) and from The Royal Society UK–Japan exchange programme. This work was also supported in part by the JSPS and CNRS under the Japan–France Research Cooperative Program and the SolarH and SolarH₂ programs from the European Community (contract 212508). NI was supported in part by the Bio-Hydrogen program of CEA. We also wish to acknowledge our access to the facilities and staff of the Swiss Light Source, particularly Clemens Schulze-Briese.

References

- 1 J. Barber, Photosystem II: The engine of life, *Biophys. Quart. Rev.*, 2003, **36**, 71–89.
- 2 B. A. Diner and G. T. Babcock, in *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*, ed. D. R. Ort and C. F. Yocum, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1996, pp. 213–247.
- 3 R. D. Britt, in *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*, ed. D. R. Ort and C. F. Yocum, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1996, pp. 137–159.
- 4 B. A. Diner and F. Rappaport, Structure, dynamics and energetics of the primary photochemistry of photosystem II of oxygenic photosynthesis, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2002, **53**, 551–580.
- 5 P. Joliot, G. Barbieri and R. Chabaud, Un nouveau modele des centres photochimiques du system II., *Photochem. Photobiol.*, 1969, **10**, 309–329.
- 6 B. Kok, B. Forbush and M. McGloin, Cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution-I. A linear four step mechanism, *Photochem. Photobiol.*, 1970, **11**, 457–475.
- 7 T. J. Wydrzynski and K. Satoh, Photosystem II. The Light-Driven Water:Plastoquinone Oxidoreductase, *Advances in Photosynthesis and Respiration*, Springer, Dordrecht, The Netherlands, vol. 22, 2005, pp. 1–786.
- 8 J. Barber and A. W. Rutherford, Revealing how nature uses sunlight to split water, *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B*, 2007, **363**, 1123–1303.
- 9 V. K. Yachandra, Structure of the Mn complex in Photosystem II: Insights from X-ray spectroscopy, *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B*, 2002, **357**, 1347–1358.
- 10 J. Yano, J. Kern, K. Sauer, M. J. Latimer, Y. Pushkar, J. Biesiadka, B. Loll, W. Saenger, J. Messinger, A. Zouni and V. K. Yachandra, Where water is oxidised to dioxygen: Structure of the photosynthetic Mn₄Ca cluster, *Science*, 2006, **314**, 821–825.
- 11 Y. Pushkar, J. Yano, K. Sauer, A. Boussac and V. Yachandra, Structural Changes in the Mn₄Ca Cluster and the Mechanism of

Photosynthetic Water Splitting, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008, **105**, 1879–1884.

- 12 J. Yano and V. R. Yachandra, Where water is oxidized to dioxygen: Structure of the photosynthetic Mn₄Ca cluster from X-ray spectroscopy, *Inorg. Chem.*, 2008, **47**, 1711–1726.
- 13 A. Zouni, H. T. Witt, J. Kern, P. Fromme, N. Krauss, W. Saenger and P. Orth, Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution, *Nature*, 2001, **409**, 739–743.
- 14 N. Kamiya and J. R. Shen, Crystal structure of oxygen-evolving Photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7 resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2003, **100**, 98–103.
- 15 K. N. Ferreira, T. M. Iverson, K. Maghlaoui, J. Barber and S. Iwata, Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center, *Science*, 2004, **303**, 1831–1838.
- 16 B. Loll, J. Kern, W. Saenger, A. Zouni and J. Biesiadka, Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II, *Nature*, 2005, **438**, 1040–1044.
- 17 J. Barber, Crystal structure of the oxygen-evolving complex of Photosystem II., *Inorg. Chem.*, 2008, **47**, 1700–1710.
- 18 P. E. M. Siegbahn and M. Lundberg, The mechanism for dioxygen formation in PSII studied by quantum chemical methods, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2005, **4**, 1035–1043.
- 19 P. E. M. Siegbahn, O–O bond formation in the S₄-state of the oxygen evolving complex in Photosystem II., *Chem.–Eur. J.*, 2006, **12**, 9217–9237.
- 20 P. E. M. Siegbahn, Theoretical studies of O–O bond formation in Photosystem II., *Inorg. Chem.*, 2008, **47**, 1779–1786.
- 21 E. M. Sproviero, J. A. Gascon, J. P. McEvoy, G. W. Brudvig and V. S. Batista, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2007, **17**, 173–180.
- 22 E. M. Sproviero, J. A. Gascón, J. P. McEvoy, G. W. Brudvig and V. S. Batista, A Model of the Oxygen-Evolving Center of Photosystem II Predicted by Structural Refinement Based on EXAFS Simulations, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 6728–6730.
- 23 D. I. Arnon and F. R. Whatley, Is chloride a coenzyme of photosynthesis?, *Science*, 1949, **110**, 554–556.
- 24 J. M. Bove, C. Bove, F. R. Whatley and D. I. Arnon, Chloride requirement for oxygen evolution in photosynthesis, *Z. Naturforsch.*, 1963, **18b**, 683–688.
- 25 S. Izawa, R. L. Heath and G. Hind, Role of chloride ion in photosynthesis. 3. Effects of artificial electron donors upon electron transport, *Biochim. Biophys. Acta*, 1969, **180**, 388–389.
- 26 H. J. Van Gorkom, and C. F. Yocum, The calcium and chloride cofactors, in *Photosystem II. The Light-Driven Water Plastoquinone Oxido-reductase*, ed. T. Wydrzynski, T. J. and K. Satoh, Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2005, pp. 307–327.
- 27 R. J. Debus, The manganese and calcium-ions of photosynthetic oxygen evolution, *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, **1102**, 269–352.
- 28 C. F. Yocum, The calcium and chloride requirements of the O-2 evolving complex, *Coord. Chem. Rev.*, 2008, **252**, 296–305.
- 29 K. Lindberg and L.-E. Andreasson, A one-site, two-state model for the binding of anions in Photosystem II, *Biochemistry*, 1996, **35**, 14259–14267.
- 30 P. Homann and Y. Inoue, The anion and calcium requirement of the photosynthetic water splitting complex, in *Ion interactions in energy transfer biomembranes*, ed. G. Papageorgiou, J. Barber and S. Papa, Plenum Press, New York, 1986, pp. 291–302.
- 31 A. Boussac, Exchange of chloride by bromide in the manganese photosystem II complex studied by cw- and pulsed-EPR, *Chem. Phys.*, 1995, **194**, 409–418.
- 32 P. van Vliet and A. W. Rutherford, Properties of the chloride-depleted oxygen-evolving complex of photosystem II studied by electron paramagnetic resonance, *Biochemistry*, 1996, **35**, 1829–1839.
- 33 N. Ishida, M. Sugiura, F. Rappaport, T.-L. Lai, A. W. Rutherford and A. Boussac, Biosynthetic exchange of bromide for chloride and strontium for calcium in the Photosystem II oxygen-evolving enzyme, *J. Biol. Chem.*, 2008, **283**, 13330–13340.
- 34 P. O. Sandusky and C. F. Yocum, The chloride requirement for photosynthetic oxygen evolution; analysis of the effects of chloride and other anions on amine inhibition of the oxygen-evolving complex, *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, **766**, 603–611.
- 35 A. W. Rutherford, Photosystem II, the water-splitting enzyme, *Trends Biochem. Sci.*, 1989, **14**, 227–232.
- 36 J. P. McEvoy and G. W. Brudvig, Water-splitting chemistry of photosystem II., *Chem. Rev.*, 2006, **106**, 4455–4483.

- 37 W. J. Coleman, Chloride binding proteins: Mechanistic implications for the oxygen evolving complex of Photosystem II, *Photosynth. Res.*, 1990, **23**, 1–27.
- 38 K. Olesen and L.-E. Andreasson, The function of the chloride ion in photosynthetic oxygen evolution, *Biochemistry*, 2003, **42**, 2025–2035.
- 39 M. Haumann, M. Barra, P. Loja, S. Loscher, R. Krivanek, A. Grundmeier, L.-E. Andreasson and H. Dau, Bromide does not bind to the Mn₄Ca complex in its S₁ state in Cl-depleted and Br-reconstituted oxygen evolving photosystem II: evidence from X-ray absorption spectroscopy at the Br K-edge, *Biochemistry*, 2006, **45**, 13101–13107.
- 40 G. Hind, H. Y. Nakatani and S. Izawa, The role of Cl⁻ in photosynthesis. The Cl⁻ requirement of electron transport, *Biochim. Biophys. Acta*, 1969, **172**, 277–289.
- 41 M. E. Than, S. Henrich, G. P. Bourenkov, H. D. Bartunik, R. Huber and W. Bode, The endoprotease furin contains two essential Ca²⁺ ions stabilizing its N-terminus and the unique S1 specificity pocket, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, 2005, **61**, 505–512.
- 42 J. Kargul, K. Maghlaoui, J. W. Murray, Z. Deak, A. Boussac, A. W. Rutherford, I. Vass and J. Barber, Purification, crystallization and X-ray diffraction analyses of the *T. elongatus* PSII core dimer with strontium replacing calcium in the oxygen-evolving complex, *Biochim. Biophys. Acta*, 2007, **1767**, 404–413.
- 43 M. Sugiura and Y. Inoue, Highly purified thermo-stable oxygen-evolving photosystem II core complex from the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* having His-tagged CP43, *Plant Cell Physiol.*, 1999, **40**, 1219–1231.
- 44 M. Sugiura, A. Boussac, T. Noguchi and F. Rappaport, Influence of Histidine-198 of the D1 subunit on the properties of the primary electron donor, P₆₈₀, of photosystem II in *Thermosynechococcus elongatus*, *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, **1777**, 331–342.
- 45 A. Boussac, F. Rappaport, P. Carrier, J.-M. Verbavatz, R. Gobin, D. Kirilovsky, A. W. Rutherford and M. Sugiura, Biosynthetic Ca²⁺/Sr²⁺ exchange in the photosystem II oxygen evolving enzyme of *Thermosynechococcus elongatus*, *J. Biol. Chem.*, 2004, **279**, 22809–22819.
- 46 J. Kern, B. Loll, C. Lüneberg, D. DiFiore, J. Biesiadka, K. D. Irrgang and A. Zouni, Purification, characterisation and crystallisation of photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* cultivated in a new type of photobioreactor, *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, **1706**, 147–157.
- 47 W. J. Kabsch, Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants, *J. Appl. Crystallogr.*, 1993, **26**, 795–800.
- 48 Collaborative Computational Project No 4 (1994), The CCP4 suite: programs for protein crystallography, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, 1994, **50**, 760–763.
- 49 A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni and R. J. Read, Phaser crystallographic software, *J. Appl. Crystallogr.*, 2005, **40**, 658–674.
- 50 P. Emsley and K. Cowtan, Coot: model-building tools for molecular graphics, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, 2004, **60**, 2126–2132.
- 51 W. L. DeLano, *The PyMOL Molecular Graphics System*. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA, 2002. <http://www.pymol.org>.
- 52 A. Rashid and P. H. Homann, Properties of iodide activated photosynthetic water oxidizing complexes, *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, **1101**, 303–310.
- 53 J. W. Murray and J. Barber, Structural characteristics of channels and pathways in photosystem II including the identification of an oxygen channel, *J. Struct. Biol.*, 2007, **159**, 228–237.
- 54 T.-A. Ono, J.-L. Zimmermann and A. W. Rutherford, EPR evidence for a modified S-state transition in chloride depleted Photosystem II., *Biochim. Biophys. Acta*, 1986, **851**, 193–201.
- 55 H. Wincencjusz, H. J. van Gorkom and C. F. Yocum, The photosynthetic oxygen evolving complex requires chloride for its redox state S-2->S-3 and S-3->S-0 transitions but not for S-0->S-1 or S-1->S-2 transitions, *Biochemistry*, 1997, **36**, 3663–3670.
- 56 J. E. Sheats, R. S. Czernuszewicz, G. C. Dismukes, A. L. Rheingold, V. Petrouleas, J. Stubbe, W. H. Armstrong, R. H. Beer and S. J. Lippard, Binuclear manganese(III) complexes of potential biological significance, *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, **109**, 1435–1444.
- 57 T. K. Lal and R. Mukherjee, Modeling the Oxygen-Evolving Complex of Photosystem II. Synthesis, Redox Properties, and Core Interconversion Studies of Dimanganese Complexes Having {Mn^{III}₂(μ-O)(μ-OAc)₂}²⁺, {Mn^{III}Mn^{IV}(μ-O)₂(μ-OAc)₂}²⁺, and {Mn^{IV}₂(μ-O)₂(μ-OAc)₂}³⁺ Cores with MeL as a Terminal Ligand: A New Asymmetric Mixed-Valence Core, *Inorg. Chem.*, 1998, **37**, 2373–2382.
- 58 K. Beckmann, N. Ishida, A. Boussac and J. Messinger, Effects of the Calcium/Strontium and Chloride/Bromide substitution on substrate water exchange rates in Photosystem II, *Photosynth. Res.*, 2007, **91**, vol. 2–3.
- 59 J. Yano, J. Kern, K. D. Irrgang, M. J. Latimer, U. Bergmann, P. Glatzel, Y. Pushkar, J. Biesiadka, B. Loll, K. Sauer, J. Messinger, A. Zouni and V. K. Yachandra, X-ray damage to the Mn₄Ca complex in single crystals of photosystem II: a case study for metalloprotein crystallography, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005, **102**, 12047–12052.
- 60 M. Grabolle, M. Haumann, C. Müller, P. Liebisch and H. Dau, Rapid loss of structural motifs in the manganese complex of oxygenic photosynthesis by X-ray irradiation at 10–300 K, *J. Biol. Chem.*, 2006, **281**, 4580–4588.
- 61 K. Diederichs and P. A. Karplus, Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography, *Nat. Struct. Biol.*, 1997, **4**, 269–275.

IV) Discussion

Le travail présenté dans ce manuscrit met en évidence l'implication du chlorure dans le mécanisme d'oxydation de l'eau. Son échange par du bromure, en présence de calcium ou de strontium, entraîne des modifications importantes aussi bien du point de vue cinétique (chapitre III) que structural (chapitre IV).

Le nombre de sites de fixation du chlorure au sein du complexe d'oxydation de l'eau n'est pas une donnée acquise, et peut être discuté à la lumière des résultats obtenus et des récentes publications parues sur le sujet.

Trois publications relatant des expériences de cristallographie aux rayons X ont rapporté la présence d'un ou deux sites de fixation au chlorure/bromure/iodure dans la structure. La première publication (de Murray et al.) est celle qui est décrite dans le chapitre V et qui a reporté la présence de deux sites de fixation au bromure à environ 6-7 Å du cluster de Mn_4Ca . La deuxième publication¹¹ (de Guskov et al.) qui est celle de la structure cristallographique du PSII avec une résolution de 2,9 Å a montré la présence d'un seul site de fixation au chlorure à 6,5 Å du cluster de Mn_4Ca . Enfin, la troisième publication⁸⁵ (de Kawakami et al.) présente des résultats de cristallographie obtenus sur du PSII où le chlorure a été substitué par iodure et bromure. Dans les deux cas, deux sites de fixation aux halogénures ont été détectés, à égale distance du cluster de Mn_4Ca (environ 6,5 Å du Mn le plus proche).

Dans la structure de Guskov¹¹, la présence d'un seul site de fixation du Br^- au lieu des deux détectés dans mes deux autres publications proviendrait de la qualité des données, d'artefacts provenant d'une résolution insuffisante, ou des dommages causés par les rayons X.

La première et la troisième publication font état de deux sites de fixation aux halogénures dans du PSII où le chlorure a été préalablement substitué par du bromure ou de l'iodure. La première chose à noter est la méthode de substitution employée :

- Dans la structure de Murray et al., les échantillons de PSII infiltrés au Bromure de façon biochimique sont mis au contact durant 30 minutes avec 100 mM de $CaBr_2$ avant la cristallisation, pour échanger le chlorure par le bromure.
- Dans l'étude de Kawakami et al.⁸⁵, du PSII purifié de la cyanobactérie *Thermosynechococcus vulcanus* a été incubé durant 30 minutes dans du tampon contenant 40 mM de Br^- ou I^- .

Au vu des résultats présentés dans ces deux publications, il paraîtrait que l'échange du chlorure par les autres anions a bien eu lieu. Ceci a d'ailleurs été vérifié par deux moyens. Dans le cas de Murray et al., une analyse réalisée en parallèle sur du PSII Ca/Br biosynthétique a montré les mêmes sites de fixation. Dans le cas de Kawakami et al.⁸⁵, l'activité des échantillons substitués avec I⁻ est nulle en présence de 15-20 mM de I⁻ dans le milieu et remonte lorsque le PSII est lavé et remis dans du tampon contenant du Cl⁻.

Les résultats de ces vérifications nous paraissent assez surprenants car nous avons montré dans notre étude sur l'échangeabilité que l'échange Cl⁻/Br⁻ ne débutait qu'après 5~6 heures d'incubation. Les 30 minutes d'incubation utilisées dans les études de Murray et Kawakami nous paraissent trop peu pour permettre l'échange.

Une explication proviendrait des conditions utilisées lors de l'expérience. Des variations dans les conditions de lumière ou de température ont pu endommager le PSII.

La deuxième explication serait l'existence d'un site de fixation au chlorure supplémentaire, de forte affinité. Il ne serait pas détecté dans les structures. Ce fait a d'ailleurs été évoqué par Kawakami et al.⁸⁵. La réduction du cluster de Mn₄Ca par les rayons X peut tout à fait endommager le site et empêcher l'observation d'un Cl⁻ ligand direct du cluster. Les deux sites de faible affinité détectés ici n'auraient pas d'effet majeur sur les cinétiques, seul le site de forte affinité en aurait. Il faut donc attendre 6 heures d'incubation pour commencer à échanger le site de forte affinité et le détecter. L'existence de ce site de forte affinité est d'ailleurs confirmée par les mesures d'activité sous éclairage continu d'un échantillon qui a été repris dans un tampon sans halogénure pendant plusieurs heures. Son activité reste de 80% par rapport à un échantillon contrôle Ca/Cl (Figure 79).

Une autre situation peut être envisagée suite à des résultats non publiés de mesures Br-EXAFS d'un échantillon biosynthétique Ca/Br dans l'état S₁. Ils sont présentés Figure 116.

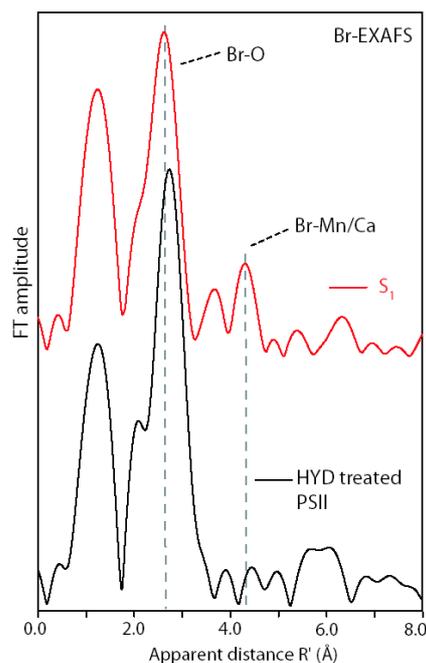


Figure 116 : Spectres Br-EXAFS d'un échantillon de PSII Ca/Br dans l'état S_1 . Un premier pic à environ 2,6 Å est attribué à une liaison Br-O et un deuxième pic à environ 4,5 Å à une liaison Br-Mn/Ca. La concentration en Br^- dans le milieu est minimale (Pushkar, Yano, Long, Sauer, Ishida, Lai, Boussac, Yachandra, En préparation)

Cette étude détecte la présence d'un ion Br^- à une distance d'environ 4,5 Å du cluster de manganèse. Ce résultat est en accord avec une étude EXAFS²¹⁷ réalisée sur du PSII d'épinards dans l'état S_1 où le Cl^- a été enlevé par dialyse, puis substitué par du Br^- au nombre de 1/PSII, il a été suggéré qu'un ion Br^- se trouve à une distance d'environ 5 Å d'un ion métallique qui peut être soit le Ca, soit le Mn.

Les deux autres sites détectés par cristallographie à 6-7 Å sont de toute façon trop éloignés pour être détectés par EXAFS. L'hypothèse suivante est envisageable : il existerait uniquement deux sites de fixation, un site de haute affinité (détecté par EXAFS car la concentration en Br^- est très faible dans le milieu et par cristallographie), et un site de faible affinité (uniquement détecté par cristallographie). La différence entre les distances estimées peut s'expliquer soit par un effet des rayons X utilisés en cristallographie, soit par une mobilité d'un des deux sites de fixation. En effet, la fixation d'un halogénure sur le site de fixation de faible affinité, lorsqu'on augmente la concentration en halogénure, pourrait provoquer l'éloignement du site de fixation de forte affinité déjà rempli.

Pour clarifier la situation, il faudrait reconstituer le spectre EXAFS théorique du site de fixation de haute affinité connaissant ses acides aminés périphériques d'après la structure cristallographique. Si l'on arrive à mettre en évidence l'existence d'un pic à 4,5 Å, on pourrait

l'attribuer non pas à une distance Br-Mn/Ca, mais à une distance Br-C/N/O, ce qui expliquerait la non concordance des distances avec la cristallographie. Sinon, notre hypothèse serait à considérer.

Nous pouvons maintenant discuter de l'effet de l'iodure pour tenter d'expliquer son mécanisme d'inhibition, dans l'hypothèse où il existe un site de haute affinité et un site de faible affinité aux halogénures. L'effet observé avec l'iodure (baisse d'activité de 50-60 % d'un échantillon qui a d'abord été repris dans un tampon sans halogénure, puis incubé durant toute une nuit dans un tampon contenant 60 mM de I⁻) peut correspondre à plusieurs situations :

- 1) Suite au traitement, le site de haute affinité contient toujours du Cl⁻ et I⁻ vient remplir uniquement le site de fixation de faible affinité laissé vide suite au passage dans le tampon sans halogénure. Or, au vu des cinétiques ralenties sur cet échantillon, le site de forte affinité est forcément rempli après l'incubation durant la nuit. Cette hypothèse est donc inenvisageable.
- 2) Par un mécanisme d'inhibition non compétitive, la fixation de I⁻ sur un site spécifique viendrait modifier la fixation du Cl⁻ sur son propre site. Cette hypothèse est en contradiction avec les résultats de Kawakami et al. qui ont montré que les sites Br⁻ et I⁻ étaient localisés à la même position, même si seuls les sites de faible affinité ont été détectés.
- 3) I⁻ prend la place du Cl⁻ présent dans le site de fixation de forte affinité, en plus du remplissage des sites vides. Cette solution paraît la plus probable.

Il est étonnant que les effets des échanges Ca²⁺/Sr²⁺ et Cl⁻/Br⁻ soient additifs. Cela suggère que les propriétés physicochimiques soit du Ca²⁺, soit du Sr²⁺ dépendent de la présence du Cl⁻ ou du Br⁻. La présence de l'un modulerait les propriétés de l'autre. Il serait sinon difficile d'expliquer pourquoi l'échange Cl⁻/Br⁻ du PSII Sr/Br entraîne un ralentissement encore plus grand de l'étape limitante introduite par le Sr²⁺ seul.

Dans l'un des modèles du mécanisme d'oxydation de l'eau^{68,218}, le niveau d'oxydation des Mn dans l'état S₄ est proposé être (Mn^V, (Mn^{IV})₃). Une des molécules d'eau substrat est lié sous forme d'un dérivé oxo au Mn^V. A cause du haut degré d'oxydation du Mn^V et de la présence des trois autres Mn^{IV} dans le cubane, l'oxo est très déficient en électron, c'est à dire que c'est un électrophile tellement fort qu'il peut faciliter une attaque nucléophile de la part d'un oxygène provenant de la seconde molécule d'eau substrat qui se trouve dans la sphère de

coordination du Ca^{2+} . Un autre modèle très proche remplace le $\text{Mn}^{\text{V}} = \text{O}$ par un radical $\text{Mn}^{\text{IV}} - \text{oxy}^{\cdot}$ ²¹⁹.

La baisse d'activité observée après l'échange $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ pourrait être liée à la plus grande acidité de Lewis de aqua- Sr^{2+} par rapport à aqua- Ca^{2+} . La liaison d'un Br^- au Ca^{2+} et Sr^{2+} pourrait aussi augmenter l'acidité de Lewis du Ca^{2+} et Sr^{2+} liés à l'eau et expliquer les effets additifs des deux échanges biosynthétiques.

D'après l'observation que nous avons faite sur les vitesses d'échange des molécules d'eau substrat, nous pouvons raisonnablement penser que dans ce modèle, la molécule d'eau qui s'échange lentement est la molécule qui est liée au Ca^{2+} (car la phase lente est très affectée par la substitution) et la molécule d'eau qui s'échange rapidement est celle qui subit l'attaque nucléophile.

Une autre alternative est que les effets de l'échange Cl^-/Br^- pourraient provenir d'un effet longue distance de l'halogénure, hypothèse qui est en accord avec la localisation des sites de fixation au Cl^- dans les structures cristallographiques. Plusieurs effets longue distance ont pareillement été observés lors de l'échange $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$, comme la baisse d'affinité du cytochrome *c550*, la baisse de la constante d'équilibre de $\text{Q}_\text{A}^\bullet\text{Q}_\text{B} \leftrightarrow \text{Q}_\text{A}\text{Q}_\text{B}^\bullet$, et un changement dans l'environnement du fer non-hème. Ces effets pourraient être mis en corrélation avec l'effet du retrait du Ca^{2+} sur le potentiel redox du couple $\text{Q}_\text{A}^\bullet/\text{Q}_\text{A}$. Tous ces effets longue distance pourraient inclure une modification du réseau de liaisons hydrogène autour du cluster de Mn_4Ca , qui viendrait ralentir certaines étapes du transfert d'électrons. Cet effet longue distance est en accord avec la localisation des sites de fixation par rapport aux canaux mis en évidence dans la structure⁵⁹. Les deux sites de fixation sont proches de résidus (D2-Lys 317 et CP43-Glu 354) formant partie de canaux supposés transporter les protons.

Cette théorie est cependant contredite par deux autres résultats : 1) Bien que l'échange biochimique $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ affecte très fortement plusieurs modes infrarouges dans la région de fréquence des carboxylates, la déplétion en Cl^- est silencieuse dans cette région spectrale⁴². 2) Murray et al. ont mené une étude²²⁰ pour détecter les cavités hydrophobes au sein du PSII en introduisant du xénon sous pression dans des cristaux de PSII. Aucun site de fixation au xénon n'a été identifié dans les canaux précédemment proposés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ¹ I.L. McConnell, Substrate water binding and oxidation in Photosystem II, *Photosynth. Res.*, **2008**, 98, 261-276.
- ² J. Barber, The engine of life Photosystem II, *The biochemist*, August **2006**, 7-11.
- ³ J. Whitmarsh and Govindjee, Photosystem II, *Encyclopedia of life sciences*, **2002**, McMillan Publishers Ltd.
- ⁴ Y. Nicolet, C. Piras, P. Legrand, E. C. Hatchikian and J. C. Fontecilla-Camps, Desulfovibrio desulfuricans iron hydrogenase: the structure shows unusual coordination to an active site Fe binuclear center, *Structure*, **1999**, 7, 13-23.
- ⁵ F. Leroux, S. Dementin, B. Burlat, L. Cournac, A. Volbeda, S. Champ, L. Martin, B. Guigliarelli, P. Bertrand, J. Fontecilla-Camps, M. Rousset and C. Léger, Experimental approaches to kinetics of gas diffusion in hydrogenase, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **2008**, 105, 11188-11193.
- ⁶ G. Renger and T. Renger, Photosystem II: The machinery of photosynthetic water splitting, *Photosynth. Res.*, **2008**, 95, 53-80.
- ⁷ J. Barber, P680 : What is it and where is it ?, *Bioelectrochem.*, **2002**, 55, 135-138.
- ⁸ T. Takahashi, N. Inoue-Kashino, S. I. Ozawa, Y. Takahashi, Y. Kashino and K. Satoh, Photosystem II complex in vivo is a monomer, *J. Biol. Chem.*, **2009**, 284, 15598-15606.
- ⁹ K.N. Ferreira, T.M. Iverson, K. Maghlaoui, J. Barber and S. Iwata, Architecture of the Photosynthetic Oxygen-Evolving Center, *Science*, **2004**, 303, 1831-1838.
- ¹⁰ B. Loll, J. Kern, W. Saenger, A. Zouni and J. Biesiadka, Towards complete cofactor arrangement in the 3,0 Å resolution structure of Photosystem II, *Nature*, **2005**, 438, 1040-1044.
- ¹¹ A. Guskov, J. Kern, A. Gabdulkhakov, M. Broser, A. Zouni and W. Saenger, Cyanobacterial photosystem II at 2,9 Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2009**, 16, 334-342.
- ¹² I. Enami, S. Yoshihara, A. Tohri, A. Okumura, H. Ohta and J.R. Shen, Cross-Reconstitution of Various Extrinsic Proteins and Photosystem II Complexes from Cyanobacteria, Red Algae and Higher Plants, *Plant Cell Physiol.*, **2000**, 41, 1354-1364.
- ¹³ A.W. Ruthford and A. Boussac, Water Photolysis in Biology, *Science*, **2004**, 303, 1782-1784.
- ¹⁴ G. Renger and T. Renger, Photosystem II: The machinery of photosynthetic water splitting, *Photosynth. Res.*, **2008**, 98, 53-80.

-
- ¹⁵ M.Y. Okamura, M.L. Paddock, M.S. Graige and G. Feher, Proton and electron transfer in bacterial reaction centers, *Biochim. Biophys. Acta*, **2000**, 1458, 148–163.
- ¹⁶ C.A. Wraight, Proton and electron transfer in the acceptor quinone complex of photosynthetic reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*, *Front. Biosci.*, **2004**, 9, 309–337.
- ¹⁷ H. Suzuki, M. Nagasaka, M. Sugiura and T. Noguchi, Fourier transform infrared spectrum of the secondary quinone electron acceptor Q(B) in photosystem II, *Biochemistry*, **2005**, 44, 11323–11328.
- ¹⁸ B. Kok, B. Forbush and M. McGloin, Cooperation of charges in photosynthetic oxygen evolution: I. A linear four step mechanism, *Photochem. Photobiol.*, **1970**, 11, 457-475.
- ¹⁹ A. Telfer, What is β -carotene doing in the photosystem II reaction centre ?, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **2002**, 357, 1431-1440.
- ²⁰ C.A. Tracewell and G.W. Brudvig, Characterization of the secondary electron-transfer pathway intermediates of photosystem II containing low-potential cytochrome b559, *Photosynth. Res.*, **2008**, 98, 189-197.
- ²¹ P. Faller, C. Fufezan and A.W. Rutherford, Side-path electron donors: cytochrome *b559*, chlorophyll Z and β -carotene. In: T.J. Wydrzynski and K. Satoh, Editors, *Photosystem II: The Light-Driven Water: Plastoquinone Oxidoreductase*, Springer, The Netherlands, **2005**, 347-365.
- ²² J.L. Hugues, A.W. Rutherford, M. Sugiura and E. Krausz, Quantum efficiency distributions of photo-induced side-pathway donor oxidation at cryogenic temperature in photosystem II, *Photosynth. Res.*, **2008**, 98, 199-206.
- ²³ H. Bao, C. Zhang, K. Kawakami, Y. Ren, J.R. Shen and J. Zhao, Acceptor side effects on the electron transfer at cryogenic temperatures in intact photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta*, **2008**, 1777, 1109-1115.
- ²⁴ A.W. Rutherford, A. Boussac and P. Faller, The stable tyrosyl radical in Photosystem II: why D?, *Biochim. Biophys. Acta*, **2004**, 1655, 222-230.
- ²⁵ S. Styring and A.W. Rutherford, In the oxygen evolving complex of photosystem II the S_0 state is oxidised to the S_1 state by D^+ (Signal II slow), *Biochemistry*, **1987**, 26, 2401–2405.
- ²⁶ G.T. Babcock, B.A. Barry, R.J. Debus, C.W. Hoganson, M. Atamian, L. McIntosh, I. Sithole and C.F. Yocum, Water oxidation in Photosystem II: from radical chemistry to multielectron chemistry, *Biochemistry*, **1989**, 28, 9557–9565.
- ²⁷ B.A. Diner, E. Schlodder, P.J. Nixon, W.J. Coleman, F. Rappaport, J. Lavergne, W.F.J. Vermaas and D.A. Chisholm, Site-Directed Mutations at D1-His198 and D2-His197 of Photosystem II in *Synechocystis* PCC 6803 : Sites of Primary Charge Separation and Cation and Triplet Stabilization, *Biochemistry*, **2001**, 40, 9265-9281.

-
- ²⁸ J.M. Peloquin, K.A. Campbell, D.W. Randall, M.A. Evanchik, V.L. Pecoraro, W.H. Armstrong and R.D. Britt, ⁵⁵Mn ENDOR of the S₂ state multiline EPR signal of Photosystem II: implications on the structure of the tetranuclear Mn cluster, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 10926-10942.
- ²⁹ V.K. Yachandra, K. Sauer and M.P. Klein, Manganese cluster in photosynthesis: where plants oxidize water to dioxygen, *Chem. Rev.*, **1996**, 96, 2927-2950.
- ³⁰ J. Yano, J. Kern, K.-D. Irrgang, M. J. Latimer, U. Bergmann, P. Glatzel, Y. Pushkar, J. Biesiadka, B. Loll, K. Sauer, J. Messinger, A. Zouni and V. K. Yachandra, From the Cover: X-ray damage to the Mn₄Ca complex in single crystals of photosystem II: A case study for metalloprotein crystallography, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **2005**, 102, 12047-12052.
- ³¹ J. Yano, J. Kern, K. Sauer, M.J. Latimer, Y. Pushkar, J. Biesiadka, B. Loll, W. Saenger, J. Messinger, A. Zouni and V.K. Yachandra, *Science*, **2006**, 314, 821-825.
- ³² E. M. Siegbahn and M. Lundberg, The mechanism for dioxygen formation in PSII studied by quantum chemical methods, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2005**, 4, 1035-1043.
- ³³ M. A. Strickler, W. Hillier and R.J. Debus, No evidence from FTIR difference spectroscopy that glutamate-189 of the D1 polypeptide ligates a Mn ion that undergoes oxidation during the S₀ to S₁, S₁ to S₂, or S₂ to S₃ transitions in photosystem II, *Biochemistry*, **2006**, 45, 8801–8811.
- ³⁴ Y. Kimura, N. Mizusawa, A. Ishii, S. Nakazawa and T.A. Ono, Changes in structural and functional properties of oxygen-evolving complex induced by replacement of D1-glutamate 189 with glutamine in photosystem II: Ligation of glutamate 189 carboxylate to the manganese cluster, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 37895– 37900.
- ³⁵ M.A. Strickler, L.M. Walker, W. Hillier, R.D. Britt and R.J. Debus, No evidence from FTIR difference spectroscopy that aspartate-342 of the D1 polypeptide ligates a Mn ion that undergoes oxidation during the S₀ to S₁, S₁ to S₂, or S₂ to S₃ transitions in photosystem II, *Biochemistry*, **2007**, 46, 3151– 3160.
- ³⁶ R.J. Debus, M.A. Strickler, L.M. Walker and W. Hillier, No evidence from FTIR difference spectroscopy that aspartate-170 of the D1 polypeptide ligates a manganese ion that undergoes oxidation during the S₀ to S₁, S₁ to S₂, or S₂ to S₃ transitions in photosystem II *Biochemistry*, **2005**, 44, 1367– 1374.
- ³⁷ T. Noguchi, Fourier transform infrared analysis of the photosynthetic oxygen-evolving center, *Coord. Chem. Rev.*, **2008**, 252, 336-346.
- ³⁸ R.J. Debus, Protein ligation of the photosynthetic oxygen-evolving center, *Coord. Chem. Rev.*, **2008**, 252, 244-258.
- ³⁹ H.A. Chu, W. Hillier and R.J. Debus, Evidence that the C-terminus of the D1 polypeptide of photosystem II is ligated to the manganese ion that undergoes oxidation during the S-1 to S-2 transition: An isotope-edited FTIR study, *Biochemistry*, **2004**, 43, 3152-3166.

-
- ⁴⁰ Y. Kimura, N. Mizusawa, T. Yamanari, A. Ishii and T.A. Ono, Structural changes of D1 C-terminal alpha-carboxylate during S-state cycling in photosynthetic oxygen evolution, *J. Biol. Chem.*, **2005**, 280, 2078-2083.
- ⁴¹ M.A. Strickler, L.M. Walker, W. Hillier and R.J. Debus, Evidence from Biosynthetically Incorporated Strontium and FTIR Difference Spectroscopy that the C-terminus of the D1 Polypeptide of Photosystem II Does Not Ligand Calcium, *Biochemistry*, **2005**, 44, 8571-8577.
- ⁴² H. Suzuki, Y. Taguchi, M. Sugiura, A. Boussac and T. Noguchi, Structural perturbation of the carboxylate ligands to the manganese cluster upon $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ exchange in the S-state cycle of photosynthetic oxygen evolution as studied by flash-induced FTIR difference spectroscopy, *Biochemistry*, **2006**, 45, 13454-13464.
- ⁴³ G.C. Dismukes and Y. Siderer, EPR spectroscopic observations of a manganese center associated with water oxidation in spinach chloroplasts, *FEBS Lett.*, **1980**, 121, 78-80.
- ⁴⁴ O. Hansson and L.E. Andreasson, EPR-detectable magnetically interacting manganese ions in the photosynthetic oxygen-evolving system after continuous illumination, *Biochim Biophys Acta*, **1982**, 679, 261-268.
- ⁴⁵ J. Messinger, J.H.A. Nugent and M.C.W. Evans, Detection of an EPR multiline signal for the S_0 state in Photosystem II, *Biochemistry*, **1997**, 36, 11055-11060.
- ⁴⁶ K.A. Ahrling, S. Peterson and S. Styring, The S_0 state EPR signal from the Mn cluster arises from an isolated ground state. In: Garab G (ed) Photosynthesis: mechanisms and effects. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, **1998**, 1291-1294.
- ⁴⁷ A. Boussac, M. Sugiura, A.W. Rutherford and P. Dorlet, Complete EPR Spectrum of the S_3 -state of the oxygen-evolving Photosystem II, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 5050-5051.
- ⁴⁸ S.L. Dexheimer and M.P. Klein, Detection of a paramagnetic intermediate in the S_1 state of the photosynthetic oxygen-evolving complex, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 2821-2826.
- ⁴⁹ T. Yamauchi, H. Mino, T. Matsukawa, A. Kawamori and T. Ono, Parallel polarization electron paramagnetic resonance studies of the S-1-state manganese cluster in the photosynthetic oxygen-evolving system, *Biochemistry*, **1997**, 36, 7520-7526.
- ⁵⁰ K.A. Campbell, J.M. Peloquin, D.P. Pham, R.J. Debus and R.D.J. Britt, Parallel polarization EPR detection of an S-1-state "multiline" EPR signal in photosystem II particles from *Synechocystis* sp. PCC 6803, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 447-448.
- ⁵¹ S.A. Styring and A.W. Rutherford, The microwave power saturation of SII slow varies with the redox state of the oxygen-evolving complex in Photosystem II, *Biochemistry*, **1988**, 27, 4915-4923.
- ⁵² J. Yano and V.K. Yachandra, Oxidation state changes of the Mn_4Ca cluster in Photosystem II, *Photosynth. Res.*, **2007**, 92, 289-303.

-
- ⁵³ T. Roelofs, W. Liang, M. J. Latimer, R.M. Cinco, A. Rompel, J.C. Andrews, K. Sauer, V.K. Yachandra and M.P. Klein, Oxidation states of the manganese cluster during the flash-induced S-state cycle of the photosynthetic oxygen-evolving complex, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1996**, 92, 3335-3340.
- ⁵⁴ J. Messinger, J.H. Robblee, U. Bergmann, C. Fernandez, P. Glatzel, H. Visser, R.M. Cinco, K.L. McFarlane, E. Bellacchio, S.A. Pizarro, S.P. Cramer, K. Sauer, M.P. Klein and V.K. Yachandra, Absence of Mn-centered oxidation in the S₂ to S₃ transition: implications for the mechanism of photosynthetic water oxidation, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 7804–7820.
- ⁵⁵ T. Ono, T. Noguchi, Y. Inoue, M. Kusuknoki, T. Matsushita and H. Oyanagi, X-ray Detection of the Period-Four Cycling of the Manganese Cluster in Photosynthetic Water Oxidizing Enzyme, *Science*, **1992**, 258, 1335-1337.
- ⁵⁶ L. Izzulino, J. Dittmer, W. Dorner, W. Meyer-Klaucke and H. Dau, X-ray Absorption Spectroscopy on Layered Photosystem II Membrane Particles Suggests Manganese-Centered Oxidation of the Oxygen-Evolving Complex for the S₀-S₁, S₁-S₂, and S₂-S₃ Transitions of the Water Oxidation Cycle, *Biochem.*, **1998**, 37, 17112-17119.
- ⁵⁷ T. Wydrzynski, W. Hillier and J. Messinger, On the functional significance of substrate accessibility in the photosynthetic water oxidation mechanism, *Physiol. Plant*, **1996**, 96, 342-350.
- ⁵⁸ A.W. Rutherford, Photosystem II, the water-splitting enzyme, *Trends Biochem. Sci.*, **1989**, 14, 227-232.
- ⁵⁹ J. Murray and J. Barber, Structural characteristics of channels and pathways in photosystem II including the identification of oxygen channel, *J. Struct. Biol.*, **2007**, 159, 228-237.
- ⁶⁰ F.M. Ho and S. Styring, Access channels and methanol binding site to the CaMn₄ cluster in Photosystem II based on solvent accessibility simulations, with implications for substrate water access, *Biochim. Biophys. Acta*, **2007**, 1777, 140-153.
- ⁶¹ J.H. Su, W. Lubitz and J. Messinger, Probing mode and site of substrate water binding to the oxygen-evolving complex in the S₂ state of photosystem II by ¹⁷O-HYSCORE spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 786-787.
- ⁶² G. Hendry and T. Wydrzynski, ¹⁸O Isotope Exchange Measurements Reveal that Calcium Is Involved in the Binding of One Substrate-Water Molecule to the Oxygen-Evolving Complex in Photosystem II, *Biochemistry*, **2003**, 42, 6209-6217.
- ⁶³ J.P. McEvoy and G.W. Brudvig, Water-splitting chemistry of photosystem II, *Chem. Rev.*, **2006**, 106, 4455-4483.
- ⁶⁴ W. Hillier and J. Messinger, In Photosystem II: The Light-Driven Water: Plastoquinone Oxidoreductase.
- ⁶⁵ T. Wydrzynski and K. Satoh, Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, **2005**, pp 567–608.

-
- ⁶⁶ W. Hillier and T. Wydrzynski, The affinities for the two substrate water binding sites in the O(2) evolving complex of photosystem II vary independently during S-state turnover, *Biochemistry*, **2000**, 39, 4399-4405.
- ⁶⁷ J. S. Vrettos, J. Limburg and G. W. Brudvig, Mechanism of photosynthetic water oxidation: combining biophysical studies of photosystem II with inorganic model chemistry, *Biochim. Biophys. Acta*, **2001**, 1503, 229-245.
- ⁶⁸ V.L. Pecoraro, M.J. Baldwin, M.T. Caudle, W.Y. Hsieh and N.A. Law, A proposal for water oxidation in photosystem II, *Pure Appl. Chem.*, **1998**, 70, 925-929.
- ⁶⁹ C.F. Fowler, Proton evolution from Photosystem II stoichiometry and mechanistic considerations, *Biochim. Biophys. Acta*, **1977**, 462, 414– 421.
- ⁷⁰ V. Forster and W. Junge, Stoichiometry and kinetics of proton release upon photosynthetic water oxidation, *Photochem. Photobiol.*, **1985**, 41, 183–190.
- ⁷¹ F. Rappaport and J. Lavergne, Proton Release during Successive Oxidation Steps of the Photosynthetic Water Oxidation Process: Stoichiometries and pH dependence, *Biochemistry*, **1991**, 30, 10004-10012.
- ⁷² J. Lavergne and W. Junge, Proton release during the redox cycle of the water oxidase, *Photosynth. Res.*, **1993**, 38, 279– 296.
- ⁷³ W. Junge, , M. Haumann, , R. Ahlbrink., A. Mulkidjanian and J. Clausen, Electrostatics and proton transfer in photosynthetic water oxidation, *J. Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B* **2002**, 357, 1407– 1417.
- ⁷⁴ F. Rappaport and J. Lavergne, Coupling of electron and proton transfer in the photosynthetic water oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **2001**, 1503, 246– 259.
- ⁷⁵ E. Schlodder and H. T. Witt, Stoichiometry of proton release from the catalytic center in photosynthetic water oxidation - Reexamination by a glass electrode study at pH 5.5-7.2, *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 30387– 30392.
- ⁷⁶ G. Renger, Mechanistic aspects of photosynthetic water cleavage, *Photosynthetica*, **1987**, 21, 203– 224.
- ⁷⁷ H. Suzuki, M. Sugiura and T. Noguchi, Monitoring Proton Release during Photosynthetic Water Oxidation in Photosystem II by Means of Isotope-Edited Infrared Spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 7849-7857.
- ⁷⁸ A. Zouni, H.T. Witt, J. Kern, P. Fromme, N. Krauss, W. Saenger and P. Orth, Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 angstrom resolution, *Nature*, **2001**, 409, 739-743.

-
- ⁷⁹ N. Kamiya and J.R. Shen, Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7 angstrom resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2003**, 100, 98-103.
- ⁸⁰ J.S. Vrettos and G.W. Brudvig, Water oxidation chemistry of photosystem II, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **2002**, 357, 1395-1405.
- ⁸¹ K.L. Westphal, N. Lydakis-Simantiris, R.I. Cukier and G. Babcock, Effects of Sr²⁺-Substitution on the Reduction Rates of Y_z[•] in PSII Membranes – Evidence for Concerted Hydrogen-Atom Transfer in Oxygen Evolution, *Biochemistry*, **2000**, 39, 16220-16229.
- ⁸² A. Boussac and A.W. Rutherford, Does the formation of the S₃-state in Ca²⁺-depleted Photosystem II correspond to an oxidation of Tyrosine Z detectable by cw-EPR at room temperature?, **1995**, *Biochim. Biophys. Acta*, 1230, 195–201.
- ⁸³ Y. Pushkar, J. Yano, K. Sauer, A. Boussac and T. Noguchi, Structural changes in the Mn₄Ca cluster and the mechanism of photosynthetic water splitting, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2008**, 105, 1879-1884.
- ⁸⁴ J. Kargul, K. Maghlaoui, J.W. Murray, Z. Deak, A. Boussac, A.W. Rutherford, I. Vass and J. Barber, Purification, crystallization and X-ray diffraction analyses of the *T-elongatus* PSII core dimer with strontium replacing calcium in the oxygen-evolving complex, *Biochim. Biophys. Acta*, **2007**, 1767, 404-413.
- ⁸⁵ K. Kawakami, Y. Umena, N. Kamiya and J.R. Shen, Location of chloride and its possible functions in oxygen-evolving photosystem II revealed by X-ray crystallography, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **2009**, 21, 8567-8572.
- ⁸⁶ S.R. Cooper, G.C. Dismukes, M.P. Klein and M. Calvin, Mixed valence interactions in di-μ-oxo bridged manganese complexes. Electron paramagnetic resonance and magnetic susceptibility studies, *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, 100, 7248-7252.
- ⁸⁷ A. Boussac and A.W. Rutherford, Nature of the inhibition of the oxygen-evolving enzyme of photosystem II induced by sodium chloride washing and reversed by the addition of calcium(2+) or strontium(2+), *Biochemistry*, **1988**, 27, 3476-3483.
- ⁸⁸ J.L. Zimmermann and A.W. Rutherford, Electron-paramagnetic-res studies of the oxygen-evolving enzyme of Photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta*, **1984**, 767, 160-167.
- ⁸⁹ W.F. Beck, J.C. de Paula and G.W. Brudvig, Ammonia binds to the manganese site of the oxygen-evolving complex of photosystem II in the S₂ state, *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 4018-4022.
- ⁹⁰ A. Boussac, J.J. Girerd and A.W. Rutherford, Conversion of the Spin State of the Manganese Complex in Photosystem II Induced by Near-Infrared Light, *Biochemistry*, **1996**, 35, 6984-6989.
- ⁹¹ A. Boussac and A.W. Rutherford, Comparative study of the g=4.1 EPR signals in the S-2 state of photosystem II, *Biochim. Biophys. Act*, **2000**, 1457, 145-156.

-
- ⁹² A. Boussac, S. Un, O. Horner and A.W. Rutherford, High-spin states ($S \geq 5/2$) of the photosystem II manganese complex, *Biochemistry*, **1998**, 37, 4001-4007.
- ⁹³ A. Boussac, H. Kuhl, S. Un, M. Rogner and A.W. Rutherford, Effect of near-infrared light on the S-2-state of the manganese complex of photosystem II from *Synechococcus elongates*, *Biochemistry*, **1998**, 37, 8995-9000.
- ⁹⁴ J. Messinger, J.H.A. Nugent and M.C.W. Evans, Detection of an EPR multiline signal for the S-0 state in photosystem II, *Biochemistry*, **1997**, 36, 11055-11060.
- ⁹⁵ J. Messinger, J.H. Robblee, W.O. Yu, K. Sauer, V.K Yachandra and M.P. Klein, The S-0 state of the oxygen-evolving complex in photosystem II is paramagnetic: Detection of EPR multiline signal, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 11349-11350.
- ⁹⁶ A. Boussac, H. Kuhl, E. Ghibaudi, M. Rogner and A.W. Rutherford, Detection of an electron paramagnetic resonance signal in the S-0 state of the manganese complex of photosystem II from *Synechococcus elongates*, *Biochemistry*, **1999**, 38, 11942-11948.
- ⁹⁷ S. L. Dexheimer and M. P. Klein, Detection of a paramagnetic intermediate in the S₁ state of the photosynthetic oxygen-evolving complex, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 2821-2826.
- ⁹⁸ T. Yamauchi, H. Mino, T. Matsukawa, A. Kawamori and T.A. Ono, Parallel Polarization Electron Paramagnetic Resonance Studies of the S₁-State Manganese Cluster in the Photosynthetic Oxygen-Evolving System, *Biochemistry*, **1997**, 36, 7520-7526.
- ⁹⁹ D.F. Ghanotakis, G.T. Babcock and C.F. Yocum, Calcium reconstitutes high rates of oxygen evolution in polypeptide depleted Photosystem II preparations, *FEBS Lett.*, **1984**, 167, 127-130.
- ¹⁰⁰ M. Miyao and N. Murata, Calcium ions can be substituted for the 24 kDa polypeptide in photosynthetic oxygen evolution, *FEBS Lett.*, **1984**, 168, 118-120.
- ¹⁰¹ M. Miyao and N. Murata, Light-dependent inactivation of photosynthetic oxygen evolution during NaCl treatment of photosystem-II particles – the role of the 24 kDa protein, *Photosynth. Res.*, **1984**, 168, 118-120.
- ¹⁰² A. Boussac and A.W. Rutherford, Calcium binding to the oxygen evolving enzyme varies with the redox state of the Mn cluster, *FEBS Lett.*, **1988**, 236, 22809-22819.
- ¹⁰³ K. Kalosaka, W.F. Beck, G.W. Brudvig and G.M. Cheniae, In : Blatscheffsky M (ed), Current research in photosynthesis, vol I., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, **1990**, 721-724.
- ¹⁰⁴ T.A. Ono and Y. Inoue, Discrete extraction of the Ca atom functional for O₂ evolution in higher plant photosystem II by a simple low pH treatment, *FEBS Lett.*, **1988**, 227, 147-152.
- ¹⁰⁵ C. Jegerschöld, A.W. Rutherford, T.A. Mattioli, M. Crimi and R. Bassi, Calcium Binding to the Photosystem II Subunit CP29, *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275, 12781 – 12788.

-
- ¹⁰⁶ R. Croce, J. Breton and R. Bassi, Conformational Changes Induced by Phosphorylation in the CP29 Subunit of Photosystem II, *Biochemistry*, **1996**, 35, 11142–11148.
- ¹⁰⁷ G.A. Ananyev, L. Zaltsman, C. Vasko and G.C. Dismukes, The inorganic biochemistry of photosynthetic oxygen evolution/water oxidation, *Biochim. Biophys. Acta*, **2001**, 1503, 52-68.
- ¹⁰⁸ J. Dasgupta, G.M. Ananyev and G.C. Dismukes, Photoassembly of the water-oxidizing complex in Photosystem II, *Coord. Chem. Rev.*, **2008**, 252, 347-360.
- ¹⁰⁹ A. Boussac and A.W. Rutherford, The involvement of Ca²⁺ in the Ca²⁺-effect on Photosystem II oxygen evolution, *Photosynth. Res.*, 1992, 32, 207-209.
- ¹¹⁰ A. Boussac, F. Rappaport, P. Carrier, J.M. Verbavatz, R. Gobin, D. Kirilovsky, A.W. Rutherford and M. Sugiura, Biosynthetic Ca²⁺/Sr²⁺ Exchange in the Photosystem II Oxygen-evolving Enzyme of *Thermosynechococcus elongatus*, *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 22809-22819.
- ¹¹¹ K.V. Cammarata and G.M. Cheniae, Studies on 17,24 kD Depleted Photosystem II Membranes : I. Evidences for High and Low Affinity Calcium Sites in 17,24 kD Depleted PSII Membranes from Wheat versus Spinach, *Plant Physiol.*, **1987**, 84, 587-595.
- ¹¹² A. Boussac, B. Maison-Peteri, A.L. Etienne and C. Vernotte, Reactivation of oxygen evolution of NaCl-washed Photosystem-II particles by Ca²⁺ and/or the 24 kDa protein, *Biochim. Biophys. Acta*, **1985**, 808, 231-234.
- ¹¹³ J.R. Shen and S. Katoh, Inactivation and Calcium-Dependent Reactivation of Oxygen Evolution in Photosystem II Preparations Treated at pH 3.0 or with High Concentrations of NaCl, *Plant Cell Physiol.*, **1991**, 32, 439-446.
- ¹¹⁴ A. Boussac, J.-L. Zimmermann and A.W. Rutherford, EPR signals from modified charge accumulation states of the oxygen-evolving enzyme in Ca²⁺-deficient photosystem II, *Biochemistry*, **1989**, 28, 8984-8989.
- ¹¹⁵ A. Boussac, J.L. Zimmermann, A.W. Rutherford and J. Lavergne, Histidine oxidation in the oxygen-evolving photosystem-II enzyme, *Nature*, **1990**, 347, 303–306.
- ¹¹⁶ C. Berthomieu et A. Boussac, Histidine oxidation in the S₂ to S₃ transition probed by FTIR difference spectroscopy in the Ca(2+)-depleted photosystem II: comparison with histidine radicals generated by UV irradiation, *Biochemistry*, **1995**, 34, 1542-1548.
- ¹¹⁷ A. Boussac, P. Sétif and A.W. Rutherford, Inhibition of Tyrosine Z Photooxidation after Formation of the S₃ State in Ca²⁺-Depleted and Cl⁻ Depleted Photosystem II, *Biochemistry*, **1992**, 31, 1224-1234.
- ¹¹⁸ S. Un, A. Boussac and M. Sugiura, Characterization of the Tyrosine-Z Radical and Its Environment in the Spin-Coupled S₂Tyr_Z⁻ State of Photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus*, *Biochemistry*, **2007**, 46, 3138-3150.

-
- ¹¹⁹ X.S. Tang, D.W. Randall D.A. Force, B.A. Diner and R.D. Britt, Manganese-Tyrosine Interaction in the Photosystem II Oxygen-Evolving Complex, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 7638-7639.
- ¹²⁰ S. Styring, Y. Feyziyev, F. Mamedov, W. Hillier and G.T. Babcock, pH dependence of the donor side reactions in Ca²⁺-depleted photosystem II, *Biochemistry*, **2003**, 42, 6185-6192.
- ¹²¹ A. Boussac and A.W. Rutherford, S-state formation after depletion in the photosystem II oxygen- evolving complex, *Chem. Scripta*, **1988**, 28A, 123-126.
- ¹²² H.A. Chu, H. Sackett and G.T. Babcock, Identification of a Mn-O-Mn cluster vibrational mode of the oxygen-evolving complex in photosystem II by low-frequency FTIR spectroscopy, *Biochemistry*, **2000**, 39, 14371-14376.
- ¹²³ Y. Kimura, K. Hasegawa and T.A. Ono, Chloride cofactor in the photosynthetic oxygen-evolving complex studied by fourier transform infrared spectroscopy, *Biochemistry*, **2002**, 41, 5844-5853.
- ¹²⁴ K. Lindberg and L.-E. Andreasson, A one-site, two-state model for the binding of anions in Photosystem II, *Biochemistry*, **1996**, 35, 14259-14267.
- ¹²⁵ T. Ono, J.-L. Zimmermann, Y. Inoue and A.W. Rutherford, EPR evidence for a modified S-state transition in chloride-depleted Photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta*, **1986**, 851, 193-201.
- ¹²⁶ P.H. Homann, Chloride relations of photosystem II membrane preparations depleted of, and resupplied with, their 17 and 23 kDa extrinsic proteins, *Photosynth. Res.*, **1988**, 15, 205-220.
- ¹²⁷ P. Van Vliet and A.W. Rutherford, Properties of the chloride-depleted oxygen-evolving complex of photosystem II studied by electron paramagnetic resonance, *Biochemistry*, **1996**, 35, 1829-1839.
- ¹²⁸ K. Lindberg, T. Vanngard and L.E. Andreasson, Studies of the slowly exchanging chloride in Photosystem II of higher plants, *Photosynth. Res.*, **1993**, 38, 401-408.
- ¹²⁹ K. Lindberg, T. Wydrzynski, T. Vanngard and L.E. Andreasson, Slow release of chloride from ³⁶Cl-labeled photosystem II membranes, *FEBS Lett.*, **1990**, 264, 153-155.
- ¹³⁰ A. Boussac, Exchange of chloride by bromide in the manganese photosystem II complex studied by cw- and pulsed-EPR, *Chem. Phys.*, **1995**, 194, 409-418.
- ¹³¹ M. Miyao and N. Murata, The Cl⁻ effect on photosynthetic oxygen evolution - Interaction of Cl⁻ with 18 kDa, 24 kDa and 33 kDa proteins, *FEBS Lett.*, **1985**, 180, 303-308.
- ¹³² P.M. Kelley and S. Izawa, The role of Cl⁻ in Photosystem II. I effects of chloride ion on Photosystem II electron transport and on hydroxylamine inhibition, *Biochim. Biophys. Acta*, **1978**, 502, 198-210.

-
- ¹³³ H. Wincencjusz, C. F. Yocum and H. J. van Gorkom, Activating anions that replace Cl⁻ in the O₂-evolving complex of photosystem II slow the kinetics of the terminal step in water oxidation and destabilize the S₂ and S₃ states, *Biochemistry*, **1999**, 38, 3719-3725.
- ¹³⁴ T. Ono, H. Nakayama, H. Gleiter, Y. Inoue and A. Kawamori, Modification of the Properties of S₂ state in Photosynthetic O₂-Evolving Center by replacement of Chloride with other anions, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1987**, 256, 618-624.
- ¹³⁵ M. Ikeuchi, H. Koike and Y. Inoue, Iodination of D1 (herbicide-binding protein) is coupled with photooxidation of ¹²⁵I associated with Cl⁻ binding site in Photosystem-II water-oxidation system, *Biochim. Biophys. Acta*, **1988**, 932, 160-169.
- ¹³⁶ P. Van Vliet, Functional properties of the oxygen evolving complex of photosystem II, 101 p., thèse, 1996.
- ¹³⁷ A. Rashid and P.H. Homann, Properties of iodide-activated photosynthetic water-oxidizing complexes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1992**, 1101, 303-310.
- ¹³⁸ P.H. Homann, Thermoluminescence properties of the S₂-state in chloride-depleted water oxidizing complexes after reconstituting treatments with various monovalent anions, *Photos. Res.*, **1993**, 38, 395-400.
- ¹³⁹ M. Ikeuchi and Y. Inoue, Specific ¹²⁵I labelling of D1 (herbicide-binding protein) An indication that D1 functions on both the donor and acceptor sides of photosystem II, *FEBS Lett.*, **1987**, 210, 71-76.
- ¹⁴⁰ Y. Takahashi, M.A. Takahashi and K. Satoh, Identification of the site of iodide photooxidation in the photosystem II reaction center complex, *FEBS Lett.*, **1986**, 208, 347-351.
- ¹⁴¹ J. L. Zimmerman and A.W. Rutherford, Electron Paramagnetic Resonance Properties of the S₂ State of the Oxygen-Evolving Complex of Photosystem II, *Biochemistry*, **1986**, 25, 4609-4615.
- ¹⁴² T. Yamaoka, K. Satoh and S. Katoh, Photosynthetic activities of a thermophilic blue-green alga, *Plant & Cell Physiol.*, **1978**, 19(6), 943-954.
- ¹⁴³ Y. Nakamura, T. Kaneko, S. Sato, M. Ikeuchi, H. Katoh, S. Sasamoto, A. Watanabe, M. Iriguchi, K. Kawashima, T. Kimura, Y. Kishida, C. Kiyokawa, M. Kohara, M. Matsumoto, A. Matsuno, N. Nakazaki, S. Shimo, M. Sugimoto, C. Takeuchi, M. Yamada and S. Tabata, Complete Genome Structure of the Thermophilic Cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, *DNA Research*, **2002**, 9, 123-130.
- ¹⁴⁴ M. Sugiura and Y. Inoue, Highly Purified Thermo-Stable Oxygen-Evolving Photosystem II Core Complex from the Thermophilic Cyanobacterium *Synechococcus elongatus* Having His-Tagged CP43, *Plant & Cell Physiol.*, **1999**, 40, 1219-1231.

-
- ¹⁴⁵ P.B. Kos, Z. Deak, O. Cheregi and I. Vass, Differential regulation of *psbA* and *psbD* gene expression, and the role of the different D1 protein copies in the cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1., *Biochim. Biophys. Acta*, **2008**, 1777, 74-83.
- ¹⁴⁶ M. Sugiura, A. Boussac, T. Noguchi and F. Rappaport, Influence of histidine-198 of the D1 subunit on the properties of the primary electron donor, P680, of photosystem II in *Thermosynechococcus elongatus*, *Biochim. Biophys. Acta*, **2008**, 1777, 331-342.
- ¹⁴⁷ P. Joliot and A. Joliot, A polarographic method for detection of oxygen production and reduction of Hill Reagent by isolated chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **1968**, 153, 625-634.
- ¹⁴⁸ M. Miyao, N. Murata, J. Lavorel, B. Maison, A. Boussa and A.L. Etienne, Effect of the 33-kDa protein on the S-state transitions in photosynthetic oxygen evolution, *Biochim. Biophys. Acta*, **1987**, 890, 151-159.
- ¹⁴⁹ J. Lavorel, Determination of the photosynthetic oxygen release time by amperometry, *Biochim. Biophys. Acta*, **1992**, 1101, 33-40.
- ¹⁵⁰ B. Noring, D. Shevela, G. Renger and J. Messinger, Effects of methanol on the S-i-state transitions in photosynthetic water-splitting, *Photos. Res.*, **2008**, 98, 251-260.
- ¹⁵¹ I. Vass, The history of photosynthetic thermoluminescence, *Photosynth. Res.*, **2003**, 76, 303-318.
- ¹⁵² J.M. Ducruet, Chlorophyll thermoluminescence of leaf discs: simple instruments and progress in signal interpretation open the way to new ecophysiological indicators, *J. Exp. Bot.*, **2003**, 54, 2419-2430.
- ¹⁵³ J.M. Ducruet and I. Vass, Thermoluminescence: experimental, *Photosynth. Res.*, **2009**, 101, 195-204.
- ¹⁵⁴ J.M. Ducruet and T. Miranda, Graphical and numerical analysis of thermoluminescence and fluorescence F0 emission in photosynthetic material, *Photosynth. Res.*, **1992**, 33, 15-24.
- ¹⁵⁵ B.G. De Grooth and H.J. Van Gorkom, External electric field effects on prompt and delayed fluorescence in chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **1981**, 635, 445-456.
- ¹⁵⁶ K. Cser and I. Vass, Radiative and non-radiative charge recombination pathways in Photosystem II studied by thermoluminescence and chlorophyll fluorescence in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803, *Biochim. Biophys. Acta*, **2007**, 1767, 233-243.
- ¹⁵⁷ F. Rappaport, M. Guergova-Kuras, P.J. Nixon, B.A. Diner and J. Lavergne, Kinetics and pathways of charge recombination in photosystem II, *Biochemistry*, **2002**, 41, 8518-8527.
- ¹⁵⁸ F. Rappaport, A. Cuni, L. Xiong, R. Sayre and J. Lavergne, Charge recombination and thermoluminescence in Photosystem II, *Biophys. J.*, **2005**, 88, 1948-1958.

-
- ¹⁵⁹ D. Béal, F. Rappaport and P. Joliot, A new high-sensitivity 10-ns time-resolution spectrophotometric technique adapted to *in vivo* analysis of the photosynthetic apparatus, *Rev. Sci. Instrum.*, **1999**, 70, 202-207.
- ¹⁶⁰ J. Lavorel, Matrix Analysis of the Oxygen Evolving System of Photosynthesis, *J. theor. Biol.*, **1976**, 57, 171-185.
- ¹⁶¹ J. Lavergne, Improved UV-visible spectra of the S-transitions in the photosynthetic oxygen-evolving system, *Biochim. Biophys. Acta*, **1991**, 1060, 175-188.
- ¹⁶² S. Styring and A.W. Rutherford, In the oxygen-evolving complex of photosystem-II the S₀ state is oxidized to the S₁ state by D⁺ (signal-II slow), *Biochemistry*, **1987**, 26, 2401-2405.
- ¹⁶³ W.F.J. Vermaas, G. Renger and G. Dohnt, The reduction of the oxygen-evolving system in chloroplasts by thylakoid components, *Biochim. Biophys. Acta*, **1984**, 764, 194-202.
- ¹⁶⁴ E. Schlodder and B. Meyer, pH dependence of oxygen evolution and reduction kinetics of photooxidized chlorophyll a_{II} (P-680) in Photosystem II particles from *Synechococcus* sp., *Biochim. Biophys. Acta*, **1987**, 890, 23-31.
- ¹⁶⁵ F. Rappaport and J. Lavergne, Coupling of electron and proton transfer in the photosynthetic water oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **2001**, 1503, 246-259.
- ¹⁶⁶ J.P. Dekker, H.J. van Gorkom, M. Brok and L. Ouweland, Optical Characterization of Photosystem II electron donors, *Biochim. Biophys. Acta*, **1984**, 764, 310-309.
- ¹⁶⁷ F. Rappaport and J. Lavergne, Charge recombination and Proton transfer in Manganese-depleted Photosystem II, *Biochemistry*, **1997**, 36, 15294-15302.
- ¹⁶⁸ M. Sugiura, F. Rappaport, K. Brettel, T. Noguchi, A.W. Rutherford and A. Boussac, Site-Directed Mutagenesis of *Thermosynechococcus elongatus* Photosystem II: The O₂-Evolving Enzyme Lacking the Redox-Active Tyrosine D, *Biochemistry*, **2004**, 43, 13549-13563.
- ¹⁶⁹ F. Rappaport, M. Blanchard-Desce and J. Lavergne, Kinetics of electron transfer and electrochromic change during the redox transitions of the photosynthetic oxygen-evolving complex, *Biochim. Biophys. Acta*, **1994**, 1184, 178-192.
- ¹⁷⁰ H. Koike, B. Hanssum, Y. Inoue and G. Renger, Temperature dependence of S-state transition in a thermophilic cyanobacterium, *Synechococcus vulcanus* Copeland measured by absorption changes in the ultraviolet region, *Biochim. Biophys. Acta*, **1987**, 893, 524-533.
- ¹⁷¹ M.R. Razeghifard and R.J. Pace, EPR Kinetic Studies of Oxygen Release in Thylakoids and PSII Membranes: A Kinetic Intermediate in the S₃ to S₀ Transition, *Biochemistry*, **1999**, 38, 1252-1257.
- ¹⁷² M. Haumann, P. Liebisch, C. Müller, M. Barra, M. Grabolle and H. Dau, Photosynthetic O₂ Formation Tracked by Time-Resolved X-Ray Experiments, *Science*, **2005**, 310, 1019-1021.

-
- ¹⁷³ J.J. Plijter, S.E. Aalbers, J.P.F. Barends, M.H. Vos and H. van Gorkom, Oxygen release may limit the rate of photosynthetic electron transport; the use of a weakly polarized oxygen cathode, *Biochim. Biophys. Acta*, **1988**, 935, 299-311.
- ¹⁷⁴ C. Fufezan, C.X. Zhang, A. Krieger-Liszkay and A.W. Rutherford, Secondary quinone in photosystem II of *Thermosynechococcus elongatus*: Semiquinone-iron EPR signals and temperature dependence of electron transfer, *Biochemistry*, **2005**, 44, 12780–12789.
- ¹⁷⁵ M.H. Vos, H.J. Van Gorkom and P.J. van Leeuwen, An electroluminescence study of stabilization reactions in the oxygen-evolving complex of Photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta*, **1991**, 1056, 27-39.
- ¹⁷⁶ C. Fufezan, C. Gross, M. Sjödin, A.W. Rutherford, A. Krieger-Liszkay and D. Kirilovsky, Influence of the redox potential of the primary quinone electron acceptor on photoinhibition in photosystem II, *J. Biol. Chem.*, **2007**, 282, 12492-12502.
- ¹⁷⁷ M. Roncel, A. Boussac, J. L. Zurita, H. Bottin, M. Sugiura, D. Kirilovsky and J.M. Ortega, Redox properties of the photosystem II cytochromes *b559* and *c550* in the cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2003**, 8, 206-216.
- ¹⁷⁸ M. Karge, K.-D. Irrgang and G. Renger, Analysis of the Reaction Coordinate of Photosynthetic Water Oxidation by Kinetic Measurements of 355 nm Absorption Changes at Different Temperatures in Photosystem II Preparations Suspended in Either H₂O or D₂O, *Biochemistry*, **1997**, 36, 8904-8913.
- ¹⁷⁹ J. Clausen and W. Junge, Detection of an intermediate of photosynthetic water oxidation, *Nature*, **2004**, 430, 480-483.
- ¹⁸⁰ J. Clausen, W. Junge, H. Dau and M Haumann, Photosynthetic water oxidation at High O₂ Backpressure Monitored by Delayed Chlorophyll Fluorescence, *Biochemistry*, **2005**, 44, 12775-12779.
- ¹⁸¹ M. Haumann, A. Grundmeier, I. Zaharieva and H. Dau, Photosynthetic water oxidation at elevated dioxygen partial pressure monitored by time-resolved X-ray absorption measurements, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2008**, 105, 17384-17389.
- ¹⁸² F. Rappaport and B.A. Diner, Primary photochemistry and energetics leading to the oxidation of the (Mn)₄Ca cluster and to the evolution of molecular oxygen in Photosystem II, *Coord. Chem. Rev.*, **2008**, 252, 259–272.
- ¹⁸³ G.T. Babcock, R.E. Blankenship and K. Sauer, Reaction kinetics for positive charge accumulation on the water side of chloroplast photosystem II, *FEBS Lett.*, **1976**, 61, 286-289.
- ¹⁸⁴ M.R. Razeghifard, C. Klughammer and R.J. Pace, Electron paramagnetic resonance kinetic studies of the S states in spinach thylakoids, *Biochemistry*, **1997**, 36, 86-92.
- ¹⁸⁵ M.R. Razeghifard and R.J. Pace, Electron paramagnetic resonance kinetic studies of the S states in spinach PSII membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1997**, 1322, 141-150.

-
- ¹⁸⁶ M.R. Razeghifard, T. Wydrzynski, R.J. Pace and R.L. Burnap, Yz. reduction kinetics in the absence of the manganese-stabilizing protein of photosystem II, *Biochemistry*, **1997**, 36, 14474-14478.
- ¹⁸⁷ Effect of Sr²⁺-Substitution on the Reduction Rates of Y_Z[•] in PSII Membranes – Evidence for Concerted Hydrogen-Atom Transfer in Oxygen Evolution, *Biochemistry*, **2000**, 39, 16220-16229.
- ¹⁸⁸ S. Isgandarova, G. Renger and J. Messinger, Functional Differences of Photosystem II from *Synechococcus elongatus* and Spinach Characterized by Flash Induced Oxygen Evolution Patterns, *Biochemistry*, **2000**, 42, 8929-8938.
- ¹⁸⁹ F.M. Hoa, S.F. Morvaridib, F. Mamedova and S. Styring, Enhancement of Y-D(center dot) spin relaxation by the CaMn₄ cluster in photosystem II detected at room temperature: A new probe for the S-cycle, *Biochim. Biophys. Acta*, **2007**, 1767, 5-14.
- ¹⁹⁰ R.J. Pace, P. Smith, R. Bramley and D. Stehlik, EPR saturation and temperature dependence studies on signals from the oxygen-evolving centre of Photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta*, **1991**, 1058, 161-170.
- ¹⁹¹ D.I Bryson, N. Doctor, R. Johnson, S. Baranov and A. Haddy, Characteristics of Iodide Activation and Inhibition of Oxygen Evolution by Photosystem II, *Biochemistry*, **2005**, 44, 7354-7360.
- ¹⁹² F. Rappaport and J. Lavergne, Thermoluminescence: theory, *Photosynth. Res.*, **2009**, 101, 205-216.
- ¹⁹³ Y. Inoue et K. Shibata, Oscillation of thermoluminescence at medium-low temperature, *FEBS Lett.*, **1978**, 85, 193-197.
- ¹⁹⁴ A. Joliot, Effect of low-temperature (-30 to -60°C) on reoxidation of photosystem II primary electron-acceptor in presence and absence of 3(34-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea, *Biochim. Biophys. Acta*, **1974**, 357, 439-448.
- ¹⁹⁵ H. Koike and Y. Inoue, Temperature dependence of the S-state transition in a thermophilic cyanobacterium measured by thermoluminescence. In: Biggens J. (ed) *Progress in Photosynthesis Research*, **1987**, pp 645-648., Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.
- ¹⁹⁶ S. Styring and A.W. Rutherford, Deactivation kinetics and temperature dependence of the S-state transitions in the oxygen-evolving system of Photosystem II measured by EPR spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta*, **1988**, 933, 378-387.
- ¹⁹⁷ A. Boussac, M. Sugiura, T.L. Lai and A.W. Rutherford, Low-temperature photochemistry in Photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* induced by visible and near-infrared light, *Phil. Trans. Roy. Soc. B*, **2008**, 363, 1203-1210.
- ¹⁹⁸ G. Bernat, F. Morvaridi, Y. Feyziyev and S. Styring, pH dependence of the four individual transitions in the catalytic S-cycle during photosynthetic oxygen evolution, *Biochemistry*, **1941**, 5830-5843.

-
- ¹⁹⁹ O. Hansson, L.E. Andreasson and T. Vanngard, Oxygen from water is coordinated to manganese in the S₂ state of photosystem II, *FEBS Lett.*, **1986**, 195, 151-154.
- ²⁰⁰ X. S. Tang, M. Sivaraja and G. C. Dismukes, Protein and substrate coordination to the manganese cluster in the photosynthetic water oxidizing complex: nitrogen 15 and proton ENDOR spectroscopy of the S₂ state multiline signal in the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongates*, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 2382-2389.
- ²⁰¹ M.C. W. Evans, A.M. Rich and J.H.A. Nugent, Evidence for the presence of a component of the Mn complex of the photosystem II reaction centre which is exposed to water in the S₂ state of the water oxidation complex, *FEBS Lett.*, **2000**, 477, 113-117.
- ²⁰² T. Noguchi and M. Sugiura, Structure of an active water molecule in the water-oxidizing complex of photosystem II as studied by FTIR spectroscopy, *Biochemistry*, **2000**, 39, 10943-10949.
- ²⁰³ T. Noguchi and M. Sugiura, Flash-Induced FTIR Difference Spectra of the Water Oxidizing Complex in Moderately Hydrated Photosystem II Core Films: Effect of Hydration Extent on S-State Transitions, *Biochemistry*, **2002**, 41, 2322-2330.
- ²⁰⁴ R. Radmer and O. Ollinger, Isotopic composition of photosynthetic O₂ flash yields in the presence of (H₂O)-O₁₈ and (HCO₃)-O₁₈, *FEBS Lett.*, **1980**, 110, 57-61.
- ²⁰⁵ R. Radmer and O. Ollinger, Do the higher oxidation-states of the photosynthetic O₂-evolving system contain bound H₂O, *FEBS Lett.*, **1986**, 195, 285-289.
- ²⁰⁶ K.P. Bader, G. Renger and G.H. Schmid, A mass spectrometric analysis of the water-splitting reaction, *Photosynth. Res.*, **1993**, 38, 355-361.
- ²⁰⁷ K. Beckmann, J. Messinger, M.R. Badger, T. Wydrzynski and W. Hillier, On-line mass spectrometry: membrane inlet sampling, *Photosynth. Res.*, **2009**, Online.
- ²⁰⁸ V.L. Pecoraro, Structural proposals for the manganese-centers of the oxygen-evolving complex – an inorganic chemists perspective, *Photochem. Photobiol.*, **1988**, 48, 249-264.
- ²⁰⁹ J. Messinger, M. Badger and T. Wydrzynski, Detection of one slowly exchanging substrate water molecule in the S₃ state of Photosystem II, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1995**, 92, 3209-3213.
- ²¹⁰ W. Hillier, J. Messinger and T. Wydrzynski, Kinetic Determination of the Fast Exchanging Substrate Water Molecule in the S₃ State of Photosystem II, *Biochemistry*, **1998**, 37, 16908-16914.
- ²¹¹ W. Hillier and T. Wydrzynski, Substrate water interactions within the Photosystem II oxygen evolving complex, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2004**, 6, 4882-4889.
- ²¹² W. Hillier, G. Hendry, R.L. Burnap and T. Wydrzynski, Substrate water exchange in photosystem II depends on the peripheral proteins, *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 46917-46924.

-
- ²¹³ R. Tagore, R.H. Crabtree, G.W. Brudvig, Distinct mechanisms of bridging-oxo exchange in di- μ -O dimanganese complexes with and without water-binding sites: implications for water binding in the O(2)-evolving complex of photosystem II, *Inorg Chem.*, **2007**, 46, 2193-203.
- ²¹⁴ P.O. Sandusky and C.F. Yocum, The chloride requirement for photosynthetic oxygen evolution; analysis of the effects of chloride and other anions on amine inhibition of the oxygen-evolving complex, *Biochim. Biophys. Acta*, **1984**, 766, 603–611.
- ²¹⁵ W.J. Coleman, Chloride binding proteins: Mechanistic implications for the oxygen evolving complex of Photosystem II, *Photosynth. Res.*, **1990**, 23, 1–27.
- ²¹⁶ K. Olesen and L.E. Andreasson, The function of the chloride ion in photosynthetic oxygen evolution, *Biochemistry*, **2003**, 42, 2025–2035.
- ²¹⁷ M. Haumann, M. Barra, P. Loja, S. Loscher, R. Krivanck, A. Grundmeier, L.E. Andreasson and H. Dau, Bromide does not bind to the Mn_4Ca complex in its S_1 state in Cl-depleted and Br-reconstituted oxygen evolving photosystem II: evidence from X-ray absorption spectroscopy at the Br K-edge, *Biochemistry*, **2006**, 45, 13101–13107.
- ²¹⁸ J.P. McEvoy, J.A. Gascon, V.S. Batista and G.W. Brudvig, The mechanism of photosynthetic water splitting, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2005**, 4, 940-949.
- ²¹⁹ P.E.M. Siegbahn, Quantum chemical studies of manganese centers in biology, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2002**, 6, 227-235,
- ²²⁰ J.W. Murray, K. Maghlaoui, J. Kargul, M. Sugiura and J. Barber, Analysis of xenon binding to photosystem II by X-ray crystallography, *Photosynth. Res.*, **2008**, 98, 523-527.

ANNEXE : PUBLICATION

N. Ishida, M. Sugiura, F. Rappaport, T.L. Lai, A.W. Rutherford and A. Boussac, Biosynthetic Exchange of Bromide for Chloride and Strontium for Calcium in the Photosystem II Oxygen-evolving Enzymes, *J. Biol.Chem.*, **2008**, 283, 13330-13340.

Biosynthetic Exchange of Bromide for Chloride and Strontium for Calcium in the Photosystem II Oxygen-evolving Enzymes^{*[5]}

Received for publication, December 31, 2007, and in revised form, February 28, 2008. Published, JBC Papers in Press, March 10, 2008, DOI 10.1074/jbc.M710583200

Naoko Ishida^{†1}, Miwa Sugiura[§], Fabrice Rappaport[¶], Thanh-Lan Lai[‡], A. William Rutherford[‡], and Alain BousSac^{‡2}

From the [†]Institut de Biologie et Technologie de Saclay, URA CNRS 2096, Commissariat à l'Energie Atomique Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, France, the [§]Department of Plant Biosciences, School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8531, Japan, and the [¶]Institut de Biologie Physico-Chimique, Université Pierre et Marie Curie/CNRS UMR 7141, 13 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France

The active site for water oxidation in photosystem II goes through five sequential oxidation states (S_0 to S_4) before O_2 is evolved. It consists of a Mn_4Ca cluster close to a redox-active tyrosine residue (Tyr_Z). Cl^- is also required for enzyme activity. To study the role of Ca^{2+} and Cl^- in PSII, these ions were biosynthetically substituted by Sr^{2+} and Br^- , respectively, in the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*. Irrespective of the combination of the non-native ions used (Ca/Br, Sr/Cl, Sr/Br), the enzyme could be isolated in a state that was fully intact but kinetically limited. The electron transfer steps affected by the exchanges were identified and then investigated by using time-resolved UV-visible absorption spectroscopy, time-resolved O_2 polarography, and thermoluminescence spectroscopy. The effect of the Ca^{2+}/Sr^{2+} and Cl^-/Br^- exchanges was additive, and the magnitude of the effect varied in the following order: Ca/Cl < Ca/Br < Sr/Cl < Sr/Br. In all cases, the rate of O_2 release was similar to that of the S_3Tyr_Z' to S_0Tyr_Z transition, with the slowest kinetics (*i.e.* the Sr/Br enzyme) being ≈ 6 –7 slower than in the native Ca/Cl enzyme. This slowdown in the kinetics was reflected in a decrease in the free energy level of the S_3 state as manifest by thermoluminescence. These observations indicate that Cl^- is involved in the water oxidation mechanism. The possibility that Cl^- is close to the active site is discussed in terms of recent structural models.

Light-driven water oxidation by the photosystem II (PSII)³ enzyme is responsible for the O_2 on Earth and is at the origin of

the production of most of the biomass. Refined three-dimensional x-ray structures at 3.5 and 3.0 Å resolution have been obtained by using PSII isolated from the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* (1, 2). PSII is made up of more than 20 membrane protein subunits, 35–36 chlorophyll molecules, more than 10 carotenoid molecules, several lipids, two hemes, and the cofactors involved in the electron transfer reactions (1, 2). Absorption of a photon by chlorophyll is followed by the formation of a radical pair in which the pheophytin molecule, Pheo_{D1}, is reduced and the accessory chlorophyll molecule, Chl_{D1}, is oxidized (3–5). The cation is then stabilized on P₆₈₀, a weakly coupled chlorophyll dimer (see *e.g.* Refs. 6 and 7 for energetic considerations). The pheophytin anion transfers the electron to a quinone, Q_A, which in turn reduces a second quinone, Q_B. P₆₈₀⁺ oxidizes a tyrosine residue of the D1 polypeptide, Tyr_Z, which in turn oxidizes the Mn_4Ca cluster.

The Mn_4Ca cluster acts as a device for accumulating oxidizing equivalents and as the active site for water oxidation. During the enzyme cycle, the oxidizing side of PSII goes through five sequential redox states, denoted as S_n , where n varies from 0 to 4 upon the absorption of four photons (8). Upon formation of the S_4 state, two molecules of water are rapidly oxidized, the S_0 state is regenerated, and O_2 is released.

The mechanism by which water is oxidized and O_2 produced is still largely unknown (9–17). The geometry and ligand environment of the Mn_4Ca cluster in the crystal structure is not clearly defined because the x-ray beam reduces the native high valence manganese cluster back to the Mn^{II} state (18, 19). The transition from S_4 (or S_3Tyr_Z' , which is kinetically indistinguishable) to S_0 probably involves several reaction intermediates. These have largely escaped detection for the following reasons: 1) the rate constant of this transition is rapid ($t_{1/2} \approx 1$ ms); 2) the reduction of Tyr_Z' is the limiting step for water oxidation in the native enzyme; and 3) experimental methods for trapping potential intermediate states are lacking (see Refs. 20 and 21 for a recent elegant thermodynamic approach). One strategy that could allow intermediates to be detected is to modify the enzyme, maintaining its capacity for turnover but impairing its kinetics. A change in the rate-limiting step could

Q_B, primary and secondary quinone acceptors; MES, 4-morpholineethanesulfonic acid; Tricine, N-[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]glycine.

* This work was supported in part by the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) and the CNRS under the Japan-France Research Cooperative Program and Solar-H, a Space Technologies Research Program from the European Community. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[5] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Equations 1–6, Figs. S1–S6, and Table ST1.

¹ Supported in part by the Bio-Hydrogen Program of the Commissariat à l'Energie Atomique.

² To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-1-69-08-72-06; E-mail: alain.bousSac@cea.fr.

³ The abbreviations used are: PSII, photosystem II; P₆₈₀, primary electron donor; Chl, chlorophyll; DCBQ, 2,6-dichloro-*p*-benzoquinone; PPBQ, phenyl-*p*-benzoquinone; EXAFS, extended X-ray absorption fine structure; Nd:YAG, neodymium-yttrium aluminum garnet; Pheo, pheophytin; Q_A and

allow one or more intermediates to become detectable. Recently (22), we have shown that growing the thermophilic cyanobacterium *T. elongatus* in the presence of Sr²⁺ instead of Ca²⁺ resulted in the exchange of Ca²⁺ by Sr²⁺, and this produced a significant slowdown of the oxygen evolution rate. Among all of the cations tested, only Sr²⁺ can substitute for Ca²⁺ (23–26).

The effects of Ca²⁺/Sr²⁺ exchange have been studied by EPR (22, 27–29), Fourier transform infrared spectroscopy (30–32), EXAFS spectroscopy (33, 34), mass spectrometry experiments monitoring the water substrate exchange rates (35), and time-resolved UV-visible spectroscopy (22). Ca²⁺/Sr²⁺ exchange has a slight effect on the geometry of the manganese cluster as detected by EPR (27, 28). The kinetics of O₂ release and the S₃Tyr_Z[•] to S₀Tyr_Z transition are slowed down to the same extent (22). The affinity of the slowest exchangeable water substrate molecule bound in the S₃ state is decreased (35). These studies indicate the involvement of Ca²⁺ (or Sr²⁺) in the catalytic cycle (10, 36, 37).

When Ca²⁺ is removed from its site, manganese oxidation can still take place, allowing the formation of the S₂ state, but in the following step, the normal S₃ state is not formed. Instead, an alternative, abnormally stable form appears to be induced in which the Mn₄ cluster is in the same redox state as it was in S₂ state but in magnetic interaction with a radical (spin = 1/2) (38), likely Tyr_Z[•] (39, 40), giving rise to a characteristic EPR signal that is known as the split signal.

Chloride is also an essential ion for PSII activity (24, 26, 41–53). In plant PSII, removal of Cl⁻ inhibits oxygen evolution and perturbs the Mn₄ cluster to a variable extent depending on the precise Cl⁻-depletion method used (24, 26, 46). The removal of Cl⁻ by incubation in Cl⁻-free buffer increased the proportion of the Mn₄ cluster in the high-spin state (g = 4 EPR signal), but the enzyme continues to work at a reduced rate (46). When Cl⁻ is removed by a high pH shock, the high-spin state is formed, and the S-state cycle is blocked after S₂ formation in the majority of centers, whereas treatment with SO₄²⁻ inhibits the enzyme but allows radical (Tyr_Z[•]) formation in the presence of S₂, giving rise to the split EPR signal, at least in a fraction of the centers (46, 47, 53, 54). In the SO₄²⁻-treated enzyme the electron donation rate from Tyr_Z to P₆₈₀⁺ is not greatly affected on the first two flashes (47), but Cl⁻ is required to progress through the S₂ to S₃ (46, 47, 50) and S₃ to S₀ transitions (50).

When the first PSII structural models from crystallography appeared, the resolution was not good enough to detect the Ca²⁺ ion (55, 56), and the question arose whether Ca²⁺ really was intimately associated with the Mn₄ cluster in cyanobacteria as was thought to be the case in plants. This prompted us to develop a method for biosynthetic Ca²⁺/Sr²⁺ exchange in *T. elongatus* (22). We showed that there is one Sr²⁺ per PSII in fully active cyanobacterial PSII (22). At the same time, a structure with 3.5 Å resolution was reported in which a Ca²⁺ ion in close interaction with the Mn₄ cluster was identified based on anomalous diffraction data (1). Recently, x-ray crystallography and EXAFS spectroscopy using the Sr²⁺-containing enzyme confirmed that Sr²⁺ was associated with the Mn₄ cluster and was located in a position similar to that of Ca²⁺ (34, 57).

The situation for chloride is less clear. No chloride ions are defined in the current three-dimensional structural models of the enzyme (1, 2). This is partly because the resolution is insufficient but also because the structure of the cluster is perturbed by the x-ray beam, which reduces the high valence manganese cluster to the Mn^{II} state (18, 19). The role and location of chloride as a cofactor in PSII from cyanobacteria thus remain open. For this reason, Cl⁻/Br⁻ exchange experiments are potentially interesting.

Previously reported Cl⁻/Br⁻ exchange studies were done in chloride-depleted PSII. Depending on the Cl⁻-depletion procedure (e.g. sulfate treatment at high pH versus extrinsic polypeptide depletion), the Br⁻ reconstitution may have different effects. These differences can be explained by the presence of more than one chloride-binding site in PSII, the activity of which would depend on the binding of chloride to a high affinity site; and this activity could be modulated by the binding of another chloride to a low affinity binding site (46, 48). An alternative interpretation has been suggested, namely that many of the effects induced by Cl⁻ depletion are depletion-induced artifacts and that there is a single Cl⁻-binding site that has only an indirect effect on enzyme function. Indeed, in this interpretation Cl⁻ is not considered necessary for enzyme activity (51, 52).

As in the case of Ca²⁺/Sr²⁺, the biosynthetic substitution of Br⁻ for Cl⁻ could provide a “bromide phenotype” that does not suffer from the ambiguities associated with biochemical exchange procedures. The study of the bromide exchanged PSII could yield evidence for the involvement of Cl⁻ in the water-splitting process and provide new insights on the role of chloride in the water oxidation mechanism.

Here we present the results of this biosynthetic Cl⁻/Br⁻ replacement study using *T. elongatus* with either Ca²⁺ or Sr²⁺ in the active site. Fully intact PSII preparations containing Ca/Cl, Ca/Br, Sr/Cl, and Sr/Br were analyzed using a combination of spectroscopic and enzymological studies.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Culture of the Cells and Purification of Thylakoids and PSII—Thylakoids, and thence PSII, were purified from a *T. elongatus* strain that had a His₆ tag on the CP43 subunit (58) and in which the *psbA*₁ and *psbA*₂ genes were deleted (WT*) (59). The D1 protein in PSII can potentially be encoded by three genes, *psbA*₁, *psbA*₂, and *psbA*₃, each differing slightly. Because in this WT* *T. elongatus* only the *psbA*₃ gene is present, the enzyme is not affected by the possible heterogeneity in D1 that would result from the expression of more than one of the three *psbA* genes. Such a situation could occur, for example, because of regulatory mechanisms triggered when changing light intensity during batch culture (60).

The WT* cells were grown in 1 liter of culture medium (58) in 3-liter Erlenmeyer flasks in a rotary shaker with a CO₂-enriched atmosphere at 45 °C under continuous light (80 μmol photons·m⁻²·s⁻¹). The culture medium was supplemented with either 0.8 mM CaX₂ or SrX₂ (X was either bromide or chloride depending on the experiments). The grade of the chemicals used was ≥99.999% for CaBr₂, SrCl₂, and SrBr₂ and ≥99.99% for CaCl₂. The chloride content was ≤0.001% in glycol-

TABLE 1

PSII	Activity ^a $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl}\cdot\text{h}$	α^b %	S_0/S_1^b %/%	$t_{1/2}^c$			TL in S_3^e °C
				$S_1\text{TyrZ}'$ to $S_2\text{TyrZ}$ μs	$S_3\text{TyrZ}'$ to $(S_3\text{TyrZ}')'$ μs	$(S_3\text{TyrZ}')'$ to S_0^d ms	
CaCl	5000–6000	9	0/100	≈ 50	115	1.1	48
CaBr	3200–3600	9	10/90	≈ 100	140	2.1	50
SrCl	1800–2600	9	9/91	≈ 150	210	4.8	52
SrBr	1500–2000	8	23/77	$\approx 400\text{--}500$	230	7.2	56

^a Measured under continuation illumination.

^b Miss parameter calculated from the oscillating patterns at 292 nm.

^c Measured at 292 nm.

^d The kinetics after the third flash were fitted according to the equation: $A(t) = (A(0)k_1/(k_2 - k_1)) \times (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) + A(0) \cdot e^{-k_1 t} + \text{offset}$, in which $A(0)$ is the calculated absorption at time $t = 0$; i.e. the absorption 10 μs after the third flash (the first point of the kinetics) and the offset is the calculated absorption 300 ms after the flash (the last point of the kinetics). See supplemental data for additional comments.

^e Temperature peak position of the thermoluminescence glow curves from the $S_3Q_B^-$ charge recombination.

erol, $\leq 0.02\%$ in betaine, and $\leq 0.005\%$ in MES. In the culture medium and before the addition of the CaX_2 or SrX_2 salts, the Ca^{2+} contamination was measured by ICP (22) to be less than $1.5 \mu\text{M}$. The Cl^- contamination can be estimated from the specifications given by the suppliers of the chemicals to be $\leq 40 \mu\text{M}$ (essentially from the Tricine buffer).

Thylakoids and PSII were prepared as described earlier (61) with the exception that no polyethylene glycol was used to concentrate the samples. Instead, the samples were concentrated by using Amicon Ultra-15 concentrator devices (Millipore) with a 100-kDa cut-off. Routinely, the total amount of Chl after the breaking of the cells was $\approx 180 \text{ mg}$, and the yield after PSII purification in terms of Chl amounts was $\approx 4\text{--}5\%$. Thylakoids and PSII were stored in liquid nitrogen at a concentration of about $1.5\text{--}2 \text{ mg Chl/ml}$ in a medium containing 10% glycerol, 1 M betaine, 15 mM CaX_2 , 15 mM MgX_2 , and 40 mM MES, pH 6.5 (pH adjusted with NaOH), until they were used.

Oxygen Evolution under Continuous Light—Oxygen evolution of PSII under continuous light was measured at 25°C by polarography using a Clark-type oxygen electrode (Hansatech) with saturating white light at a Chl concentration of $5 \mu\text{g}$ of $\text{Chl}\cdot\text{ml}^{-1}$ in the media described above. A total of 0.5 mM DCBQ (2,6-dichloro-*p*-benzoquinone, dissolved in dimethyl sulfoxide) was added as an electron acceptor. The betaine, DCBQ, and Q_B react in the time range of minutes in the presence of O_2 . For that reason, measurements of PSII activity were done at $\leq 1 \text{ min}$ after the addition of DCBQ.

Flash-induced Oxygen Evolution—Oxygen evolution under flashing light was measured with a laboratory-made rate electrode (22). Two combinations of electrodes were used: either Pt/Ag/AgCl or Pt/Ag/AgBr, depending on the conditions. The Ag/AgCl and Ag/AgBr electrodes were prepared by using 1–2 M HCl or HBr acids, respectively. Thylakoids were used at $1.2 \text{ mg Chl}\cdot\text{ml}^{-1}$. Typically, 25 μl of a thylakoid suspension was put onto the platinum electrode. The volume of the circulating medium was $\approx 250 \text{ ml}$ and contained 10% glycerol, 1 M betaine, 15 mM CaX_2 , 15 mM MgX_2 , 50 mM KX, and 40 mM MES, pH 6.5 (pH adjusted with NaOH). Illumination was done with a xenon flash (PerkinElmer Optoelectronics). The intensity of the flash was adjusted so that the light intensity was saturating (i.e. the miss parameter was minimum). Measurements were done at room temperature ($20\text{--}25^\circ\text{C}$). The amplified amperometric signal resulting from the flash-induced oxygen evolution was recorded with a numerical oscilloscope.

UV-visible Absorption Change Spectroscopy—Absorption changes were measured with a laboratory-built spectrophotometer where the absorption changes were sampled at discrete times by short flashes (62). These flashes were provided by a neodymium-yttrium aluminum garnet (Nd:YAG) pumped (355 nm) optical parametric oscillator, which produces monochromatic flashes (1 nm full-width at half-maximum) with a duration of 6 ns. Excitation at 685 nm was provided by a dye laser pumped by a frequency-doubled Nd:YAG laser. The path length of the cell was 2.5 mm. PSII was used at $25 \mu\text{g}$ of $\text{Chl}\cdot\text{ml}^{-1}$ in 10% glycerol, 1 M betaine, 15 mM CaX_2 , 15 mM MgX_2 , and 40 mM MES, pH 6.5 (pH adjusted with NaOH). After dark adaptation for 1 h at room temperature ($20\text{--}22^\circ\text{C}$), 0.1 mM PPBQ dissolved in dimethyl sulfoxide was added as an electron acceptor. PPBQ was used here instead of DCBQ because of the length of the experiment (see above).

Thermoluminescence Experiments—Thermoluminescence glow curves were measured with a laboratory-built apparatus (63). PSII samples at $10 \mu\text{g Chl}\cdot\text{ml}^{-1}$ were first dark-adapted at room temperature for 1 h. Illumination was done by using saturating xenon flashes (PerkinElmer Optoelectronics) at 5°C . Then the samples were frozen to -10°C in 5 s. After an additional 5 s at -10°C , the frozen samples were heated at a constant rate (0.33°C/s). From the lifetime of the S_2 and S_3 states at room temperature (22), these states can be considered as stable under these experimental conditions before the heating process. Analysis of the data was done as described previously (63–65).

EPR Spectroscopy—cw-EPR spectra were recorded using a standard ER 4102 (Bruker) X-band resonator with a Bruker Elexsys 500 X-band spectrometer equipped with an Oxford Instruments cryostat (ESR 900). Flash illumination at room temperature was provided by a Nd:YAG laser (532 nm, 550 mJ, 8-ns Spectra Physics GCR-230-10). PSII samples at $\approx 1 \text{ mg}$ of $\text{Chl}\cdot\text{ml}^{-1}$ were loaded in the dark into quartz EPR tubes and further dark-adapted for 1 h at room temperature. Then, the samples were in some cases synchronized in the S_1 state with one pre-flash (66). After another dark period of 1 h at room temperature, 0.5 mM PPBQ was added (the final concentration of dimethyl sulfoxide was $\approx 2\%$). The samples were frozen in the dark to 198 K and then transferred to 77 K. Prior to the measurements the samples were degassed at 198 K as described previously (29).

Analysis of the data was done using Excel (Microsoft), Mathcad 14 (Parametric Technology Corp.), and Origin 7.5 (Origin-Lab Corp.).

RESULTS

O₂ Evolution under Continuous Illumination—We have shown previously that PSII purified from *T. elongatus* cells grown in the presence of Sr²⁺ salts incorporated one Sr²⁺ ion per four manganese ions (22), and that replaces the Ca²⁺ in the active site of PSII (22, 34, 57). Without any further biochemical treatments, this Sr²⁺ ion was not exchangeable for Ca²⁺ ions when present in the medium (22). In contrast, the exchangeability of Cl⁻ in the chloride site(s) is still being discussed in the literature. Therefore, to avoid any potential Br⁻/Cl⁻ (or Cl⁻/Br⁻) exchange during the purification procedures, the thylakoids and the isolated PSII preparations were purified in media containing either (i) CaCl₂ and MgCl₂ for the cells grown in the presence of chloride salts or (ii) CaBr₂ and MgBr₂ for the cells grown in the presence of bromide salts. PSII (and thylakoids) purified under these different conditions are designated CaCl-PSII (CaCl-thylakoids), CaBr-PSII (CaBr-thylakoids), SrCl-PSII (SrCl-thylakoids), and SrBr-PSII (SrBr-thylakoids). The O₂ evolution activities of these four different PSII types under continuous illumination and in the corresponding suspending media are shown in Table 1. In all of these cases, the exchange of Ca²⁺ or/and Cl⁻ resulted in a decrease in the steady-state oxygen evolution rate.

Absorption Changes at 292 nm—Fig. 1 shows the amplitude of the absorption changes upon flash illumination recorded with the four PSII preparations. Measurements were done using a Joliot-type spectrophotometer at 292 nm (67, 68) and in the hundreds of ms time range, *i.e.* after the reduction of Tyr_Z' by the Mn₄Ca(Sr) cluster was complete. This wavelength corresponds to an isosbestic point for PPBQ⁻/PPBQ, the added electron acceptor (not shown), and is in a spectral region where the absorption of the Mn₄Ca cluster depends on the S-states (68). The oscillating pattern with a period of four is clearly observed for all four types of PSII preparations irrespective of their Ca²⁺/Sr²⁺ and Cl⁻/Br⁻ status.

Using the formula developed by Lavorel (69) and the oscillating patterns shown in Fig. 1, the miss (α) and double-hit (β) parameters could be calculated. In this experiment, the double-hit parameter, 4–5%, was due to a small actinic effect of the measuring beam rather than an intrinsic property of PSII. The miss parameter was independent of the nature of ion present (Table 1) as already observed in CaCl-PSII and SrCl-PSII (22). Using the method developed by Lavergne (68), the four sets of data in Fig. 1 were fitted simultaneously as described previously (22, 61). Each of the three different differential extinction coefficients, $\Delta\epsilon_0$, $\Delta\epsilon_1$, $\Delta\epsilon_2$, corresponding to the S₀ to S₁, S₁ to S₂, and S₂ to S₃ transitions, respectively, was kept fixed for the four types of PSII. The S₀/S₁ ratio was allowed to vary for each type of sample (Table 1).

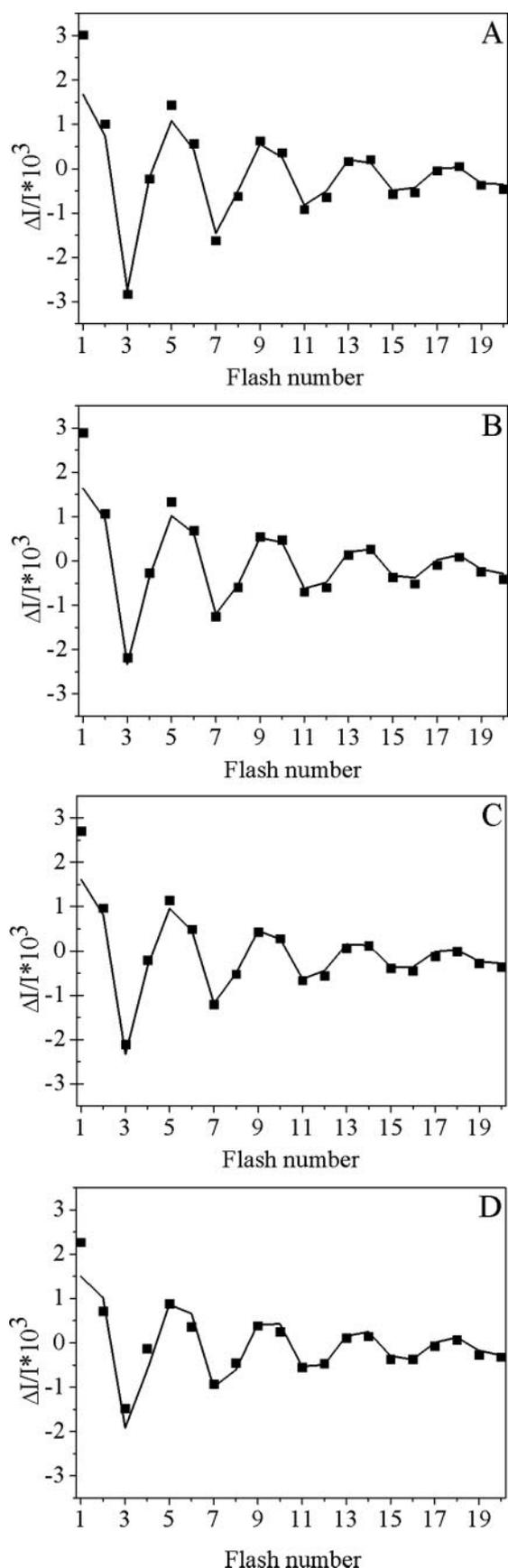


FIGURE 1. Sequence of the amplitude of the absorption changes at 292 nm. The measurements were done during a series of saturating flashes (spaced 400 ms apart) given to CaCl-PSII (A), CaBr-PSII (B), SrCl-PSII (C), and

SrBr-PSII (D). The samples (Chl = 25 μ g/ml) were dark-adapted for 1 h at room temperature before the addition of 100 μ M PPBQ. The measurements were done 300 ms after each flash. The symbols correspond to the experimental points and the lines to the fit of the data.

Ca/Sr and Cl/Br Exchanges in Photosystem II

The $\Delta\epsilon_0$ ($0.70 \cdot 10^{-3}$), $\Delta\epsilon_1$ ($1.98 \cdot 10^{-3}$), and $\Delta\epsilon_2$ ($1.33 \cdot 10^{-3}$) values found here are in good agreement with those found earlier at this wavelength (22, 61, 68). The reasonably good fits obtained when using the same set of $\Delta\epsilon_i$ for various PSII samples indicate that: (i) the Sr^{2+} and/or Br^- substitutions did not significantly modify the absorption of the Mn_4 cluster, at least at 292 nm; and (ii) there were no nonfunctional centers in the CaBr-, SrCl-, and SrBr-PSII. EPR measurements without any pre-flash illumination showed no indication for an increased proportion of centers with reduced Tyr_D in the dark-adapted SrBr-PSII (not shown) (66). Therefore, the apparent higher proportion of the S_0 state in the dark-adapted SrBr-PSII (Table 1) more likely corresponds to a higher proportion of the $S_0\text{Tyr}_D^-$ state rather than to a higher proportion of the $S_1\text{Tyr}_D$ state.

The absence of any major consequences of the Sr^{2+} and/or Br^- substitution on the turnover of the S-state cycle under flashing conditions contrasts with the significant decrease in the oxygen evolution rate under steady-state conditions. This suggests that this decreased efficiency results not from a fraction of PSII centers inactive in water splitting but rather from a change in the intrinsic kinetics of at least one of the steps in the cycle.

To determine which step(s) is affected by the Cl^-/Br^- and $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ exchanges, we measured the absorption changes at 292 nm in the hundreds of ns to ms time range after each of the first four flashes given to dark-adapted PSII (Fig. 2). Absorption changes at this wavelength reflect the Mn_4 cluster valence changes and the Tyr_Z redox state changes occurring in the $S_1\text{Tyr}_Z^-$ to $S_2\text{Tyr}_Z$, $S_2\text{Tyr}_Z^-$ to $S_3\text{Tyr}_Z$, $S_3\text{Tyr}_Z^-$ to $S_0\text{Tyr}_Z$, and $S_0\text{Tyr}_Z^-$ to $S_1\text{Tyr}_Z$ transitions (68). Fig. 2 shows that only minor absorption changes could be detected after the second flash (panel B) and the fourth flash (panel D). This means that, in all four types of the enzyme, the $\Delta I/I$ changes associated with the $\text{Tyr}_Z^-S_2$ to $\text{Tyr}_Z S_3$ and $\text{Tyr}_Z^-S_0$ to $\text{Tyr}_Z S_1$ were small, thus precluding the reliable kinetic analysis of the S_2 to S_3 and S_0 to S_1 transitions. On the other hand, because these two transitions only weakly contribute to the absorption changes at this wavelength, the half-times of the S_1 to S_2 and S_3 to S_0 transitions may be reliably determined from the raw data without any deconvolution procedures. The $S_1\text{Tyr}_Z^-$ to $S_2\text{Tyr}_Z$ transition (Fig. 2A) was slowed down from $t_{1/2} \approx 50 \mu\text{s}$ in CaCl-PSII to $t_{1/2} \approx 400$ – $500 \mu\text{s}$ in SrBr-PSII with the following order for the $t_{1/2}$ values: $t_{1/2}$ in CaCl-PSII $< t_{1/2}$ in CaBr-PSII $< t_{1/2}$ in SrCl-PSII $< t_{1/2}$ in SrBr-PSII (Table 1). The small absorption change associated to the $S_1\text{Tyr}_Z^-$ to $S_2\text{Tyr}_Z$ transition did not allow us to determine whether a multiphasic process was involved.

The kinetics of the $S_3\text{Tyr}_Z^-$ to $S_0\text{Tyr}_Z$ transition in the CaCl₂ sample (Fig. 2C) was much better fitted when a lag phase was introduced (see supplemental data). Such a lag phase was observed earlier and was attributed to structural rearrangements in the $S_3\text{Tyr}_Z^-$ state (67, 70–72). Therefore the four traces were fitted with a sequential model involving the transient formation of a ($S_3\text{Tyr}_Z^-$)' state (Table 1). Based on this fitting procedure, the $t_{1/2}$ of the lag phase in SrBr-PSII is double that in CaCl-PSII. In agreement with the oxygen evolution rate under continuous illumination, the kinetics of the $S_3\text{Tyr}_Z^-$ to $S_0\text{Tyr}_Z$ transition observed after the third flash (Fig. 2C) was

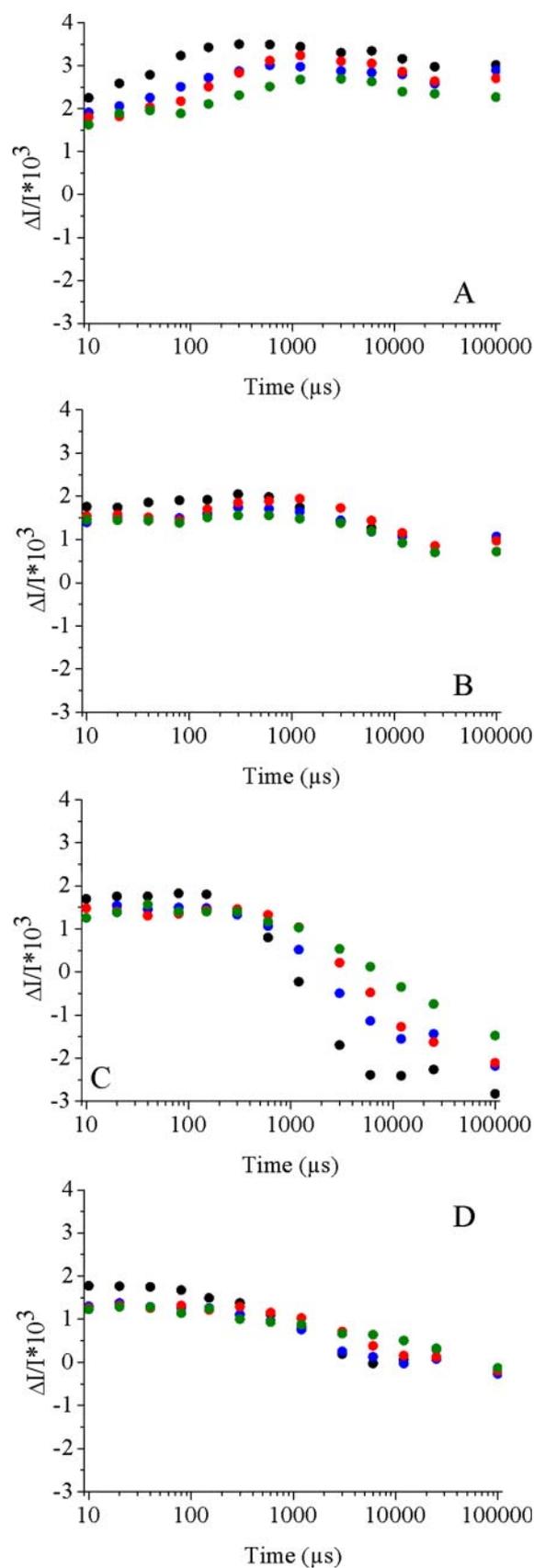


FIGURE 2. Kinetics of the absorption changes at 292 nm after the first flash (A), the second flash (B), the third flash (C), and the fourth flash (D) given to dark-adapted CaCl-PSII (black), CaBr-PSII (blue), SrCl-PSII (red), and SrBr-PSII (green). Other experimental conditions were similar to those in Fig. 1.

also significantly slowed down, with half-times ranging from 1.1 ms in CaCl-PSII to 7.2 ms in SrBr-PSII (Table 1).

Time-resolved O_2 Evolution—Another way to study specifically the $S_3Tyr_Z^*$ to S_0Tyr_Z transition is to follow the O_2 release with a time-resolved polarized electrode. Because this technique requires the sedimentation of the sample on the platinum electrode, thylakoids were used instead of purified PSII. The classical electrode combination, Pt/Ag/AgCl, requires the presence of a chloride salt as an electrolytic counter anion in the circulating medium. To avoid the possible exchange of Br^- for Cl^- in the bromide-containing samples during the course of the experiment, a Pt/Ag/AgBr electrode combination with a bromide salt as an electrolytic counter anion in the circulating medium was also used as a control experiment.

Fig. 3 shows the kinetics of O_2 release in CaCl-, CaBr-, SrCl-, and SrBr-thylakoids with either a Pt/Ag/AgCl (panel A) or a Pt/Ag/AgBr (panel B) electrode combination. To get a signal with maximal amplitude, the measurements were done upon the third flash given to a dark-adapted sample. Although the chlorophyll concentration was the same for each sample, the traces shown in Fig. 3 were scaled so that the areas under the curves (the amount of evolved O_2) were identical in order to take into account the possible variations in the PSII/PSI ratio. The normalization factors were in the range of what was expected from the PSI to PSII ratio, which varied from 1.8 to 2.5 in our *T. elongatus* thylakoids (not shown) as estimated by EPR (73). Moreover, the kinetics of O_2 release were found to be similar to those observed in whole cells, which indicates that the isolation protocol had no secondary effects.

As demonstrated by Lavorel (74), the amperometric signal results from the convolution of the diffusion limited O_2 pulse produced instantaneously in a thin layer, $\Phi(t)$, with the rate constant of the $S_3Tyr_Z^* \rightarrow S_0Tyr_Z + O_2$ reaction, k_{ox} . Thus, the ideal experimental case is that of a thylakoid monolayer. Deviating from this ideal case results in a divergence between the theoretical and experimental curves, which increases with the time after the O_2 pulse is triggered. We therefore analyzed the kinetics shown in Fig. 3 within a slightly simplified framework (see supplemental data). The O_2 diffusion time was first determined from the kinetics obtained with CaCl-thylakoids. Then, the expected traces for the four samples were calculated by using k_{ox} values equal to those of the rate constants of the $S_3Tyr_Z^* \rightarrow S_0Tyr_Z$ transition measured at 292 nm (the lag phase was neglected) (Table 1). The calculated traces resulting from such a procedure are shown in Fig. 3C. As mentioned above, the time resolution of the amperometric signal strongly depends on the O_2 diffusion time, which is used to calculate the function $\Phi(t)$ ($k_d = 0.11 \text{ ms}^{-1}$ in Fig. 3C). Although, this k_d value does not seem large enough to fully resolve the differences between the CaCl and CaBr samples, the relative $t_{1/2}$ values for both the O_2 release and the $S_3Tyr_Z^* \rightarrow S_0Tyr_Z$ transition in the four samples (Table 1) are in satisfactory agreement with those of the O_2 evolution activities measured under continuous illumination. This provides further evidence that, in these samples, the lower O_2 evolution activities arise from a kinetic limitation of the water-splitting process rather than from a fraction of inactive centers.

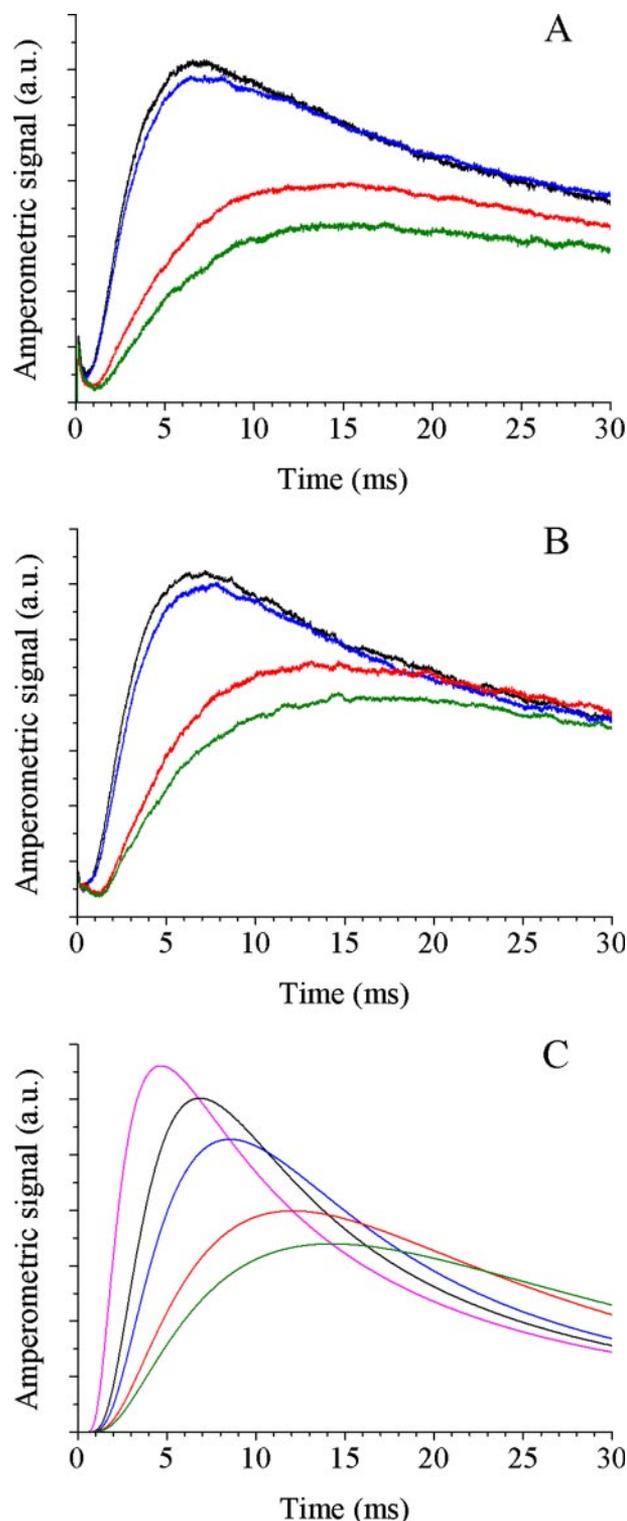


FIGURE 3. Kinetics of the oxygen release measured after the third flash given on CaCl-thylakoids (black), CaBr-thylakoids (blue), SrCl-thylakoids (red), and SrBr-thylakoids (green). The measurements were done with either a Pt/Ag/AgCl (A) or a Pt/Ag/AgBr (B) electrode combination. The time-resolved flash-induced oxygen evolution was measured after the third flash of a sequence of flashes spaced 400 ms apart. The samples (Chl = 1.2 mg/ml) were dark-adapted for 45 min at room temperature on the polarized bare platinum electrode prior to the illumination. C, expected amperometric signal in CaCl-thylakoids (black), CaBr-thylakoids (blue), SrCl-thylakoids (red), and SrBr-thylakoids (green). The traces were calculated by using a diffusion time value defined as indicated in the supplemental data and by using the rate constant of the $S_3Tyr_Z^* \rightarrow S_0Tyr_Z$ transition measured at 292 nm, as reported in Table 1. The violet curve is the $\Phi(t)$ function for a t_d value equal to 7 ms.

Ca/Sr and Cl/Br Exchanges in Photosystem II

Another important conclusion, which can be drawn from a comparison of Fig. 3, *A versus B*, is that the incubation of SrBr-thylakoids in a Cl^- -containing buffer and SrCl-thylakoids in a Br^- -containing buffer for the 45 min required for dark adaptation of the samples had no detectable effect on the kinetics of O_2 release. Based on the volume of the samples deposited onto the platinum electrode ($25 \mu\text{l}$) and on the volume of the circulating medium (250 ml), the concentration of bromide and chloride salts can be estimated to be $6 \mu\text{M}$ and 110 mM , respectively, for the SrBr-thylakoids and *vice versa* for the SrCl-thylakoids. Since the Cl^-/Br^- exchange strongly affects the rate of O_2 release in the Sr^{2+} -containing sample, it is clear from the results shown in Fig. 3 that during the course of the experiment ($\approx 1 \text{ h}$), neither Br^-/Cl^- exchange nor Cl^-/Br^- exchange occurred to a significant extent in SrBr- and SrCl-thylakoids, respectively.

As a further test of the Cl^-/Br^- and Br^-/Cl^- exchangeabilities in thylakoids, we washed the SrBr-thylakoids more extensively in the chloride-containing medium and the SrCl-thylakoids in the bromide-containing medium. The washing of these samples was done by centrifugation and resuspension (three times) until the residual amount of the contaminating halide calculated from the starting concentration was theoretically less than $0.1 \mu\text{M}$. The overall duration of these additional washing treatments was $\sim 3 \text{ h}$. After these treatments the O_2 release in SrBr-thylakoids resuspended in the chloride-containing medium and in SrCl-thylakoids resuspended in the bromide-containing medium was measured and was found to be similar to that measured in Fig. 3, *A and B*. This showed that, under these conditions, neither Cl^-/Br^- nor Br^-/Cl^- exchange occurred. However, when isolated PSII was incubated in the dark for 6–7 h (with a chlorophyll concentration of $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ and a halide concentration of 60 mM as above), the measurement at 292 nm of the S_3Tyr_Z^* to S_0Tyr_Z transition rate in SrCl-PSII and SrBr-PSII showed that a Cl^-/Br^- and Br^-/Cl^- exchange had begun to occur (not shown).

Thermoluminescence and Thermodynamic Properties of the S -states—All of the kinetic results presented above strongly suggest that the redox properties of the Mn_4 cluster were modified upon $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ and Cl^-/Br^- exchanges. Such redox changes may be monitored by measuring the thermoluminescence glow curves (75, 76). Indeed, the amplitude and the temperature dependence of the thermoluminescence glow curve, which arises from the radiative recombination between the positive charge stored on the Mn_4 cluster and the electron stored on the quinone Q_B^- , depend in part on the redox potential of the cofactors involved in the charge recombination process, *i.e.* the redox potential of the $\text{S}_{n+1}/\text{S}_n$, $\text{Tyr}_Z^*/\text{Tyr}_Z$, $\text{P}_{680}^+/\text{P}_{680}$, $\text{Pheo}_{\text{D1}}^-/\text{Pheo}_{\text{D1}}$, Q_A^-/Q_A , and Q_B^-/Q_B couples (64, 65, 75–78). If we assume as a first approximation that the $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ and Cl^-/Br^- exchanges do not significantly modify the redox potential of the $\text{P}_{680}^+/\text{P}_{680}$, $\text{Pheo}_{\text{D1}}^-/\text{Pheo}_{\text{D1}}$, Q_A^-/Q_A , and Q_B^-/Q_B couples and do not affect the proportion of reduced Q_B^- upon dark adaptation, then the changes in the thermoluminescence glow curves are expected to reflect a change in the redox properties of the $\text{S}_{n+1}/\text{S}_n$ couple. Fig. 4 shows such an experiment with CaCl-PSII, CaBr-PSII, SrCl-PSII, and SrBr-PSII.

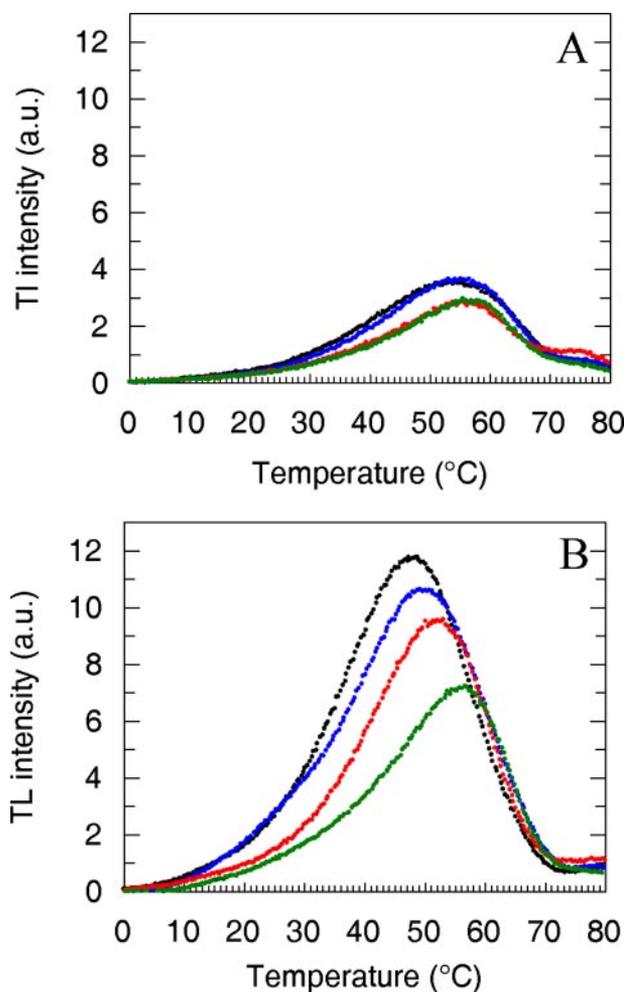


FIGURE 4. Thermoluminescence glow curves from S_2Q_B^- charge recombination measured after one flash (*A*) and from S_3Q_B^- charge recombination measured after two flashes (*B*) in CaCl-PSII (black), CaBr-PSII (blue), SrCl-PSII (red), and SrBr-PSII (green). Samples were previously dark-adapted at room temperature before being loaded into the cuvette and illuminated at 5°C .

After one flash given to a dark-adapted sample, the glow curve originates from S_2Q_B^- charges recombination, whereas after the second flash it originates from the S_3Q_B^- charges recombination (75, 76). The expected contribution of the S_2Q_B^- charge recombination to the thermoluminescence glow curve after the second flash, which results from the miss factor ($\approx 9\%$, Table 1), is rather small, and the traces shown on Fig. 4*B* can be considered essentially as reflecting the S_3Q_B^- charge recombination (see supplemental data). Fig. 4 shows that the peak temperature of the S_2Q_B^- charge recombination was less affected by the $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ and Cl^-/Br^- exchanges than that of the S_3Q_B^- charge recombination, suggesting that the free energy level of S_2Q_B^- is less affected by the substitutions than that of S_3Q_B^- . This is consistent with previous studies (22) showing that the reduction in the dark from S_3 to S_2 is three times slower in SrCl-thylakoids when compared with CaCl-thylakoids, whereas the stability of S_2 in the dark is almost unchanged. Fig. 4*B* shows that the peaks arising from the S_3Q_B^- charge recombination in the ion swapped samples were shifted to higher temperatures when compared with that for CaCl-PSII, and the extent of the up-shift

showed the following order: CaCl-PSII < CaBr-PSII < SrCl-PSII < SrBr-PSII (Table 1).

As shown previously (75, 76), the amplitude of the glow curve arising from the charge recombination involving the S_2 state is smaller than that involving the S_3 state. This seems to be an intrinsic property, and a factor of approximately 2 was demonstrated in plant thylakoids (75, 76). In *T. elongatus* the ratio seems to be greater. One possible explanation for this would be a higher Q_B^-/Q_B ratio after the second flash than after the first flash, which would translate into a Q_B^-/Q_B ratio larger than 1 in dark-adapted PSII. This would be at odds with the recent report showing that this ratio is close to or slightly lower than 1 in *T. elongatus* (79), so that other hypotheses should be considered. The larger values found for the peak temperatures after one flash than after two flashes (see also Refs. 58 and 79) indicate that the energy gap between the S_2/S_1 and P_{680}^*/P_{680} couples is higher than that between the S_3/S_2 and P_{680}^*/P_{680} couples. Thus, the higher temperature required to thermally populate P_{680}^* from $S_2Q_B^-$ than from $S_3Q_B^-$ could favor the nonradiative pathways through which charge recombination may occur to the detriment of the radiative pathway.

In principle, the decrease in the energy level of the S_3/S_2 couple can be estimated from the simulation of the thermoluminescence glow curves seen in Fig. 4B (also see supplemental data). Nevertheless, the lack of knowledge of the activation energies of the different routes for the charge recombination process, combined with the fact that the Ca^{2+}/Sr^{2+} exchange is known to affect the redox properties of cofactors other than the manganese cluster (e.g. it is known to slow down the electron transfer from Q_A^- to Q_B (57)), precludes the accurate determination of the change in the energy level of the $S_3Q_B^-$ state induced by the Ca^{2+}/Sr^{2+} and Cl^-/Br^- exchanges. A qualitative estimate may be obtained, nevertheless, by comparing the shift in T_m observed here with those reported previously in the literature and associated with a known change in the free energy gap. Temperature peaks corresponding to the $S_2Q_B^-$ and $S_3Q_B^-$ glow curves, which differ by $\approx 8^\circ C$, have been estimated to correspond to a difference in the free energy gap between the S_2 and S_3 state of $\approx 50-60$ meV (80). Recently, a point mutation in the vicinity of Q_A has been found to induce a shift in T_m of $9^\circ C$ and a change in free energy of ≈ 60 meV (81). In the case of the SrBr-PSII, we found an up-shift of T_m by $8^\circ C$, i.e. of similar amplitude to those just discussed, so that we estimate the change in free energy associated with the Sr^{2+}/Ca^{2+} and Br^-/Cl^- combined substitution to be $\approx 50-60$ meV. Using the procedure described previously to fit the thermoluminescence glow curves (64), with the assumption that the activation energy value used for the simulations only depends on the enthalpy of the charge recombination, yields a significantly larger downshift (110 meV) for the free energy level of the S_3 state in SrBr-PSII when compared with CaCl-PSII (see supplemental data).

DISCUSSION

The data in Table 1 corresponding to the CaCl and SrCl samples are similar to those obtained earlier with the His₆-tagged PSII (22). The properties of the SrCl samples obtained here in a PSII containing a D1 protein expressed only from the

psbA₃ gene are in agreement with those obtained upon a Ca^{2+}/Sr^{2+} exchange (22) done in the His₆-tagged wild-type strain.

The flash-induced absorption changes measured at 292 nm (Fig. 1) show that the four types of PSII (Ca/Cl, Sr/Cl, Ca/Br, Sr/Br) were fully competent in O₂ evolution. Nevertheless, in those with non-native ion combinations (Sr/Cl, Ca/Br, Sr/Br) the $S_3Tyr_Z^*$ to S_0Tyr_Z transition was significantly slowed down (Fig. 2).

Fig. 2 shows complex behavior for the kinetics measured at 292 nm. After the formation of P_{680}^+ , the change in the tens of nanoseconds time scale corresponds to the pure electron transfer from Tyr_Z to P_{680}^+ , whereas that in the μs to the hundreds of μs time scale corresponds to the $S_nTyr_ZP_{680}^+ \leftrightarrow S_nTyr_Z^+P_{680} \leftrightarrow S_{n+1}Tyr_ZP_{680} \leftrightarrow (S_{n+1}Tyr_ZP_{680})' \leftrightarrow S_{n+1}Tyr_Z^+P_{680}$ equilibria, where the $(S_{n+1}Tyr_ZP_{680})'$ denotes an unrelaxed state (82, 83). A change in the protein relaxation processes is expected to modify one or more of these equilibria. These relaxation processes, occurring in the earlier (ns to tens of μs) time range, can be followed through the reduction kinetics of P_{680}^+ . In the S_1 state, time-resolved absorption changes at 433 nm showed that none of the exchanges studied here affected P_{680}^+ reduction in the ns time scale. In contrast, the components present in the μs to the hundreds of μs time range were slowed down by the Ca^{2+}/Sr^{2+} exchange but remained unaffected by the Cl^-/Br^- exchange (not shown, but see supplemental data). This suggests that Ca^{2+} , but not Cl^- , is involved in the relaxation processes associated with (or triggered by) the oxidation of Tyr_Z by P_{680}^+ .

Fig. 2 shows that the kinetics at 292 nm after the first flash were also modified by the Cl^-/Br^- exchange, in agreement with previous time-resolved studies of the Tyr_Z^* decay in Ca-depleted/Sr-reconstituted PSII in all of the S-state transitions (84). As it is widely agreed that none of the S-state transition is kinetically limited by the electron transfer reaction *per se* (7), this indicates that both Ca^{2+} and Cl^- participate in setting the factors that modulate the electron transfer between the Mn_4 cluster and Tyr_Z^* .

After the third flash, a lag phase can be observed before the absorption decay, which corresponds to the $(S_3Tyr_Z)'$ to $S_0Tyr_Z + O_2$ transition. This lag phase had already been reported (67, 70-72) and was attributed to electrostatically triggered structural rearrangements in the $S_3Tyr_Z^*$ states (67), which could involve proton release (72). The data in Fig. 2 show that the duration of the lag phase was significantly increased upon the Ca^{2+}/Sr^{2+} exchange and to a lesser extent upon Cl^-/Br^- exchange. The increase in the lifetime of the intermediate $(S_3Tyr_Z)'$ state in SrBr-PSII could make this sample the material of choice for further characterizations of the events occurring in the lag phase.

We took advantage of the clear slowdown of the O₂ release in SrBr-thylakoids when compared with the SrCl-thylakoids (Fig. 3) in order to study the exchangeability of Cl^- and Br^- . The kinetic consequences of the substitution of bromide for chloride proved to be unaffected by additional washings of the SrBr-thylakoids in a Br^- -free, Cl^- -containing medium, indicating that under these conditions, the bromide responsible for the slower kinetics is strongly bound and/or occluded. Nevertheless, when the isolated Br^- -containing enzyme was incubated

Ca/Sr and Cl/Br Exchanges in Photosystem II

in Cl^- -containing buffer in the dark (*i.e.* in the S_1 state) for 6–7 h, the effects of exchange became detectable. The halide exchange kinetics in PSII from the thermophilic cyanobacterium *T. elongatus* thus seem to be comparable with those observed in plant PSII (85).

In plant PSII, the release of Ca^{2+} in PSII lacking some of the extrinsic polypeptides was shown to be very efficient in the S_3 state but hardly occurred (at least under the experimental conditions used) in the S_1 state (86). In addition, the binding of Sr^{2+} in the empty Ca^{2+} -binding site has been shown to require light (28) indicating the likely involvement of the $S_2\text{Tyr}_Z$ state in the binding. These results suggested that in the higher S-state conformational changes occurred making possible the Ca^{2+} (Sr^{2+}) release and Ca^{2+} (Sr^{2+}) binding. Sr-EXAFS spectroscopy performed in SrCl-PSII recently substantiated these conformational changes by providing evidence for modifications in the coordination sphere of the Sr^{2+} ion associated with the successive S-state transitions (34). The S-state dependence of Cl^- release and Cl^- rebinding has been less documented. Nevertheless, it has been shown that reactivation of the S-state cycle in Cl^- -depleted PSII by nitrate is more efficient in the higher S-states (43), suggesting that, as for Ca^{2+} , the binding efficiency increases with the S-states.

It should be pointed out that the $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ and Cl^- /anion exchange mechanisms discussed in the previous paragraph differ from those involved in biosynthetic exchange. The former involves the structural rearrangement of the Mn_4Ca cluster occurring during the S-state cycle, whereas the latter involves the assembly of the cluster in the photoactivation process (see Ref. 87 for a review). *In vitro* it has been shown that the Sr^{2+} ion is able to substitute for Ca^{2+} in the photoactivation process (87, 88). Biosynthetic exchange studies have shown that this is also the case *in vivo* (Ref. 22 and this work; see also Ref. 30). The demonstration that biosynthetic Cl^-/Br^- exchange is possible is in agreement with *in vitro* photoactivation experiments showing the ability for Br^- to fully substitute for Cl^- (89).

It has been proposed that most experiments in the literature on the role of chloride, including those studying bromide exchange, have been affected by artifacts induced biochemically (51, 52, 90) using chloride depletion procedures. This remains a point of contention in the field, which we will now discuss in the light of the present results, because the strategy followed here eliminated biochemically induced artifacts.

In previous work (52, 85) the binding of Cl^- to PSII was studied with the following protocol. First, the $^{36}\text{Cl}^-$ that was incorporated into PSII biosynthetically was found to be fully exchangeable when dialyzed in a $^{35}\text{Cl}^-$ -containing medium. Second, it was observed that the dialysis of PSII against a Cl^- -free medium resulted in only a partial loss of activity (51, 52). Third, the remaining activity arose from all centers turning over at a lower rate. From these observations it was concluded that Cl^- was not required for enzyme turnover (51, 52). This conclusion, however, assumes that all of the Cl^- was released under the conditions used by Lindberg *et al.* (51, 52) for dialysis/washing of PSII in Cl^- -free medium (this assumption was not demonstrated experimentally). In short, biosynthetically labeled $^{36}\text{Cl}^-$ PSII preparation has not been studied in a Cl^- -free medium either in terms of its Cl^- content or in terms of its

activity. Admittedly, these would be difficult experiments; however, the point we would like to make is that the conclusion that Cl^- is not required for enzyme turnover remains open to discussion.

Some EXAFS studies suggest a possible Cl^- -binding site close to the Mn_4 cluster (91), whereas other EXAFS studies propose that, upon biochemical Cl^-/Br^- exchange, the bromide site is located at a distance greater than 5 Å from the Mn_4 cluster (45). Nevertheless, the chloride depletion protocol (52) used in that work (45) would not have resulted in a full depletion of the PSII-bound chloride as discussed above. Therefore, the bromide site investigated by Haumann *et al.* (45) is not necessarily the one directly associated with the Mn_4 cluster. One way to avoid some of the ambiguities on the number and type of chloride-binding sites would be to use the PSII preparation described in this work.

It is striking that the effects of exchanging $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ and Cl^-/Br^- are additive. This might suggest that the physicochemical properties of either Ca^{2+} or Sr^{2+} depend on the presence of either Cl^- or Br^- and vice versa. If this were not the case, it would be more difficult to explain why the Cl^-/Br^- exchange resulted in a further slowdown of the limiting step introduced upon $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ exchange. This hypothesis agrees with models for the water oxidation mechanism, which involve the formation of an electrophilic $\text{Mn}^{\text{V}}=\text{O}$ (or Mn^{IV} -oxy radical) and Ca^{2+} -aqua motifs in the S_4 state (see Ref. 37 for a recent review). These models suggest that a chloride ion is close (or bound) to the calcium ion (10, 36, 92). Also, it has been proposed that the lower O_2 activity observed upon $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ exchange could be linked to the higher Lewis acidity of aqua- Sr^{2+} versus aqua- Ca^{2+} (93). The binding of Br^- to Ca^{2+} and Sr^{2+} could also increase the Lewis acidity of the aqua ion of Ca^{2+} and Sr^{2+} , respectively. This could explain the additive effects of the Cl^-/Br^- and $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ exchanges.

Alternatively, the effects of the Cl^-/Br^- exchange investigated here could originate from a more distant halide-binding site. Several long distance effects indeed have been observed already upon $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ exchange, such as the decrease of affinity of cytochrome c_{550} followed by manganese release in the absence of betaine,⁴ the decrease in the equilibrium constant of $\text{Q}_\text{A}^-\text{Q}_\text{B} \leftrightarrow \text{Q}_\text{A}\text{Q}_\text{B}^-$ (57), and a change in the environment of the non-heme iron (27). These effects could well be related to the marked effect of Ca^{2+} removal on the redox potential of the $\text{Q}_\text{A}^-/\text{Q}_\text{A}$ couple (94). All of these long distance effects could include a modification of the H-bond network around the Mn_4 cluster, which would slow down some of the electron transfer steps. However, although the biosynthetic $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ exchange strongly affects several infrared modes in the carboxylate frequency region (30, 32), the biochemical Cl^-/Br^- exchange is reported to be silent in this spectral region (44).

From the thermoluminescence experiment, the decrease in the energy level of the S_3/S_2 couple could be roughly estimated to be 50–110 meV in SrBr-PSII when compared with CaCl-PSII. An implicit hypothesis behind this estimate is that the substitution only affects the energy levels of the S-states. As

⁴ A. Boussac, unpublished result.

discussed above, this is certainly an oversimplification, which results in an overestimate of the energy level decrease. Yet, the marked increase in the duration of the lag phase that precedes the oxidation of water and the 6–7-fold slowdown of the water splitting both point to a role of Ca^{2+} and Cl^- in the oxygen production mechanism, raising the issue of the possible correlation between the thermodynamic and kinetics consequences of the substitution.

Clausen and Junge (20) recently reported that water oxidation may be driven backward by increasing the O_2 pressure. They estimated the overall driving force of the $\text{S}_3\text{Tyr}_Z^*/\text{S}_4$ to $\text{S}_0 + \text{O}_2$ transition to be 80 meV (20, 21). In this context, decreasing the available driving force by lowering the free energy level of the S_3Tyr_Z^* , as in the present case, could affect the overall water splitting process kinetically. However, the kinetics consequences reported here are quite different from those reported from the O_2 back-pressure experiments (20, 21). In the latter case, the amplitude of the millisecond phase associated with water splitting was decreased, and its observed rate was slightly increased. These data could be accounted for by a two-step model involving an intermediate state (*B*) which accumulates under large O_2 pressure and is formed at the expense of $\text{S}_3\text{Tyr}_Z^*/\text{S}_4$. It is of note that neither the forward nor the backward rates of the $\text{S}_3\text{Tyr}_Z^*/\text{S}_4 \leftrightarrow B$ equilibrium were affected by the increased O_2 pressure. In the present case, the apparent rate constant of the $\text{S}_3\text{Tyr}_Z^*/\text{S}_4$ decay is affected, implying that the forward rate constant (and possibly the backward rate as well) of this equilibrium is decreased, so that the efficiency of the chemistry involved is decreased by the $\text{Sr}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ and/or Br^-/Cl^- substitution (see above for a more detailed discussion of the possible mechanisms).

The lack of changes in the overall amplitude of the ms component indicates, again in contradiction to Clausen and Junge's data (20), that the overall driving force of the $\text{S}_3\text{Tyr}_Z^*/\text{S}_4$ to $\text{S}_0 + \text{O}_2$ transition is not decreased enough to result in a detectable accumulation $\text{S}_3\text{Tyr}_Z^*/\text{S}_4$. This is somewhat surprising. Indeed, because the present data point to a decrease in the free energy level of $\text{S}_3\text{Tyr}_Z^*/\text{S}_4$ in the modified PSII, such a decrease combined with the shallow driving force of the water splitting reaction (20, 21) should result in the accumulation of a detectable amount of $\text{S}_3\text{Tyr}_Z^*/\text{S}_4$. Because of the error bars in our estimate of the change in the free energy level of the S_3 state, this apparent discrepancy may not be irreconcilable. In any case, the SrBr-PSII seems ideally suited for further studies of the effect of O_2 pressure on the water oxidation mechanism.

Acknowledgments—J. Lavergne, P. Sétif, Y. Pushkar, and A. Aukauloo are acknowledged for helpful discussions. Jean-Marc Ducruet is acknowledged for help with thermoluminescence experiments.

REFERENCES

1. Ferreira, K. N., Iverson, T. M., Maghlaoui, K., Barber, J., and Iwata, S. (2004) *Science* **303**, 1831–1838
2. Loll, B., Kern, J., Saenger, W., Zouni, A., and Biesiadka, J. (2005) *Nature* **438**, 1040–1044
3. Diner, B. A., Schlodder, E., Nixon, P. J., Coleman, W. J., Rappaport, F., Lavergne, J., Vermaas, W. F., and Chisholm, D. A. (2001) *Biochemistry* **40**, 9265–9281
4. Groot, M. L., Pawlowicz, N. P., van Wilderen, L. J., Breton, J., van Stokkum, I. H., and van Grondelle, R. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 13087–13092
5. Holzwarth, A. R., Muller, M. G., Reus, M., Nowaczyk, M., Sander, J., and Rögner, M. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 6895–6900
6. Rappaport, F., and Diner, B. A. (2007) *Coord. Chem. Rev.* **252**, 259–272
7. Renger, G. (2007) *Photosynth. Res.* **92**, 407–425
8. Kok, B., Forbush, B., and McGloin, M. P. (1970) *Photochem. Photobiol.* **11**, 457–475
9. Yano, J., Kern, J., Sauer, K., Latimer, M. J., Pushkar, Y., Biesiadka, J., Loll, B., Saenger, W., Messinger, J., Zouni, A., and Yachandra, V. K. (2006) *Science* **314**, 821–825
10. McEvoy, J. P., and Brudvig, G. W. (2006) *Chem. Rev.* **106**, 4455–4483
11. Rutherford, A. W., and Boussac, A. (2004) *Science* **303**, 1782–1784
12. Debus, R. J. (2007) *Coord. Chem. Rev.* **252**, 244–258
13. Hillier, W., and Wydrzynski, T. (2004) *Phys. Chem. Chem. Phys.* **6**, 4882–4889
14. Messinger, J. (2004) *Phys. Chem. Chem. Phys.* **6**, 4764–4771
15. Betley, T. A., Surendranath, Y., Childress, M. V., Alliger, G. E., Fu, R., Cummins, C. C., and Nocera, D. G. (2008) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **263**, 1293–1303
16. Sproviero, E. M., Shinopoulos, K., Gascón, J. A., McEvoy, J. P., Brudvig, G. W., and Batista, V. S. (2008) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **363**, 1149–1156
17. Siegbahn, P. E. M. (2008) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **363**, 1221–1228
18. Yano, J., Kern, J., Irrgang, K. D., Latimer, M. J., Bergmann, U., Glatzel, P., Pushkar, Y., Biesiadka, J., Loll, B., Sauer, K., Messinger, J., Zouni, A., and Yachandra, V. K. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 12047–12052
19. Grabolle, M., Haumann, M., Muller, C., Liebisch, P., and Dau, H. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 4580–4588
20. Clausen, J., and Junge, W. (2004) *Nature* **430**, 480–483
21. Clausen, J., Junge, W., Dau, H., and Haumann, M. (2005) *Biochemistry* **44**, 12775–12779
22. Boussac, A., Rappaport, F., Carrier, P., Verbavatz, J.-M., Gobin, R., Kirilovsky, D., Rutherford, A. W., and Sugiura, M. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 22809–22819
23. Ghanotakis, D. F., Babcock, G. T., and Yocum, C. F. (1984) *FEBS Lett.* **167**, 127–130
24. Debus, R. J. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1102**, 269–352
25. McEvoy, J. P., and Brudvig, G. W. (2004) *Phys. Chem. Chem. Phys.* **6**, 4754–4763
26. Yocum, C. F. (2008) *Coord. Chem. Rev.* **252**, 296–305
27. Boussac, A., Sugiura, M., Lai, T.-L., and Rutherford, A. W. (2008) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **363**, 1203–1210
28. Boussac, A., and Rutherford, A. W. (1988) *Biochemistry* **27**, 3476–3483
29. Boussac, A., Sugiura, M., Inoue, Y., and Rutherford, A. W. (2000) *Biochemistry* **39**, 13788–13799
30. Strickler, M. A., Walker, L. M., Hillier, W., and Debus, R. J. (2005) *Biochemistry* **44**, 8571–8577
31. Kimura, Y., Hasegawa, K., Yamanari, T., and Ono, T.-A. (2005) *Photosynth. Res.* **84**, 245–250
32. Suzuki, H., Taguchi, Y., Sugiura, M., Boussac, A., and Noguchi, T. (2006) *Biochemistry* **45**, 13454–13464
33. Cinco, R. M., Robblee, J. H., Messinger, J., Fernandez, C., Holman, K. L. M., Sauer, K., and Yachandra, V. K. (2004) *Biochemistry* **43**, 13271–13282
34. Pushkar, Y., Yano, J., Sauer, K., Boussac, A., and Yachandra, V. K. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 1879–1884
35. Hendry, G., and Wydrzynski, T. (2003) *Biochemistry* **42**, 6209–6217
36. Barber, J., Ferreira, K., Maghlaoui, K., and Iwata, S. (2004) *Phys. Chem. Chem. Phys.* **6**, 4737–4742
37. Meelich, K., Zaleski, C. M., and Pecoraro, V. L. (2008) *Phil. Trans. R. Soc. B.* **363**, 1271–1281
38. Boussac, A., Zimmermann, J.-L., and Rutherford, A. W. (1989) *Biochemistry* **28**, 8984–8989
39. Tang, X. S., Randall, D. W., Force, D. A., Diner, B. A., and Britt, R. D. (1996) *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 7638–7639
40. Un, S., Boussac, A., and Sugiura, M. (2007) *Biochemistry* **46**, 3138–3150

41. Homann, P. H. (2002) *Photosynth. Res.* **73**, 169–175
42. Wincencjusz, H., Yocum, C. F., and van Gorkom, H. J. (1999) *Biochemistry* **38**, 3719–3725
43. Wincencjusz, H., Yocum, C. F., and van Gorkom, H. J. (1998) *Biochemistry* **37**, 8595–8604
44. Hasegawa, K., Kimura, Y., and Ono, T.-A. (2002) *Biochemistry* **41**, 13839–13850
45. Haumann, M., Barra, M., Loja, P., Loscher, S., Krivanek, R., Grundmeier, A., Andréasson, L.-E., and Dau, H. (2006) *Biochemistry* **45**, 13101–13107
46. vanVliet, P., and Rutherford, A. W. (1996) *Biochemistry* **35**, 1829–1839
47. Boussac, A., Sétif, P., and Rutherford, A. W. (1992) *Biochemistry* **31**, 1224–1234
48. Boussac, A. (1995) *Chem. Phys.* **194**, 409–418
49. Homann, P. H., and Inoue, Y. (1986) in *Ion Interactions in Energy Transfer Biomembranes* (Papageorgiou, G., Barber, J., and Papa, S., eds) pp. 291–302, Plenum Press, New York
50. Wincencjusz, H., van Gorkom, H. J., and Yocum, C. F. (1997) *Biochemistry* **36**, 3663–3670
51. Lindberg, K., Vänngård, T., and Andréasson, L.-E. (1993) *Photosynth. Res.* **38**, 401–408
52. Lindberg, K., and Andréasson, L.-E. (1996) *Biochemistry* **35**, 14259–14267
53. Ono, T., Zimmermann, J.-L., Inoue, Y., and Rutherford, A. W. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **851**, 193–201
54. Baumgarten, M., Philo, J. S., and Dismukes, G. C. (1990) *Biochemistry* **29**, 10814–10822
55. Zouni, A., Witt, H. T., Kern, J., Fromme, P., Krauss, N., Saenger, W., and Orth, P. (2001) *Nature* **409**, 739–743
56. Kamiya, N., and Shen, J.-R. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 98–103
57. Kargul, J., Maghlaoui, K., Murray, J. W., Deak, Z., Boussac, A., Rutherford, A. W., Vass, I., and Barber, J. (2007) *Biochim. Biophys. Acta* **1767**, 404–413
58. Sugiura, M., and Inoue, Y. (1999) *Plant Cell Physiol.* **40**, 1219–1231
59. Sugiura, M., Boussac, A., Noguchi, T., and Rappaport, F. (2008) *Biochim. Biophys. Acta*, **1777**, 331–342
60. Kós, P. B., Deák, Z., Cheregi, O., and Vass, I. (2008) *Biochim. Biophys. Acta* **1777**, 74–83
61. Sugiura, M., Rappaport, F., Brettel, K., Noguchi, T., Rutherford, A. W., and Boussac, A. (2004) *Biochemistry* **43**, 13549–13563
62. Béal, D., Rappaport, F., and Joliot, P. (1999) *Rev. Sci. Instrum.* **70**, 202–207
63. Ducruet, J.-M. (2003) *J. Exp. Bot.* **54**, 2419–2430
64. Ducruet, J.-M., and Miranda, T. (1992) *Photosynth. Res.* **33**, 15–24
65. Rappaport, F., Cuni, A., Xiong, L., Sayre, R., and Lavergne, J. (2005) *Bio-phys. J.* **88**, 1948–1958
66. Styring, S., and Rutherford, A. W. (1987) *Biochemistry* **26**, 2401–2405
67. Rappaport, F., Blanchard-Desce, M., and Lavergne, J. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1184**, 178–192
68. Lavergne, J. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1060**, 175–188
69. Lavorel, J. (1978) *J. Theor. Biol.* **57**, 171–185
70. Koike, H., Hanssum, B., Inoue, Y., and Renger, G., (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **893**, 524–533
71. Razeghifard, M. R., and Pace, R. J. (1999) *Biochemistry* **38**, 1252–1257
72. Haumann, M., Liebisch, P., Muller, C., Barra, M., Grabolle, M., and Dau, H. (2005) *Science* **310**, 1019–1021
73. Danielsson, R., Albertsson, P.-Å., Mamedov, F., and Styring, S. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* **1608**, 53–61
74. Lavorel, J. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1101**, 33–40
75. Rutherford, A. W., Renger, G., Koike, H., and Inoue, Y. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **767**, 548–556
76. Rutherford, A. W., Crofts, A. R., and Inoue, Y. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* **682**, 457–465
77. Devault, D., and Govindjee (1990) *Photosynth. Res.* **24**, 175–181
78. Vass, I. (2003) *Photosynth. Res.* **76**, 303–318
79. Fufezan, C., Zhang, C.-X., Krieger-Liszky, A., and Rutherford, A. W. (2005) *Biochemistry* **44**, 12780–12789
80. Vos, M. H., van Gorkom, H. J., and van Leeuwen, P. J. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1056**, 27–39
81. Fufezan, C., Gross, C. M., Sjödin, M., Rutherford, A. W., Krieger-Liszky, A., and Kirilovsky, D. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 12492–12502
82. Schilstra, M. J., Rappaport, F., Nugent, J. H. A., Barnett, C. J., and Klug, D. R. (1998) *Biochemistry* **37**, 3974–3981
83. Christen, G., and Renger, G. (1999) *Biochemistry* **38**, 2068–2077
84. Westphal, K. L., Lydakis-Simantiris, N., Cukier, R. I., and Babcock, G. T. (2000) *Biochemistry* **39**, 16220–16229
85. Lindberg, K., Wydrzynski, T., Vänngård, T., and Andréasson, L.-E. (1990) *FEBS Lett.* **264**, 153–155
86. Boussac, A., and Rutherford, A. W. (1988) *FEBS Lett.* **236**, 432–436
87. Ananyev, G. M., Zaltsman, L., Vasko, C., and Dismukes, G. C. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* **1503**, 52–58
88. Chen, C. G., Kazimir, J., and Cheniae, G. M. (1995) *Biochemistry* **34**, 13511–13526
89. Miyao, M., and Inoue, Y. (1991) *Biochemistry* **30**, 5379–5387
90. Olesen, K., and Andréasson, L.-E. (2003) *Biochemistry* **42**, 2025–2035
91. Fernandez, C., Cinco, R. M., Robblee, J. H., Messinger, J., Pizarro, S. A., Sauer, K., Klein, M. P., and Yachandra, V. K. (1998) in *Photosynthesis: Mechanisms and Effects* (Garab, G., ed) Vol. II, pp. 1399–1402, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
92. Sproviero, E. M., Gascon, J. A., McEvoy, J. P., Brudvig, G. W., and Batista, V. S. (2007) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**, 173–180
93. Vrettos, J. S., and Brudvig, G. W. (2002) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **357**, 1395–1405
94. Krieger, A., Rutherford, A. W., and Johnson, G. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1229**, 193–201

SUPPLEMENTAL DATA

**Biosynthetic Exchange of Bromide for Chloride and Strontium for Calcium in the
Photosystem II Oxygen-evolving Enzyme**

Naoko Ishida¹, Miwa Sugiura², Fabrice Rappaport³, Thanh-Lan Lai¹, A. William Rutherford¹
and Alain Boussac¹.

¹ iBiTec-S, URA CNRS 2096, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, France.

² Department of Plant Biosciences, School of Life and Environmental Sciences, Osaka
Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka, 599-8531, Japan.

³ Institut de Biologie Physico-Chimique, Université Pierre et Marie Curie/ CNRS UMR 7141,
13 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France.

Corresponding author:

Alain Boussac: alain.boussac@cea.fr

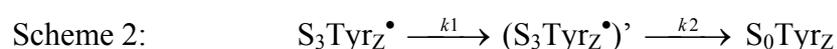
Tel : 33 (0)1 69 08 72 06

I) Time-resolved absorption changes at 292 nm.

The kinetics of the $S_3\text{Tyr}_Z^\bullet$ to $S_0\text{Tyr}_Z$ transition measured at 292 nm were fitted assuming either a single exponential decay corresponding to scheme 1 or to scheme 2 which involves an intermediate state with:



With $A(t) = A(0).e^{-k.t} + \text{offset}$ (eq1)



With $A(t) = \frac{A(0)k_1}{(k_2 - k_1)} .(e^{-k_1.t} - e^{-k_2.t}) + A(0).e^{-k_1.t} + \text{offset}$ (eq2)

In eq2, $(S_3\text{Tyr}_Z^\bullet)'$ is a transient state with the same extinction coefficient than $S_3\text{Tyr}_Z^\bullet$. The rate constant k_1 thus corresponds to the “lag phase”. In eq2 we assume that the structural rearrangements are not accompanied by an absorption increase at 292 nm which would compensate for the absorption decrease resulting from the $S_3\text{Tyr}_Z^\bullet$ to $S_0\text{Tyr}_Z$ transition.

For eq1 and eq2 “A(0)” is the calculated absorption at time $t = 0$ *i.e.* the absorption 10 μs after the third flash (the first point of the kinetics) and the offset is the calculated absorption 300 ms after the flash (the last point of the kinetics).

Figure S1 shows the results of the fits in CaCl-PSII and CaBr-PSII by using either eq1 (dashed lines) or eq2 (continuous lines). The result of the fits seems better with eq2, so we used Scheme 2 for all the data (Figure S2). The values found from the fitting procedure are indicated Table 1 of the manuscript.

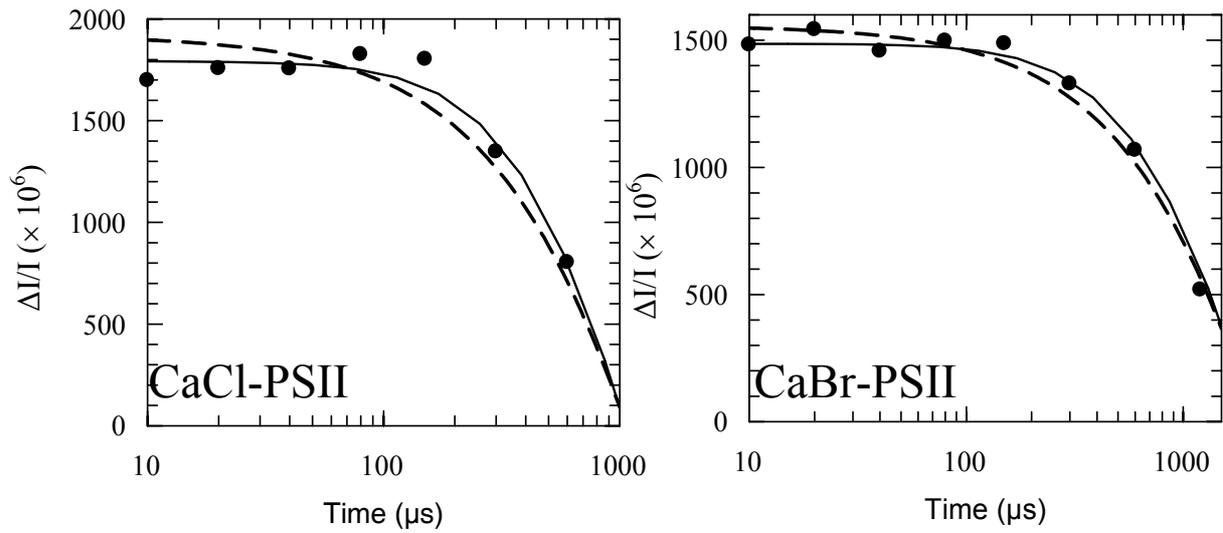


Figure S1: Kinetics of the absorption changes at 292 nm after the third flash given to dark-adapted CaCl-PSII and CaBr-PSII. The full circles are the experimental points, the continuous lines are the fit obtained with eq2 and the dashed lines are the fit with eq1.

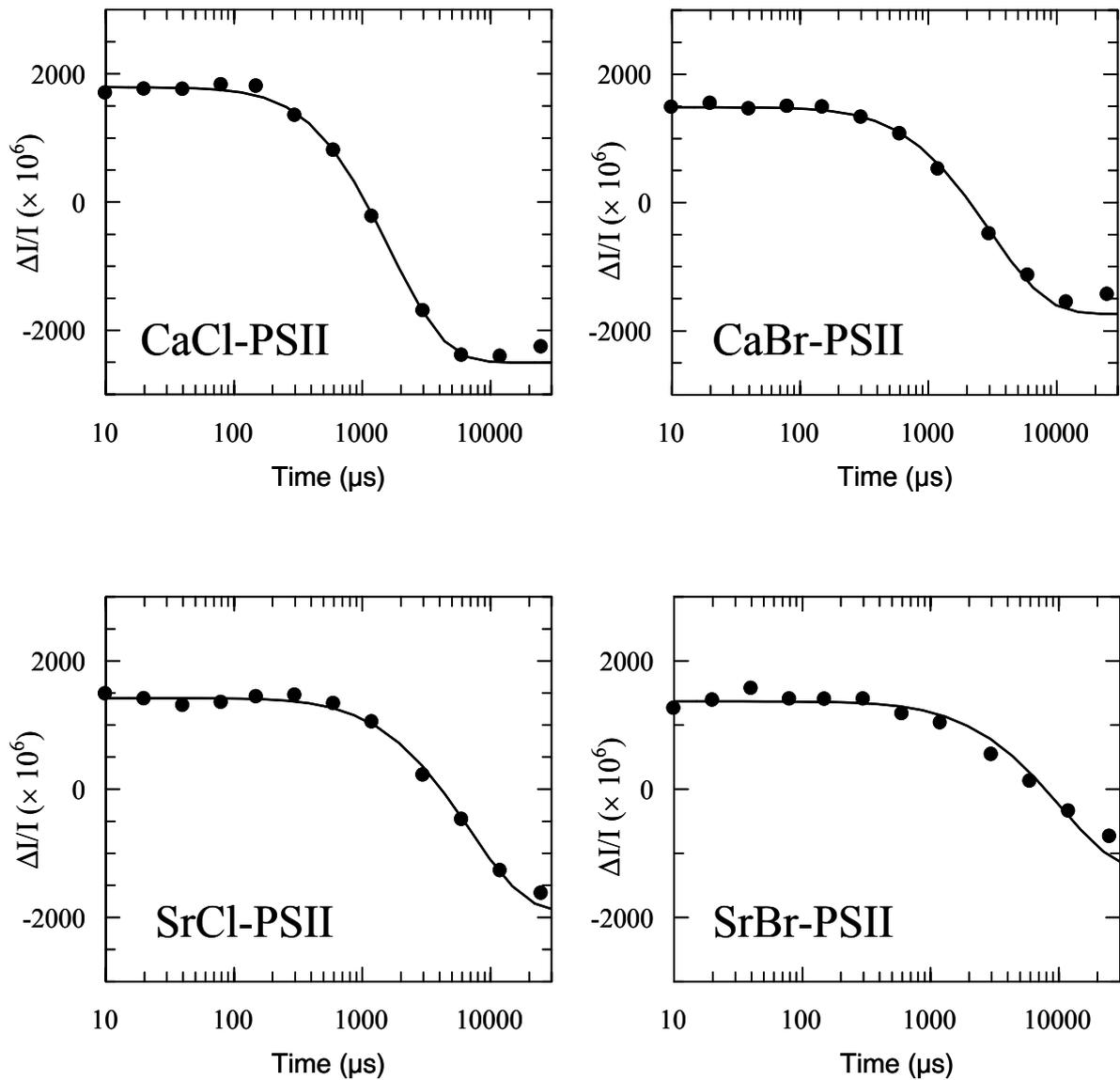


Figure S2: Kinetics of the absorption changes at 292 nm after the third flash given to dark-adapted CaCl-PSII, CaBr-PSII, SrCl-PSII and SrBr-PSII. The full circles are the experimental points and the continuous lines are the fits according to equation (eq2) with the values in Table ST1.

II) Time-resolved O₂ detection.

As demonstrated by Lavorel (69), the amperometric signal is the convolution product of the wholly diffusion limited O₂ pulse, $\Phi(t)$, with the rate of the O₂ release by PSII in the S₃Tyr_Z[•] to S₀Tyr_Z transition.

The $\Phi(t)$ function *versus* the time “t” is:

$$\Phi(t) = \frac{\sqrt{t_d}}{\sqrt{\pi} \times t^3} \times \exp\left(-\frac{t_d}{t}\right) \quad (\text{eq3})$$

In which “t_d” is the diffusion time.

The rate of O₂ release is:

$$\frac{dO_2}{dt} = k_{ox} \times \exp(-k_{ox} \times t) \quad (\text{eq4})$$



The resulting convolution product of $\Phi(t)$ with the exponential O₂ release in the S₃Tyr_Z[•] to S₀Tyr_Z transition becomes (69):

$$S_i = k_{ox} \times inc \times \sum_{j=0}^i (\Phi_j \times \exp(-k_{ox} \times inc \times (i - j))) \quad (\text{eq5})$$

In which S_i is the amperometric signal at time “inc × i” (“inc” is the time increment and “i” is the step of the integral). “Φ_j” is the value of the $\Phi(t)$ function at step “j = i”.

If the sedimentation does not vary from sample to sample the “t_d” value can be considered to be an instrumental constant. In order to check the behaviour of the “t_d” value, the procedure described below has been done.

The S_i function defined above was first plotted for different “t_d” values by using (eq5) in which “k_{ox}” was set equal to k₂, the rate constant of the (S₃Tyr_Z[•])' to S₀Tyr_Z transition in CaCl-PSII, that is 630 s⁻¹ (Figure S2 and Table ST1). For each “t_d” value, the time “t_{max}” at

which the S_i function reached its maximum (*i.e.* the time at which the derivative is zero) was determined (Figure S3). Then, the value of “ t_{\max} ” versus “ t_d ” was plotted (Figure S4).

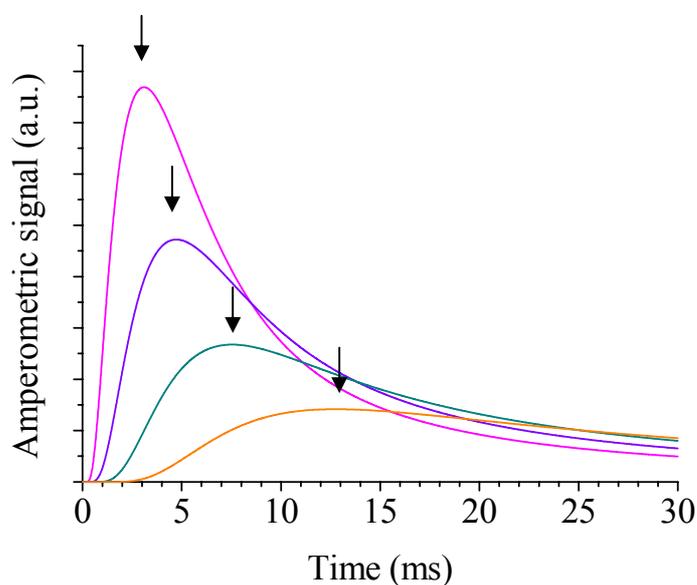


Figure S3: Examples of calculated amperometric signals by using (eq5) with $k_{\text{ox}} = 630 \text{ s}^{-1}$ and $t_d = 2 \text{ ms}$ (pink), $t_d = 4 \text{ ms}$ (purple), $t_d = 8 \text{ ms}$ (cyan) and $t_d = 16 \text{ ms}$ (orange). The arrows indicate the t_{\max} value for each of the curves.

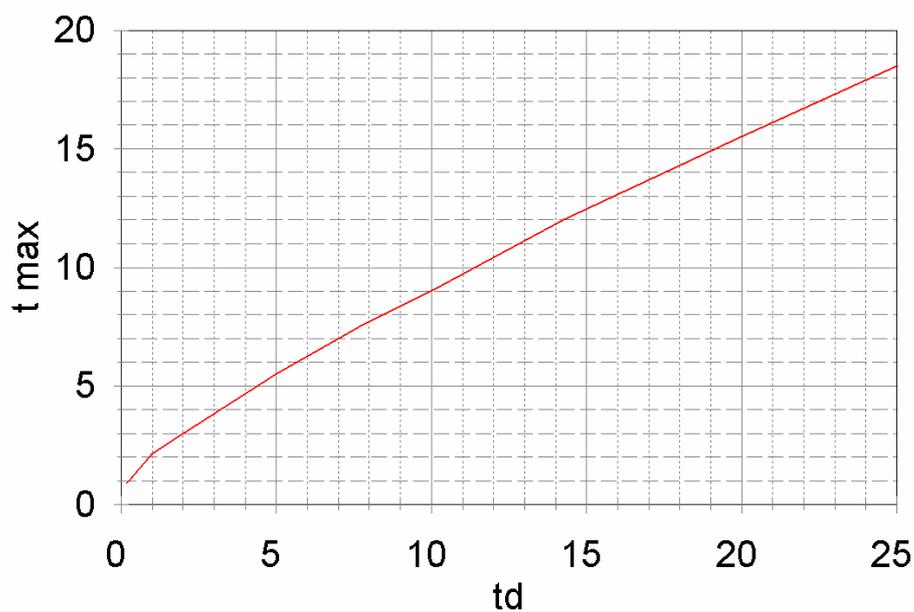


Figure S4: Variation of “ t_{\max} ” versus “ t_d ” for $k_{\text{ox}} = 630 \text{ s}^{-1}$ by using (eq5).

Experimentally (see Figure 3, Panel A, in the paper) we found that for the CaCl-thylakoid sample the “ t_{\max} ” value was ≈ 7 ms which gives a “ t_d ” value equal to 7 ms from Figure S4. This “ t_d ” value equal to 7 ms was then injected into the S_i function and the S_i function was plotted for each of the 4 samples by using the 4 “ k_{ox} ” value found in Table ST1. Figure 3C in the manuscript shows the expected amperometric signal assuming a similar “ t_d ” value for all the samples.

Comparison of Figure 3C with Figures 3A and 3B in the paper shows that the experimental traces are in good agreement with the calculated traces. This indicates that the assumption that there was not a great variation in the sedimentation properties of the samples is reasonable.

III) Thermoluminescence.

The thermoluminescence glow curves arising from the $S_2Q_B^-$ and $S_3Q_B^-$ charge recombinations can be simulated using a numerical method already described (64) on the basis of the Arrhenius-Eyring equation (eq6). Assuming a first order reaction for charge pairs not exchangeable between PSII centers, the TL emission, $L(T)$, is calculated at each sampling step at temperature T by the equation:

$$L(T) = N \times P \times T \times d_t \times \exp(-E_A/k_B T) \quad (\text{eq6})$$

N represents the number of charge pairs still able to recombine at temperature T , and is decreased at each sampling step by $L(T)$. The initial concentration, N_0 , of identical charge pairs detected through the measuring system, which can be known exactly by photon counting, corresponds to the integrated band area in the analogical recording system used here (*i.e.* amplitude and integrated area in arbitrary units). P is the pre-exponential factor that can be related to the Arrhenius-Eyring entropic frequency factor, s , as $P = K \times s$, K being an unknown factor which contains the retrapping probability of excitons (created by recombination) by empty centers. d_t is the duration of the sampling step (generally 1s), E_a is the activation energy (enthalpy) and k_B the Boltzmann constant.

The 3 governing parameters E_a , N_0 and P were first determined for a $S_2Q_B^-$ band, produced by 1 flash. For glow curves induced by 2 flashes, the E_a and P parameters of the $S_2Q_B^-$ component were blocked and N_0 was set to its expected value computed from S_0/S_1 and miss parameter, then a $S_3Q_B^-$ component was created and fitted to the overall TL signal (Figure S5 and Table ST1). In this procedure we neglected the proportion of centers in the $S_3Q_B^{\bullet-}$ state after the 2nd flash and which results from the $Q_A Q_B^{\bullet-} \Leftrightarrow Q_A^{\bullet-} Q_B$ equilibrium.

We assumed that only the energy level of the Mn_4 cluster was affected by the Ca^{2+}/Sr^{2+} and Cl^-/Br^- exchanges. This is an over-simplification since the Ca^{2+}/Sr^{2+} exchange seems at least to change the $Q_A^{\bullet-} Q_B \Leftrightarrow Q_A Q_B^{\bullet-}$ equilibrium (57). Yet, this allows one to obtain an estimate of the changes expected in term of redox potential. The parameters resulting from the fitting procedure are listed in Table ST2 and the simulated glow curves together with the experimental curves are shown in Figure S5 and Table ST1.

Table ST1: Parameters resulting from the simulation procedure (average of three different samples).

PSII sample	Activation Energy, E_a , in eV (± 0.02 eV)	Preexponential factor	T_m ($^{\circ}\text{C}$) (± 0.5 $^{\circ}\text{C}$)
Ca/Cl	0.74	$(3.5 \pm 0.2) 10^7$	48.2
Ca/Br	0.75	$(3.7 \pm 0.2) 10^7$	48.7
Sr/Cl	0.83	$(70 \pm 5) 10^7$	51.6
Sr/Br	0.85	$(100 \pm 20) 10^7$	55.1

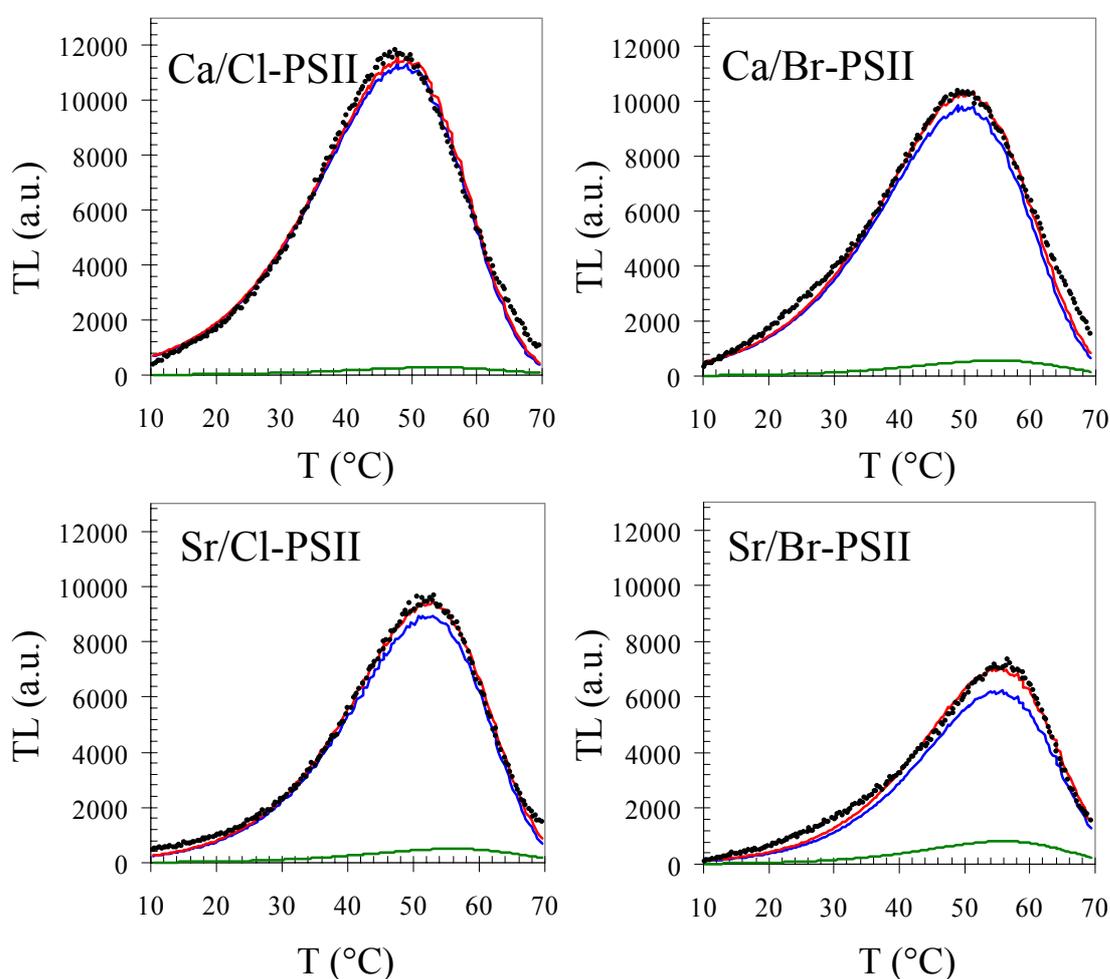


Figure S5: Thermoluminescence glow curves from $S_3Q_B^{\bullet-}$ charge recombination measured after 2 flashes in CaCl-PSII, CaBr-PSII, SrCl-PSII and SrBr-PSII (full black circles). The green curve is the fitted curve for the $S_2Q_B^{\bullet-}$ contribution expected after 2 flashes; the blue curve is the fitted curve for the $S_3Q_B^{\bullet-}$ contribution; the red curve is the sum of the two contributions, $S_2Q_B^{\bullet-}$ and $S_3Q_B^{\bullet-}$.

IV) $P_{680}^{\bullet+}$ reduction kinetics.

Figure S6 shows the $P_{680}^{\bullet+}$ reduction kinetics measured at 433 nm after the first flash given to dark-adapted samples, i.e. in the S_1 state. The reduction of $P_{680}^{\bullet+}$ in the 10 to 20 ns time-scale is similar in all the 4 samples. This indicates that the electron transfer from Tyr_Z to $P_{680}^{\bullet+}$ is not significantly modified by the Ca^{2+}/Sr^{2+} and Cl^-/Br^- exchanges. In contrast, in the 0.1 to 100 μ s time-scale, the reduction of $P_{680}^{\bullet+}$ by Tyr_Z was slowed-down by the Ca^{2+}/Sr^{2+} exchange but remained unaffected by the Cl^-/Br^- exchange (the differences between the four samples are less clear on the following flashes). A modification of the $P_{680}^{\bullet+}$ reduction kinetics in the 0.1 to 100 μ s time-scale indicates that the Ca^{2+}/Sr^{2+} exchange affects the proton(s) relaxation(s) associated to the oxidation of Tyr_Z by $P_{680}^{\bullet+}$.

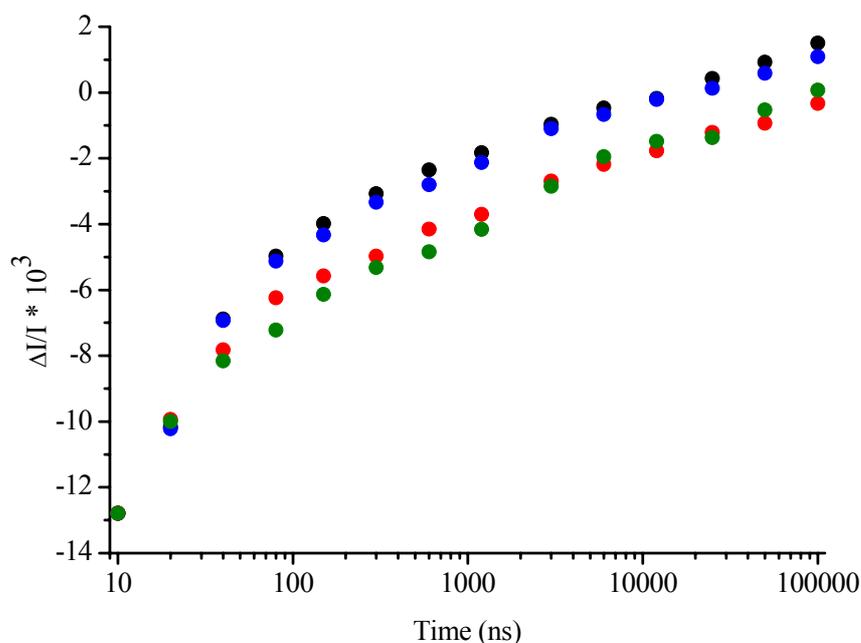


Figure S6: Kinetics of reduction of $P_{680}^{\bullet+}$. The flash-induced absorption changes were measured at 433 nm in CaCl-PSII (black), CaBr-PSII (blue), SrCl-PSII (red) and SrBr-PSII (green). After dark-adaptation of the samples ($Chl = 25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) for 1 hour at room temperature, 100 μM PPBQ was added. Then, 1 saturating laser flash was given and the decay of $P_{680}^{\bullet+}$ was followed by a train of detecting flashes at the indicated times. The four traces were normalized to the amplitude of the signal observed in CaCl-PSII.